ผลของ culture filtrate จากเชื้อราบางชนิดต่อการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของกล้วยหอมทอง (*Musa acuminata*, AAA group)

Effect of Some Fungal Culture Filtrates on Controlling Anthracnose Disease of Banana Cultivar Hom Thong (*Musa acuminata*, AAA group)

วีระณีย์ ทองศรี[1] ศิริอร บวรวทัญญู[2] และสมศิริ แสงโชติ[1]
Veeranee Tongsri[1] Sirion Bowonwathanyoo[2] and Somsiri Sangchote[1]

Abstract

Banana anthracnose disease caused by the fungus *Colletotrichum musae*, is one of important diseases causing damage to banana production worldwide. Various methods for control of this disease were previously reported. Culture filtrates of 4 selected fungi were used for control of this disease to reduce the use of chemical fungicides. Four fungal culture filtrates obtained from *Phomopsis* WYJ1, *Phomopsis* 07, *Phomopsis* C13 and *Rhizoctonia* DSW1, isolated from durian seedlings were investigated on disease severity and spore germination as well as germ tube growth of the pathogen. The results revealed that the culture filtrate of *Phomopsis* WYJ1 displayed the highest efficiency on reduction of disease severity at 75.0%, followed by culture filtrates of *Rhizoctonia* DSW1 (44.9%) and *Phomopsis* 07 (38.6%). In addition, the culture filtrate of *Phomopsis* WYJ1could inhibit spore germination and germ tube elongation of *C. musae* on water agar at 19.4 and 46.6%, respectively. Furthermore, bioassay of antifungal compounds by the WYJ1 culture filtrate was conducted on TLC plate sprayed with the indicator fungus, *Cladosporium oxysporum*. It was found that appearance of inhibition zone in longitudinal shape was at retention factor (R_f) of 0.08-0.96.

Keywords: *Colletotrichum musae*, banana anthracnose, fungal crude extract

บทคัดย่อ

โรคแอนแทรคโนสของกล้วย มีสาเหตุจากเชื้อรา *Colletotrichum musae* เป็นโรคหนึ่งที่ทำความเสียหายต่อกล้วยทั่วโลก มีรายงานการใช้วิธีต่างๆ ในการควบคุมโรคนี้มาก่อน ในการศึกษาครั้งนี้ ได้ทดลองนำ culture filtrate จากเชื้อราที่คัดเลือกมาใช้ควบคุมการเกิดโรคเพื่อลดการใช้สารเคมีให้น้อยลง โดยนำ culture filtrate ของเชื้อรา 4 ชนิด ได้แก่ *Phomopsis* WYJ1, *Phomopsis* 07, *Phomopsis* C13 และ *Rhizoctonia* DSW1 ซึ่งแยกได้จากต้นกล้าทุเรียน พบว่า culture filtrate จากเชื้อรา *Phomopsis* WYJ1 มีประสิทธิภาพในการลดความรุนแรงของโรคได้ดีที่สุดถึง 75.0% รองลงมาคือจากเชื้อรา *Rhizoctonia* DSW1 (44.9%) และ *Phomopsis* 07 (38.6%) นอกจากนั้น culture filtrate ของเชื้อรา *Phomopsis* WYJ1 ยังสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์และลดการเจริญจากปลายเส้นใยของเชื้อรา *C. musae* บนอาหาร water agar ได้ 19.4 และ 46.6% ตามลำดับ ยิ่งไปกว่านั้น เมื่อทำการศึกษาการมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราของ culture filtrate จากเชื้อรา *Phomopsis* WYJ1 โดยวิธี bioassay บนแผ่น TLC ซึ่งใช้เชื้อรา *Cladosporium oxysporum* เป็นเชื้อทดสอบ พบว่า บนแผ่น TLC ปรากฏบริเวณยับยั้งเป็นช่วงกว้าง โดยมีค่า retention factor (R_f) อยู่ในช่วง 0.08-0.96

คำสำคัญ: *Colletotrichum musae*, โรคแอนแทรคโนสของกล้วย, สารสกัดจากเชื้อรา

คำนำ

ในระยะเวลาหลายปีที่ผ่านมา มีเชื้อราหลายชนิดที่ถูกนำมาใช้ในการควบคุมโรคพืชทั้งในสภาพแปลงปลูกและหลังการเก็บเกี่ยว โดยเชื้อราดังกล่าวจะต้องมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์สาเหตุโรคทั้งทางตรงและทางอ้อมหรืออย่างใดอย่างหนึ่ง ซึ่งหนึ่งในกลไกของการควบคุมโรคของเชื้อราดังกล่าว คือ การสร้างสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรค และในปัจจุบันสารประกอบดังกล่าวถูกนำมาใช้ควบคุมโรคพืชกันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากมีความ

[1] ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพฯ
[1] Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkhaen Campus, Bangkok
[2] นิสิตปริญญาตรี ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพฯ
[2] Undergraduate Student, Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkhaen Campus, Bangkok

ปลอดภัยต่อพืชกว่าการใช้เซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์โดยตรง ซึ่งอาจจะมีโอกาสพัฒนาก่อให้เกิดโรคได้ในอนาคต รวมทั้งการใช้สารทุติยภูมิในผลิตผลหลังการเก็บเกี่ยว จะไม่ก่อให้เกิดความเสี่ยงในการตรวจพบเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตผล ซึ่งจะเป็นการป้องกันการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ได้ การนำสารทุติยภูมิจากเชื้อจุลินทรีย์มาควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยวนี้ กำลังได้รับความนิยมกันอย่างแพร่หลาย ทั้งจากเชื้อยีสต์ (Tongsri and Sangchote, 2009) เชื้อแบคทีเรีย (Haggag and El Soud, 2012) และเชื้อรา (Mishra *et al.,* 2011) ซึ่งในงานวิจัยครั้งนี้ได้ทดลองนำ culture filtrate จากเชื้อราบางชนิดที่แยกได้จากต้นกล้าทุเรียนพันธุ์หมอนทองมาควบคุมโรคแอนแทรคโนสของกล้วยหอมทอง เพื่อคัดเลือกประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเบื้องต้น อันจะก่อให้เกิดการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยวต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ผลของ culture filtrate ต่อการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนผลกล้วยหอมทอง

เตรียม culture filtrate ของเชื้อรา 4 ชนิด ได้แก่ *Phomopsis* WYJ1, *Phomopsis* 07, *Phomopsis* C13 และ *Rhizoctonia* DSW1 ที่แยกได้จากต้นกล้าทุเรียน โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว half potato dextrose broth (half PDB) ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ และบ่มเชื้อไว้เป็นเวลา 30 วันที่อุณหภูมิห้อง (25-32ºC) จากนั้นกรองเอา culture filtrate มาพ่นลงบนผลกล้วยที่ระยะแก่ 80% (ตัดออกจากหวีเป็นผลเดี่ยว) โดยใช้ airbrush (BADGER AIR-BRUSH™, U.S.A.) แล้วจึงปลูกเชื้อด้วยการพ่น spore suspension ของเชื้อรา *C. musae* ที่ความเข้มข้น 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ตามลงไป ทำการทดลอง 3 ซ้ำๆ ละ 10 ผล บ่มเชื้อบนผลกล้วยในถุงพลาสติกชื้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เปิดถุงออก และบ่มต่ออีกเป็นเวลา 5 วัน ประเมินความรุนแรงของโรคเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (พ่นด้วยอาหาร half PDB)

2. ผลของ culture filtrate ต่อการงอกของสปอร์เชื้อราสาเหตุโรค เตรียมสปอร์ของเชื้อรา *C. musae* จากกลุ่มสปอร์ที่เจริญบนแผลของผลกล้วยที่ผ่านการปลูกเชื้อแล้วเป็นเวลา 10 วัน โดยใช้สารละลาย 0.85% NaCl ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ชะล้างให้เป็น spore suspension จากนั้นนำมาหมุนเหวี่ยงที่ 3,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เก็บสปอร์ที่ตกตะกอน และเท culture filtrate ลงไปให้ท่วม ทิ้งไว้เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ดูด spore suspension ปริมาตร 20 ไมโครลิตร มาเกลี่ยบนผิวหน้าอาหาร water agar (WA) ให้ทั่ว บ่มไว้เป็นเวลา 6 ชั่วโมง บันทึกเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ และความยาวของ germ tube โดยสุ่มนับจาก 400 สปอร์

3. การทดสอบ bioassay ของสารสกัดจาก culture filtrate บนแผ่น Thin Layer Chromatography (TLC)

เตรียมสารสกัด culture filtrate ตามวิธีการของ Chirawut (2005) และ load สารสกัดบนแผ่น TLC จากนั้นนำมา run ใน mobile phase (dichloromethane : methanol, 49 : 1 v/v) พ่น spore suspension ของเชื้อรา *Cladosporium oxysporum* ซึ่งเป็น indicator fungus (สปอร์มีสีเข้ม ทำให้เห็นบริเวณยับยั้งชัดเจนกว่าการใช้เชื้อรา *C. musae*) ลงบนแผ่น TLC บ่มไว้ในกล่องพลาสติกชื้นเป็นเวลา 3 วัน และฆ่าเชื้อด้วยแสง UV เป็นเวลา 30 นาที คำนวณค่า retention factor (R_f) ของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) จากสูตรดังนี้ $R_f = \frac{\text{ระยะทางเคลื่อนที่ของสารออกฤทธิ์}}{\text{ระยะทางเคลื่อนที่ของตัวทำละลาย}}$

ผล

จากการนำ culture filtrate ของเชื้อรา 4 ชนิดมาควบคุมโรคแอนแทรคโนสของกล้วยหอมทอง พบว่า culture filtrate ของเชื้อรา *Phomopsis* WYJ1 สามารถลดความรุนแรงของโรคได้มากที่สุดถึง 75.0% รองลงมาคือ culture filtrate ของเชื้อรา *Rhizoctonia* DSW1 และ *Phomopsis* 07 โดยสามารถลดความรุนแรงของโรคได้ 44.9 และ 38.6% ตามลำดับ (Table 1) และ culture filtrate ของเชื้อรา *Phomopsis* WYJ1 ยังสามารถลดการงอกของสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรคได้สูงที่สุดถึง 19.4% (Table 2) และลดความยาวของ germ tube ได้ 46.6% (Table 3) ยิ่งไปกว่านั้น สารสกัดจาก culture filtrate ของเชื้อรา *Phomopsis* WYJ1 ได้แสดงบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) การเจริญของเชื้อรา *Cladosporium oxysporum* เป็นบริเวณกว้าง ตั้งแต่ retention factor (R_f) ที่ 0.08 – 0.96 บนแผ่น TLC (Figure 1) นั่นแสดงถึงใน culture filtrate ของเชื้อราน่าจะมีสารประกอบที่มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคได้มากกว่า 1 ชนิด

Table 1 Comparing efficiency of four culture filtrates of selected fungi on controlling anthracnose disease of banana caused by *Colletotrichum musae*

Fungal culture filtrates	Disease severity (%)	Reduction of disease severity (%)
Half PDB (control)	23.6	-
Phomopsis WYJ1	5.9	75.0 a[1]
Phomopsis 07	14.5	38.6 bc
Phomopsis C13	16.4	30.5 c
Rhizoctonia DSW1	13.0	44.9 b

[1] Means followed by different letters are significant difference (*P*=0.05), according to DMRT

CV = 0.43%

Table 2 Efficacy of four fungal culture filtrates on water agar inhibition of spore germination of *Colletotrichum musae*

Fungal culture filtrates	Spore germination (%)	Reduction of spore germination (%)
Half PDB (control)	89.0	-
Phomopsis WYJ1	71.7	19.4 a[1]
Phomopsis 07	85.7	3.7 c
Phomopsis C13	82.0	7.9 b
Rhizoctonia DSW1	80.0	9.3 b

[1] Means followed by different letters are significant difference (*P*=0.05), according to DMRT

CV = 0.08%

Table 3 Efficacy of four fungal culture filtrates on reduction of germ tube elongation of *Colletotrichum musae*

Fungal culture filtrates	Germ tube elongation (μm)	Reduction of germ tube elongation (%)
Half PDB (control)	5.94	-
Phomopsis WYJ1	3.17	46.6 a[1]
Phomopsis 07	4.99	16.0 d
Phomopsis C13	4.13	30.5 b
Rhizoctonia DSW1	4.68	21.2 c

[1] Means followed by different letters are significant difference (*P*=0.05), according to DMRT

CV = 0.22%

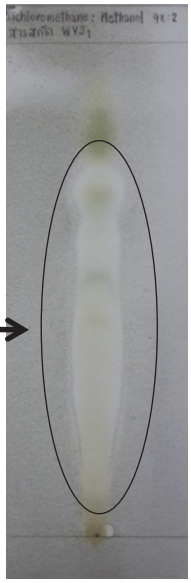

Figure 1 Wide range value of inhibition zone (circled) observed by spraying of indicator fungus *Cladosporium oxysporum* on crude extract of *Phomopsis* WYJ1culture filtrate (solvent system - dichloromethane : methanol, 98 : 2 v/v)

วิจารณ์ผล

Culture filtrate ของเชื้อราทั้ง 4 ชนิดสามารถลดความรุนแรงของโรคแอนแทรคโนสบนกล้วยหอมทองได้มากกว่า 30% โดยสารประกอบบางชนิดใน culture filtrate มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคได้โดยตรง ซึ่ง Adelin *et al.* (2011) และ Nithya and Muthumary (2011) รายงานว่าเชื้อรา *Phomopsis* spp. สามารถผลิตสารในกลุ่ม terpenes และ polyketides ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ สอดคล้องกับรายงานของ Chapla *et al.* (2014) ที่พบว่าเชื้อรา *Phomipsis* spp. ผลิตสารในกลุ่ม cytochalasin ที่มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของเชื้อราหลายชนิด โดยทั่วไปแล้ว culture filtrate ของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งๆ ที่สามารถลดการเกิดโรคในพืชได้นั้น มักจะมีส่วนประกอบของสารทุติยภูมิซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์มากกว่าหนึ่งชนิดเสมอ ดังเช่นจากรายงานของ Takesako *et al.* (1993) สารปฏิชีวนะที่ผลิตโดยเชื้อยีสต์ *Aureobasidium pullulans* คือ Aureobasidin A สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราได้หลายชนิด ซึ่งต่อมา Tongsri (2010) ได้รายงานว่าเชื้อยีสต์ดังกล่าวผลิตสารในกลุ่ม alkaloids คือ tryptophol มีคุณสมบัติยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสของกล้วยหอมได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งส่งผลให้สามารถลดความรุนแรงของโรคได้ถึง 80% แต่สารดังกล่าวไม่ค่อยมีความคงทนต่อความร้อน นอกจากนั้นใน culture filtrate จากจุลินทรีย์บางชนิด มักมีสารทุติยภูมิอีกกลุ่มหนึ่ง คือ เอนไซม์ เช่น chitinase หรือ glucanase ซึ่งช่วยย่อยผนังเซลล์ของเชื้อสาเหตุโรค จึงทำให้ลดความสามารถในการก่อโรคลงได้ (Chanchaichaovivat *et al.,* 2008) รวมทั้งสารบางชนิดใน culture filtrate มีคุณสมบัติในการควบคุมโรคพืชทางอ้อม โดยชักนำให้พืชเกิดความต้านทานต่อเชื้อ (Tongsri, 2010) ซึ่งจะได้ทำการถึงศึกษาคุณสมบัติอื่นๆ ของ culture filtrate และวิเคราะห์หาชนิดของสารออกฤทธิ์ รวมถึงพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืชต่อไป

สรุป

การทดสอบ culture filtrates จากเชื้อรา 4 ชนิด พบว่า *Phomopsis* WYJ1 สามารถยับยั้งการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนผลกล้วยหอมทองได้ดีที่สุด รวมทั้งสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์และการเจริญของ germ tube ของเชื้อรา *C. musae* ได้เป็นเปอร์เซ็นต์สูงกว่าชนิดอื่น และจากการแยกสารออกฤทธิ์ใน culture filtrate ของเชื้อราดังกล่าวด้วย TLC และพ่นสปอร์แขวนลอยของ *C. oxysporum* ปรากฏบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) เป็นบริเวณกว้าง ตั้งแต่ R_f ที่ 0.08-0.96

เอกสารอ้างอิง

Adelin, E., C. Servy and S. Cortial. 2011. Isolation, structure elucidation and biological activity of metabolites from Sch-642305-producing endophytic fungus *Phomopsis* sp. CMU-LMA Phytochemistry 72: 2406–2412.

Chanchaichaovivat, A., B. Panijpan and P. Ruenwongsa. 2008. Putative mode of action of *Pichia guilliermondii* strain R13 in controlling chilli anthracnose after harvest. Biol. Contr. 47: 207-215.

Chapla, V.M., M.L. Zeraik, V.F. Ximenes, L. M. Zanardi and M.N. Lopes. 2014. Bioactive secondary metabolites from *Phomopsis* sp., an endophytic fungus from *Senna spectabilis*. Molecules 19: 6597-6608.

Chirawut, B. 2005. Antifungal compounds and mechanism of resistance of mango peel against *Colletotrichum gloeosporioides*. Ph D. Thesis, Kasetsart University.

Haggag, W.M. and M.A. El Soud. 2012. Production and optimization of *Pseudomonas fluorescens* biomass and metabolites for biocontrol of strawberry grey mould. American Journal of Plant Sciences 3: 836-845.

Mishra, B.K., R.C. Mishra and A. Dikshit. 2011. Biocontrol efficacy of *Trichoderma viride* isolates against fungal plant pathogens causing disease in *Vigna radiata* L. Archives of Applied Science Research 3 (2):361-369.

Nithya, K. and J. Muthumary. 2011. Bioactive metabolite produced by *Phomopsis* sp., an endophytic fungus in *Allamanda cathartica* L. Recent Research in Science and Technology 3(3): 44-48.

Takesako, K., H. Kuroda, T. Inoue, F. Haruna, Y. Yoshikawa and I. Kato. 1993. Biological properties of Aureobasidin A, a cyclic depsipeptide antifungal antibiotic. J. Antibiot. 46: 1414-1420.

Tongsri, V. 2010. Effects of Secondary Metabolites of Some Yeasts on *Colletotrichum musae* and anthracnose disease on bananas cv. Hom Thong. Ph D. Thesis, Kasetsart University.

Tongsri, V. and S. Sangchote. 2009. Yeast metabolites inhibit banana anthracnose fungus *Colletotrichum musae*. As. J. Food Ag-Ind. Special Issue, S112-S118.