Agricultural Sci. J. 44 : 3 (Suppl.) : 538-542 (2013) ว. วิทย. กษ. 44 : 3 (พิเศษ) : 538-542 (2556)

บทบาทของไคโตซานต่อการควบคุมเชื้อรา *Fusarium oxysporum* ในเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ

Role of Chitosan on the Control of *Fusarium oxysporum* on Tomato Seeds

ชาลิณี สังขจร[1] ชณิตรา โพธิคเวษฐ์[1] นวลจันทร์ ภูคลัง[1] และ ทรงศิลป์ พจน์ชนะชัย[1]

Chalinee Sungkajorn[1], Chanitra Pothikhawet[1], Nuanjun Phukhrung[1] and Songsin Photchanachai[1]

Abstract

The objective of this research is to study the role of chitosan on the control of *Fusarium oxysporum*, which causes a green wilt disease, on tomato seeds. PDA (potato dextrose agar) amended with 0.2, 0.4, 0.6 and 0.8% chitosan solution was used as a media for fungal growth at a pH of 5.6. The results showed that chitosan in PDA significantly delayed spore germination and mycelial growth compared to the PDA (control 1) and PDA mixed with 0.5% acetic acid (control 2). And, its efficacy was significantly increased with the increase of acetic acid concentrations. Tomato seeds inoculated with the spore suspension of *F. oxysporum* before soaking with 0.6 and 0.8% chitosan solution, 0.5% acetic acid or distilled water were determined for their qualities and seed infection. The results showed that the chitosan solution and 0.5% acetic acid significantly enhanced the germination percentage and germination index and tended to increase seedling survival, but reduced seed infection compared to distilled water. Our results suggest that chitosan would be one of the control treatments to prevent and reduce infection of *F. oxysporum* in tomato.

Keywords: *Fusarium oxysporum*, tomato, chitosan

บทคัดย่อ

การศึกษาผลของไคโตซานต่อการควบคุมเชื้อรา *Fusarium oxysporum* (สาเหตุโรคเหี่ยวเหลือง) ในเมล็ดมะเขือเทศ พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (potato dextrose agar) ผสมไคโตซานความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6 และ 0.8% (pH 5.6) ชะลอการงอกของสปอร์และการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *F. oxysporum* ได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับอาหาร PDA (ชุดควบคุม 1) และอาหาร PDA ผสมกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5% (ชุดควบคุม 2) และประสิทธิภาพเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้น สำหรับผลของไคโตซานต่อคุณภาพและการปนเปื้อนเชื้อราในเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่คลุกด้วยสารแขวนลอยสปอร์เชื้อรา *F. oxysporum* ก่อนนำมาแช่ด้วยสารละลายไคโตซานความเข้มข้น 0.6 และ 0.8%, กรดอะซิติก (0.5%) หรือน้ำกลั่น พบว่า สารละลายไคโตซานและกรดอะซิติก ทำให้เมล็ดมีความงอกและดัชนีการงอกสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ และยังมีแนวโน้มเพิ่มปริมาณการอยู่รอดของต้นกล้าแต่ลดการปนเปื้อนเชื้อราของเมล็ดเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำกลั่น จากผลการทดลองแนะนำได้ว่าไคโตซานที่ละลายในกรดอะซิติกสามารถนำมาเป็นวิธีการหนึ่งในการป้องกันและลดการทำลายของเชื้อรา *F. oxysporum* ในเมล็ดมะเขือเทศได้

คำสำคัญ: *Fusarium oxysporum* มะเขือเทศ ไคโตซาน

คำนำ

เชื้อรา *Fusarium oxysporum* เป็นเชื้อสาเหตุสำคัญของโรคเหี่ยวเหลืองในมะเขือเทศ และสามารถติดไปกับเมล็ดพันธุ์ได้ และพบว่ามีการระบาดในแหล่งที่มีการผลิตเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศจึงก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจ การส่งออกเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศต้องมีการรับรองการปลอดจากโรคเหี่ยวเหลืองจึงส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมเมล็ดพันธุ์ (วธุกา และคณะ 2555) การป้องกันกำจัดส่วนใหญ่มักใช้สารเคมีซึ่งเป็นอันตรายต่อผู้ผลิตและผู้บริโภค อีกทั้งยังทำให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม (Rodriguez and Curl, 1980) มีรายงานจำนวนมากที่นำไคโตซานมาใช้ควบคุมเชื้อเช่น *Alternaria brassicicola* ในเมล็ดผักกาดเขียวปลี (นวลจันทร์, 2551) และในเมล็ดข้าวสาลี (Reddy *et al*., 1999) แต่ยังไม่มีรายงานการนำมาทดสอบกับเชื้อรา *F. oxysporum* งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารละลายไคโตซานที่เหมาะสมในการป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อรา *F. oxysporum* ซึ่งเป็น soilborne pathogens ที่ทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และในเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ เพื่อเป็น

[1] หลักสูตรเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี กรุงเทพฯ 10140

[1] Programme of Postharvest Technology, School of Bioresources and Technology,King Mongkut's University of Technology Thonburi, Bangkok 10140

อีกแนวทางหนึ่งที่จะช่วยลดหรือหลีกเลี่ยงปัญหาการใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัดเชื้อราสาเหตุโรคพืช และส่งเสริมการปลูกผักปลอดสารพิษและเกษตรอินทรีย์ เพื่อเพิ่มความปลอดภัยแก่ผู้ผลิตและผู้บริโภค

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ศึกษาผลของสารละลายไคโตซานต่อการเจริญเติบโตและการงอกของสปอร์เชื้อรา *F. oxysporum* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (PDA) ที่ผสมสารละลายไคโตซานเพื่อให้ได้ความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6 และ 0.8% และกรดอะซีติก 0.5% ตามวิธีการของ Photchanachai *et al.,* 2006 ตัดชิ้นวุ้นของอาหาร PDA ที่มีเชื้อรา *F. oxysporum* เจริญเต็มที่ ซึ่งได้จากสำนักวิจัยพัฒนาอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร วางบนจานอาหาร PDA ที่ผสมไคโตซานที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน และ PDA ที่ผสมและไม่ผสมกรดอะซีติก 0.5% เป็นชุดควบคุม แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) ทำการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเส้นใย เป็นเวลา 3, 6, 9, 12 และ 15 วัน สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพไคโตซานต่อการงอกของสปอร์ โดย spread สารแขวนลอยเชื้อ *F. oxysporum* ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และ PDA ที่ผสมกรดอะซีติก 0.5% และสารละลายไคโตซานที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน จากนั้นตรวจนับการงอกของสปอร์ (%) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ หลังจากบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 0, 4, 6, 8, 12 และ 24 ชั่วโมง วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทรีทเมนต์ละ 4 ซ้ำๆ ละ 4 จาน

2. ศึกษาผลของการแช่เมล็ดพันธุ์มะเขือเทศด้วยสารละลายไคโตซานต่อการยับยั้งเชื้อรา *F. oxysporum* และคุณภาพเมล็ดพันธุ์

นำเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่ผ่านการปลูกเชื้อรา *F. oxysporum* บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30±1 ระยะเวลา 12 ชั่วโมง มาแช่ในน้ำกลั่น (ชุดควบคุม 2) กรดอะซิติก 0.5% และสารละลายไคโตซาน 0.6 และ 0.8% เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วผึ่งให้แห้ง ตามวิธีการของ Photchanachai *et al.,* 2006 เมล็ดที่ไม่ผ่านการปลูกเชื้อเป็นชุดควบคุมที่ 1 จากนั้นนำเมล็ดมาทดสอบเปอร์เซ็นต์ความงอก ดัชนีความงอก ตามวิธีของ ISTA (2007) ตรวจวัดเปอร์เซ็นต์เมล็ดที่ติดเชื้อและเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของต้นกล้า (Photchanachai *et al.,* 2006) วางแผนการทดลองแบบ CRD ทรีทเมนต์ละ 4 ซ้ำๆ ละ 100 เมล็ด

นำข้อมูลที่บันทึกมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance; ANOVA) โดยใช้โปรแกรม SAS (version 9.0, 2002) และเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT)

ผลและวิจารณ์

เชื้อรา *F. oxysporum* โดยทั่วไปมีลักษณะเส้นใยฟูเป็นปุยคล้ายสำลี มีสีชมพู ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ พบว่า มีสีชมพูอ่อน (Figure 1 A) คอนิดิโอฟอร์ (Conidiophores) มีรูปร่างและขนาดแตกต่างกันมาก (Figure 1 A) (วิจัย, 2551) เมื่อนำเชื้อราชนิดนี้มาทดสอบกับสารละลายไคโตซานความเข้มข้น 0.4 - 0.8% ที่ผสมใน PDA (pH 5.6) ยับยั้งการเจริญของเส้นใย ได้นาน 12 วัน ในขณะที่ ชุดควบคุมทั้งสองคือ อาหาร PDA และPDA ผสม 0.5% กรดอะซิติก (pH 5.6) และ 0.2% ไคโตซาน เส้นใยเชื้อราเจริญเพิ่มขึ้นชัดเจนตามระยะเวลาการบ่ม (Figure 2) ซึ่งสอดคล้องกับสารละลายไคโตซาน และ Chitosan derivative ความเข้มข้น 0.6% ที่ผสมใน PDA ชะลอการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Rhizopus* sp., *Colletotrichum capsici, C. gloeosporioides,* และ *Aspergillus niger* (Chookhongka *et al*., 2013) นอกจากนี้ สารละลายไคโตซานความเข้มข้น 0.2-0.8% ชะลอการงอกของสปอร์เชื้อรา *F. oxysporum* ได้อย่างสมบูรณ์นาน 4 ชม. และประสิทธิภาพเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของไคโตซาน (Figure 3) เช่นเดียวกันกับ El Ghaouth *et al*. (1992) รายงานว่า การใช้สารละลายไคโตซานความเข้มข้น 0.075% ขึ้นไป มีประสิทธิภาพในการชะลอการงอกของสปอร์เชื้อรา *Botrytis cinerea* และ *R. stolonifer* ผลการทดลองสอดคล้องกับ จินตนา และคณะ (2549) รายงานว่า ไคโตซานชะลอการเจริญของเส้นใยและการงอกของสปอร์เชื้อรา *F. solani* (soilborne pathogenn) และ *Macrophomena phaseolina* (seedborne pathogen) ได้เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้น นวลจันทร์ (2551) พบว่า สารละลายไคโตซานความเข้มข้น 0.4 - 0.8% ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Alternaria brassicicola* (seedborne pathogen) และที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 2.0% ชะลอการงอกของสปอร์เชื้อรานี้ได้

เมื่อนำสารละลายไคโตซานมาทดสอบกับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ โดยปลูกเชื้อบนเมล็ดพันธุ์ด้วยการคลุกสารแขวนลอยสปอร์เชื้อรา *F. oxysporum* หลังจากนั้นจึงนำมาแช่ด้วยสารละลาย 0.6 และ 0.8% ไคโตซาน, 0.5% กรดอะซิติกหรือน้ำกลั่น พบว่า สารละลายไคโตซานความเข้มข้นทั้ง 2 ระดับ และกรดอะซิติก ทำให้เมล็ดมีความงอก และดัชนีการงอกไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญกับเมล็ดที่คลุกเชื้อแล้วแช่น้ำกลั่น

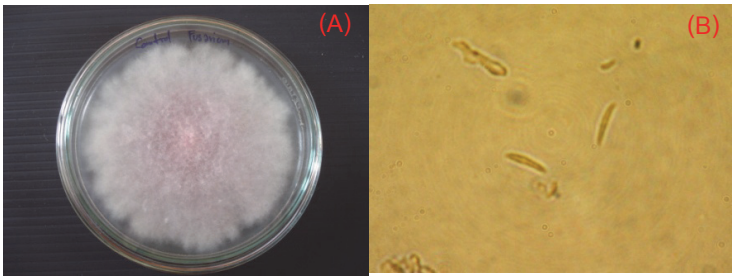

Figure 1 The characteristic of mycelium (A) and conidiophores (B) of *Fusarium oxysporum*

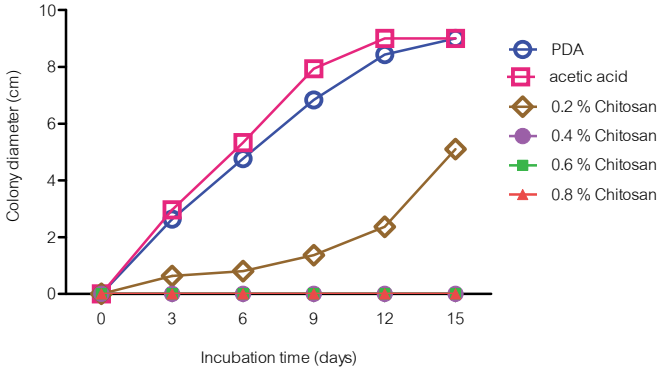

Figure 2 Colony diameter (cm) of *Fusarium oxysporum* in PDA and PDA incorporated with 0.5% acetic acid and 0.2, 0.4, 0.6 and 0.8% chitosan.

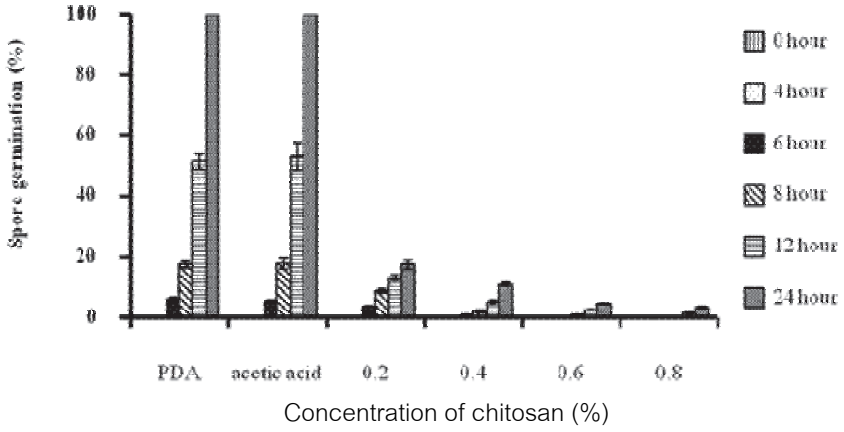

Figure 3 Spore germination of *Fusarium oxysporum* in PDA and PDA incorporated with 0.5% acetic acid and 0.2, 0.4, 0.6 and 0.8% chitosan.

นอกจากนี้ยังมีแนวโน้มเพิ่มปริมาณการอยู่รอดของต้นกล้าและลดการปนเปื้อนเชื้อราของเมล็ดที่คลุกเชื้อได้ดีกว่าการแช่น้ำกลั่น (Figure 4) แสดงว่า ทั้งสารละลายไคโตซานและกรดอะซิติกมีประสิทธิภาพในการควบคุมการเชื้อรา *F. oxysporum* ได้ การที่กรดอะซิติกควบคุมเชื้อที่ปนเปื้อนมากับเมล็ดพันธุ์ได้นั้นอาจเนื่องมาจาก สภาพที่เป็นกรด (ไม่ได้ปรับ pH เหมือนกับในการทดลองที่ 1) รบกวนการงอกและการเจริญของเชื้อรา (วิจัย, 2551) ส่วนสารละลายไคโตซานซึ่งปรับ pH เป็น 5.6 ยังคงประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อราที่ปนเปื้อนมากับเมล็ดมะเขือเทศได้ และให้ผลสอดคล้องกับประสิทธิภาพในอาหาร PDA (การทดลองที่ 1) ทั้งนี้กลไกการยับยั้งเชื้อราของไคโตซานนั้นมีรายงานว่า ประจุบวกบน polymer ของไคโตซานทำปฏิกิริยากับประจุลบที่ผนังเซลล์ของเชื้อรา ทำให้เกิดการรั่วไหลของสารประกอบต่าง ๆ โดยเฉพาะสารประกอบในกลุ่มโปรตีน (Rebea *et al*., 2003) นอกจากนี้ ไคโตซานเป็นสารพวก chelating agent ที่สามารถเกาะติดกับธาตุโลหะจึงทำให้ธาตุโลหะที่จำเป็นถูก

ขัดขวางส่งผลต่อกระบวนการสังเคราะห์สารชีวโมเลกุล และกระบวนการการเจริญเติบโตในเซลล์ของเชื้อรา อีกทั้งมีรายงานว่าไคโตซานยังสร้างพันธะเคมีกับ DNA และขัดขวางกระบวนการสังเคราะห์ mRNA ทำให้เชื้อราไม่สามารถสร้างโปรตีน เชื้อราจึงหยุดการเจริญเติบโตและตายในที่สุด (Rabea *et al*., 2003) ดังนั้น สปอร์เชื้อราที่ปนเปื้อนมากับเมล็ดพันธุ์จึงเจริญไม่สมบูรณ์หรือตายภายหลังการแช่สารละลายไคโตซาน จึงส่งผลให้เมล็ดที่คลุกเชื้อรายังคงความงอกและความแข็งแรงสูงได้ และเมล็ดปนเปื้อนเชื้อราลดลงซึ่งไม่ต่างจากการแช่กรดอะซิติกเพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ Reddy *et al*., (1999) รายงานว่าการแช่เมล็ดข้าวสาลีด้วยสารละลายไคโตซานทำให้ต้นอ่อนข้าวสาลีสร้างสารประกอบในกลุ่มฟีนอลิกและลิกนินมากขึ้นทำให้โครงสร้างของเซลล์พืชแข็งแรงและทนทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา *F. oxysporum* ได้ดียิ่งขึ้น และมีรายงานว่าไคโตซานเหนี่ยวนำให้สร้างเอนไซม์ chitinase และ β - 1, 3 - glucanase มาย่อยผนังเซลล์ของเชื้อรา ซึ่งเอนไซม์ทั้งสองนี้สามารถทำงานร่วมกันแบบส่งเสริมในการป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อราได้ (Brunner *et al*., 1998) และ Zhan and Liu (2004) พบว่า เมล็ดพันธุ์หญ้าแพรก (*Cynodon dactylon* L.) แช่สารละลายไคโตซานที่ความเข้มข้น 0.5 - 3.0% มีความแข็งแรงมากกว่าแช่ในน้ำกลั่น แสดงว่า ไคโตซานมีผลในการควบคุมเชื้อราโดยตรง จึงส่งผลให้เมล็ดที่คลุกเชื้อมีความงอก และความแข็งแรงใกล้เคียงกันกับอะซิติกและใกล้เคียงกับเมล็ดที่ไม่คลุกเชื้อ (ชุดควบคุม 1) อย่างไรก็ตามการกระตุ้นให้เมล็ดหรือต้นอ่อนมะเขือเทศสร้างสารประกอบหรือเอนไซม์ที่ทำให้เกิดความต้านทานเชื้อนั้นจำเป็นต้องทำการวิเคราะห์เพิ่มเติม

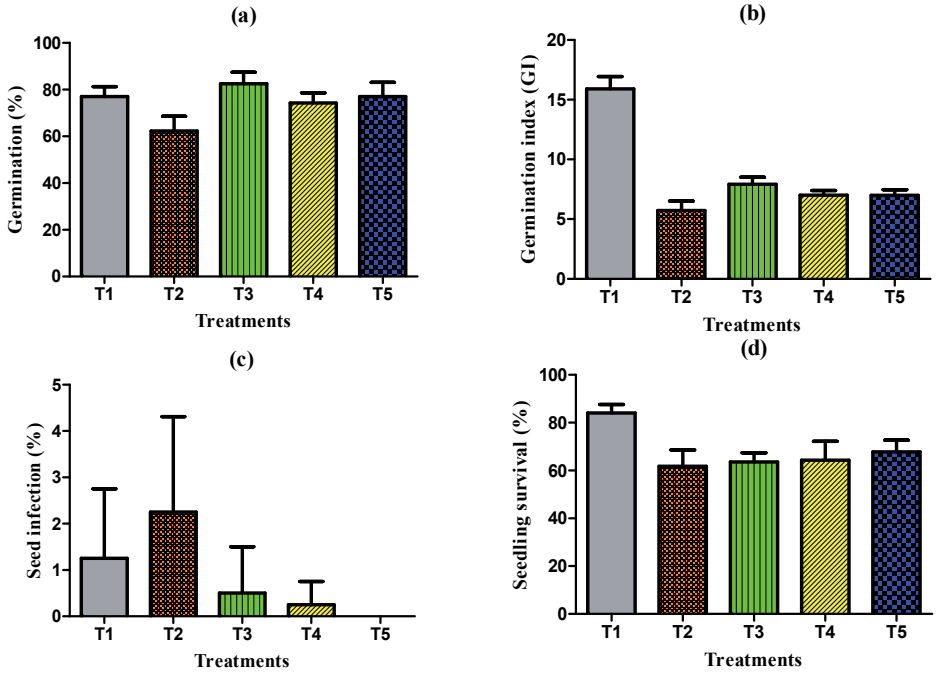

Figure 4 Germination (%) (a), Germination index (b), Seed infection (%) (c) and Seedling survival (%) (d) of inoculated tomato seed soaked with distilled water (T2), 0.5% acetic acid (T3), 0.6 and 0.8% chitosan (T4 and T5), no inoculated tomato seed soaked with distilled water (T1) used as control.

สรุป

1. สารละลายไคโตซานทุกความเข้มข้นที่ผสมในอาหาร PDA มีประสิทธิภาพในการชะลอการเจริญของเส้นใยและการงอกของสปอร์เชื้อรา *F. oxysporum* ได้เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้น

2. การแช่เมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่คลุกสารแขวนลอยสปอร์เชื้อรา *F. oxysporum* ในสารละลายไคโตซาน หรือ กรดอะซิติก 0.5% ทำให้เมล็ดมีความงอกและความแข็งแรงสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญกับการแช่น้ำกลั่น ดังนั้นการละลายไคโตซานด้วยกรดอะซิติก 0.5% แล้วนำไปใช้ในการแช่เมล็ดพันธุ์มะเขือเทศจึงน่าจะส่งเสริมประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อรา *F. oxysporum* ในเมล็ดได้

เอกสารอ้างอิง

จินตนา ทำทอง, ทักษอร บุญชู และ ทรงศิลป์ พจน์ชนะชัย. 2549. ผลของไคโตซานต่อการงอกของสปอร์และการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคพืช. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 37 (2 พิเศษ): 116-118.

นวลจันทร์ ภูคลัง. 2551. ผลของสารละลายไคโตซานต่อการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชที่ปนเปื้อนอยู่บนเมล็ดพันธุ์ผักกาดเขียวปลี. ปัญหาพิเศษปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี. 74 หน้า.

วธุกา พลังภูเขียว, พัชนิดา นักธรรม และ เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล. 2555. สถานการณ์โรคพริกและมะเขือเทศที่พบในแหล่งผลิตเมล็ดพันธุ์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของ ประเทศไทยและเขตปากซอง สาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว. แก่นเกษตร 522(40 พิเศษ): 522-531.

วิจัย รักวิทยาศาสตร์. 2551. ราวิทยาเบื้องต้น. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. หน้า 351.

Chookhongkha, N., S. Photchanachai and T. Sopondilok. 2013. Effect of Chitosan and Chitosan Nanoparticles on Antifungal Growth and Chili Seed Quality. ISHS Acta Horticulturae 973: 231-237.

Brunner, F., A. Stintzi, B. Fritig and M. Legrand, 1998, Substrate specificities of tobacco chitinases. Plant J. 14: 225–234.

El Ghaouth, A., J. Arul, J. Grenier and A. Asselin. 1992. Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruits. Phytopathology 82: 398-402.

ISTA. 2007. International Rules for Seed Testing Edition. The International Seed Testing Association, Switzerland.

Photchanachai S., J. Singkaew and J. Thamthong. 2006. Effects of chitosan seed treatment on *Colletotrichum* sp. and seedling growth of chilli cv. Jinda. Acta Horticulturae 712: 585 - 590.

Rabea, E.I., M.E. Badawy, C.V. Stevens, G. Smagghe and W. Steurbaut. 2003. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. Biomacromolecules 4: 1457-1465.

Reddy, M.V.B., A. Joseph, P. Angers and L. Couture. 1999. Chitosan treatment of wheat seeds induces resistance to *Fusarium graminearum* and improves seed quality. J. Agric. Food Chem. 47: 1208-1216.

Rodrigruez, K. R. and E. A. Curl. 1980. Non-target effect of pesticides on soilborne pathogen and disease. Ann Rev Phytopathology 18: 311-322.

Zhan, G.Y. and W.G. Liu. 2004. Effect of chitosan on germination of *Cynodon dactylon*. Pratacultural Science 21: 44 - 46.