Agricultural Sci. J. 50 : 3 (Suppl.) : 155-158 (2019) ว. วิทย. กษ. 50 : 3 (พิเศษ) : 155-158 (2562)

ผลของสารเคมีกำจัดเชื้อรา azoxystrobin pyraclostrobin และ trifloxystrobin ร่วมกับ alternative oxidase inhibition ต่อเชื้อรา *Aspergillus* spp. จากกลีบกระเทียมเน่า

Effect of Azoxytrobin, Pyraclostrobin and Trifloxystrobin with Alternative Oxidase Inhibition on *Aspergillus* spp. from Garlic Cloves Rot

พรประพา คงตระกูล[1] กัญจน์ชญา ธงศิลา[1] และ พรรณิภา ยั่วยล[1]
Pornprapa Kongtragoul[1], Kanchaya Thongsila[1] and Pannipa Youryon[1]

Abstract

Cloves rot is a significant disease of garlic during storage. Eighteen isolates of *Aspergillus* spp. were obtained from garlic cloves rot which collected from fresh markets. This research aimed to effect of azoxystrobin (AZ), pyraclostrobin (PR), and trifloxystrobin (TF) at 0, 1, 10 and 100 mg/l of the active ingredient with salicylhydroxamic acid (SHAM) at 100 mg/l as the alternative oxidase (AOX) inhibitor measured by the 50% effective concentration (EC_{50}) to inhibit the mycelial growth by poison food technique. The results showed that six, one, and eight isolates had EC_{50} values at >100 mg/l of AZ, PR, and TR, respectively. Ten, thirteen, and two isolates showed the EC_{50} values at 1-100 mg/l of AZ, PR, and TR, respectively. Moreover, two, four, and eight isolates showed the EC_{50} values at <1 mg/l. All tested fungicides were effective for controlling the mycelial growth of *Aspergillus* spp. Therefore, it should be studied in the future.

Keywords: garlic disease, *Aspergillus* spp, azoxystrobin, pyraclostrobin, trifloxystrobin

บทคัดย่อ

กลีบเน่าเป็นอาการโรคที่สำคัญของกระเทียมในระหว่างการเก็บรักษา จากการเก็บตัวอย่างกลีบกระเทียมเน่าในตลาดสด มาทำการแยกเชื้อ พบเชื้อรา *Aspergillus* spp. จำนวน 18 ไอโซเลท จึงได้นำมาใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของสารป้องกันกำจัดเชื้อรา azoxystrobin (AZ) , pyraclostrobin (PR) และ trifloxystrobin (TF) ที่ระดับความเข้มข้น 0, 1, 10 และ 100 mg/l ร่วมกับ salicylhydroxamic acid (SHAM) ที่ระดับความเข้มข้น 100 mg/l ซึ่งเป็นสาร alternative oxidase (AOX) inhibitor โดยประเมินประสิทธิภาพของสารกำจัดเชื้อราจากค่าความเข้มข้นของสารเคมีแต่ละชนิดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตทางเส้นใยของเชื้อราได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (EC_{50}) โดยวิธี poison food technique ผลการทดลองปรากฏว่า 6 ไอโซเลท, 1 ไอโซเลท และ 8 ไอโซเลท แสดงค่า EC_{50} มากกว่า 100 mg/l ของสารป้องกันกำจัดเชื้อรา AZ, PR และ TR ตามลำดับ ทั้งนี้ 10 ไอโซเลท, 13 ไอโซเลท และ 2 ไอโซเลท แสดงค่า EC_{50} ที่ 1 ถึง100 mg/l ของสารป้องกันกำจัดเชื้อรา AZ, PR และ TR ตามลำดับ นอกจากนี้ 2 ไอโซเลท, 4 ไอโซเลท และ 8 ไอโซเลท แสดงค่า EC_{50} น้อยกว่า 1 mg/l ของสารป้องกันกำจัดเชื้อรา AZ, PR และ TR ตามลำดับ ทั้งนี้สารทั้ง 3 ชนิดมีประสิทธิภาพในการควบคุมการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *Aspergillus* spp. จึงควรมีการศึกษาต่อไป

คำสำคัญ: โรคกระเทียม, เชื้อรา *Aspergillus* spp., azoxystrobin, pyraclostrobin, trifloxystrobin

คำนำ

กระเทียม (*Allium sativum* L.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย ในปี 2559 มีพื้นที่เพาะปลูกประมาณ 64,527 ไร่ ผลผลิตประมาณ 67,554 ตัน มีการส่งออกกระเทียมในรูปแบบต่างๆ เช่น กระเทียมสดหรือแช่เย็น กระเทียมผง กระเทียมแห้ง และ กระเทียมสำหรับขยายพันธุ์ ปริมาณการส่งออก 1,316.33 ตัน เป็นมูลค่า 61.75 ล้านบาท มีประเทศคู่ค้าที่สำคัญคือ มาเลเซีย สิงค์โปร์ ลาว กัมพูชา จีน อินเดีย ฮ่องกง สวิตเซอร์แลนด์ ออสเตรเลีย อังกฤษ แคนนาดา และ เบลเยี่ยม เป็นต้น (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2560) ปัญหาหลักประการหนึ่งของผลผลิตกระเทียม คือ การปนเปื้อนของเชื้อราที่ก่อให้เกิดอาการกลีบกระเทียมเน่า เป็นปัญหาสำคัญหลังการเก็บเกี่ยวกระเทียมและระหว่างการเก็บรักษาโดยเฉพาะกระเทียม

[1]หลักสูตรพืชสวน ภาควิชาเทคโนโลยีการเกษตร, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง วิทยาเขตชุมพรเขตรอุดมศักดิ์ จังหวัดชุมพร 86160
[1]Horticulture Program, Department of Agriculture of Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang Prince of Chumphon Campus 86160

ที่จะนำไปใช้เพื่อการขยายพันธุ์ โดยเกิดจากเชื้อราที่ก่อให้เกิดอาการกลีบกระเทียมเน่า ได้แก่ เชื้อราในสกุล *Aspergillus* spp. *Penicillium* spp. *Fusarium* spp. และ *Botrytis allii* เป็นต้น (Schwartz and Mohan, 1995)

สำหรับประเทศไทยมีการนำเข้าสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราหลายชนิด เพราะเกษตรกรส่วนใหญ่เล็งเห็นความสำคัญของสารเคมีป้องกันกำจัดดังกล่าว เพราะเชื่อว่าเป็นวิธีที่สะดวก เห็นผลเร็วกว่าวิธีอื่น สำหรับสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรากลุ่ม Quinone outside inhibitor (QoI) ที่ขึ้นทะเบียนในประเทศไทย ได้แก่ azoxystrobin, pyraclostrobin, kresoxin-methyl, trifloxystrobin, famoxadone และ fenamidone (สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร, 2559) มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้หลายชนิด สารเคมีกำจัดเชื้อรากลุ่ม QoI ซึ่งเป็นสารชนิดดูดซึม (systemic fungicides) ที่มีกลไกทางชีวเคมีที่จำเพาะ (specific mechanism of biochemical action) และมีความเป็นพิษจำเพาะเจาะจงสูง (ธรรมศักดิ์, 2543) สารเคมีกลุ่มนี้จะเข้าขัดขวางกระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอนของกระบวนการหายใจซึ่งเกิดขึ้นในเยื่อหุ้มชั้นในของไมโทคอนเดรีย เป็นกระบวนการที่เกิดต่อเนื่องจากวัฏจักรเครบส์ แหล่งของอิเล็กตรอนคือ NADH และ $FADH_2$ ซึ่งเมื่อถูกออกซิไดซ์อิเล็กตรอนที่เกิดขึ้นจะถูกส่งต่อเป็นทอดๆ ผ่านตัวนำอิเล็กตรอนหลายตัว ไปจนถึงปลายสุดของระบบ อิเล็กตรอนจะไปรีดิวซ์ O_2 ให้เป็น H_2O การถ่ายทอดอิเล็กตรอนจะเกิดขึ้นเป็นทอดๆ ผ่านตัวนำ อิเล็กตรอนซึ่งเป็นกลุ่มของโปรตีน (ซึ่งหลายตัวเป็นเอนไซม์) และมีโคเอนไซม์ และโคแฟคเตอร์ หลายตัวรวมอยู่ด้วยกัน กลุ่มโปรตีนเหล่านี้ ได้แก่ complex I, II, III และ IV ฝังตัวอยู่บนเยื่อหุ้มชั้นในของไมโตคอนเดรีย โดยสารป้องกันกำจัดเชื้อรากลุ่ม QoI มีความจำเพาะเจาะจงบริเวณ Qo site ของ cytochrome *bc1* enzyme complex (complex III) (Ishii, 2006; Fungicide resistance action committee, 2016) โดยงานวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา azoxystrobin, pyraclostrobin และ trifloxystrobin ร่วมกับ salicylhydroxamic acid ต่อเชื้อรา *Aspergillus* spp. สาเหตุกลีบกระเทียมเน่า

อุปกรณ์และวิธีการ

1. แยกและเก็บรวบรวมเชื้อรา *Aspergillus* spp. สาเหตุโรคในกระเทียม

เก็บตัวอย่างกลีบกระเทียมที่แสดงอาการกลีบเน่า ทำการแยกเชื้อรา *Aspergillus* spp. ด้วยวิธี tissue transplanting technique โดยการตัดชิ้นส่วนกระเทียมที่เป็นโรคกับเนื้อเยื่อปกติให้มีขนาด ประมาณ 0.5x0.5 เซนติเมตร จากนั้นฆ่าเชื้อที่ผิวนอกของชิ้นส่วนกระเทียมด้วย sodium hypochlorite (10% Clorox) นาน 1-3 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ซับด้วยกระดาษปลอดเชื้อให้แห้งแล้วนำชิ้นส่วนกระเทียมวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ water agar เมื่อสังเกตเห็นเส้นใยเชื้อราเจริญออกมาใช้ cork borer ตัดเส้นใยบริเวณขอบโคโลนีย้ายวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar

2. ทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา azoxystrobin, pyraclostrobin และ trifloxystrobin

ทำการผสมสารกำจัดเชื้อราแต่ละชนิด azoxystrobin (AZ), pyraclostrobin (PR) และ trifloxystrobin (TF) (Table 1) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ให้ได้ระดับความเข้มข้น 1, 10, 100 mg/l และ ชุดควบคุม จำนวน 4 กรรมวิธี และทดสอบร่วมกับ salicylhydroxamic acid (SHAM) ที่ความเข้มข้น 100 mg/l ซึ่งเป็น alternative oxidase (AOX inhibition) และทำการย้ายชิ้นเชื้อ ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อตามกรรมวิธีต่างๆ จำนวน 4 ซ้ำ บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องจนชุดควบคุมเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเชื้อรา คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใย เพื่อเปรียบเทียบลักษณะโคโลนีกับชุดควบคุมที่ไม่ได้ผสมสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา นำผลการทดลองมาแสดงกราฟความสัมพันธ์เชิงเส้น โดยให้แกน X เป็นค่า log ของความเข้มข้นของสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราที่ใช้ทดสอบ และแกน Y เป็นค่าเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา จากนั้นแทนค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโต จะได้ค่าความเข้มข้น นำมาหาค่า antilog จะได้ความเข้มข้นของสารเคมีที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ตามสมการ $Y = a \ln(X) + b$ (Y = เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา, X = ความเข้มข้นของสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา) โดยนำค่า EC_{50} ที่คำนวณได้จากสมการดังกล่าว ประเมินประสิทธิภาพของสารเคมีดังกล่าวแต่ละชนิด

Table 1 Details of fungicides for controlling *Aspergillus* spp. in this study.

Chemical name	Chemical type	Trade name	Manufacture	Distribution in plant	Active Ingredient
azoxystrobin	methoxyacrylate	Amistar	Syngenta	systemic	25% W/V
pyraclostrobin	methoxycarbamate	Headline	BASF Espanola S.L., Spain	systemic	25% W/V
trifloxystrobin	oximinoacetate	Flint	Bayer cropscience	systemic	50% W/V

ผล

1. รวบรวมเชื้อรา *Aspergillus* spp. สาเหตุโรคกลีบเน่าของกระเทียม

จากตัวอย่างกลีบกระเทียมเน่ามีเชื้อราสีดำขึ้นเป็นกลุ่มบนกลีบของกระเทียม เนื้อเยื่อที่ราขึ้นจะเน่าเปื่อยและขยายวงกว้างขึ้นเรื่อยๆ (Figure 1) แยกเชื้อราได้ จำนวน 18 ไอโซเลท ศึกษาลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบ เส้นใยใสไม่มีสี มีก้านชูสปอร์ยาว ต่อกับ conidial head ส่วนปลายโป่งออกเป็น vesicle เป็นที่เกิดของ sterigmata สปอร์มีลักษณะกลมสีดำ จากลักษณะดังกล่าวสามารถจำแนกได้ว่าเป็นเชื้อรา *Aspergillus* spp. (Figure 1)

Figure 1 Symptoms of garlic cloves rot.

2. ประสิทธิภาพของสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา azoxystrobin, pyraclostrobin และ trifloxystrobin

จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารป้องกันกำจัดเชื้อรา AZ, PR และ TF ร่วมกับ SHAM ต่อการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *Aspergillus* spp. จำนวน 18 ไอโซเลท พบว่าเชื้อราตอบสนองต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราที่ค่าความเข้มข้นของสารเคมีที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (EC_{50}) น้อยกว่า 1 mg/l คือ azoxystrobin จำนวน 2 ไอโซเลท, pyraclostrobin จำนวน 4 ไอโซเลท และ trifloxystrobin จำนวน 8 ไอโซเลท ทั้งนี้ แสดงค่า EC_{50} ที่ 1 ถึง 100 mg/l ของสารป้องกันกำจัดเชื้อรา AZ, PR และ TR จำนวน 10 ไอโซเลท, 13 ไอโซเลท และ 2 ไอโซเลท ตามลำดับ นอกจากนี้ แสดงค่า EC_{50} มากกว่า 100 mg/l จำนวน 6 ไอโซเลท, 1 ไอโซเลท และ 8 ไอโซเลท ของสารป้องกันกำจัดเชื้อรา AZ, PR และ TR ตามลำดับ ทั้งนี้พบว่าเชื้อรา *Aspergillus* spp. ทุกไอโซเลทตอบสนองต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราทั้ง 3 ชนิดโดยไม่ผสมร่วมกับ SHAM มีค่า EC_{50} มากกว่า 100 mg/l (Table 1) ทั้งนี้การศึกษาสารป้องกันกำจัดเชื้อราทั้ง 3 ชนิด ร่วมกับ SHAM ต่อการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *Aspergillus* spp. ในสภาพห้องปฏิบัติการ ควรมีการศึกษาต่อไป

Table 1 Fifty percent effective concentration of azoxystrobin, pyraclostrobin and trifloxystrobin on mycelium growth of *Aspergillus* spp. causing garlic clove rot.

Isolate code	EC_{50} (mg/l)					
	Azoxystrobin		Pyraclostrobin		Trifloxystrobin	
	-SHAM	+SHAM	-SHAM	+SHAM	-SHAM	+SHAM
AG_RP001	>100	>100	>100	13.40	>100	>100
AG_RP002	>100	10.43	>100	5.91	>100	>100
AG_CP003	>100	6.79	>100	40.01	>100	<1
AG_CP004	>100	12.52	>100	1.36	>100	4.08
AG_CP005	>100	10.80	>100	<1	>100	<1
AG_CP006	>100	27.37	>100	<1	>100	>100
AG_CP007	>100	3.82	>100	10.49	>100	<1
AG_CP008	>100	24.98	>100	8.72	>100	<1
AG_CP009	>100	>100	>100	12.40	>100	<1
AG_CP010	>100	<1	>100	<1	>100	<1
AG_CP011	>100	<1	>100	1.64	>100	<1
AG_CC012	>100	>100	>100	10.35	>100	>100
AG_CC013	>100	>100	>100	7.95	>100	60.50
AG_CC014	>100	36.42	>100	6.90	>100	>100
AG_CC015	>100	>100	>100	>100	>100	>100
AG_PBC016	>100	15.65	>100	<1	>100	<1
AG_PBC017	>100	72.09	>100	21.78	>100	>100
AG_CPM018	>100	>100	>100	12.75	>100	>100

วิจารณ์ผล

เชื้อรา *Aspergillus* spp. เป็นสาเหตุหนึ่งของกลีบกระเทียมเน่า ตรงตามรายงานของ Raper and Funnell (1965); Torres *et al.* (1980) และจากการทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา azoxystrobin, pyraclostrobin และ trifloxystrobin ต่อเชื้อรา *Aspergillus* spp. พบว่าสารเคมีทั้งสามชนิดมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อราสอดคล้องกับงานทดลองของ Wong *et al.* (2007) ทำการศึกษาประสิทธิภาพของสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา axoystrobin ต่อเชื้อรา *Colletotrichum cereale* พบว่า มีค่า ED_{50} ตั้งแต่ 0.0040 ถึง 0.0047 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทั้งนี้ Li-hua *et al.* (2009) ทำการศึกษาฤทธิ์ของ azoxystrobin ร่วมกับ SHAM ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum capsici, Botrytis cinerea, Rhizoctonia solani* และ *Magnaporthe grisea* พบว่าในกรรมวิธีที่ผสม SHAM ร่วมกับสารเคมีดังกล่าวสามารถเพิ่มประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญเติบโตทางเส้นใยได้เพิ่มขึ้น และสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ได้เช่นกัน ทั้งนี้เพราะ SHAM จะช่วยเพิ่มการยับยั้งร่วมกับ azoxystrobin ต่อขบวนการใช้ออกซิเจนของเส้นใย โดยพบว่า azoxystrobin ยับยั้งการหายใจของเชื้อราทั้ง 4 ชนิดในระยะแรก อย่างไรก็ตามเมื่อเวลาผ่านไป เชื้อราที่ได้รับสาร azoxystrobin จะมีการเจริญเติบโตต่อไป และ เมื่อผสม SHAM จะสามารถยับยั้งกระบวนการหายใจได้ เช่นเดียวกับ Burnett *et al.* (2010) ได้ศึกษาผลของสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา azoxystrobin, pyraclostrobin และ trifloxystrobin ต่อการเจริญของเชื้อ *Monilinia fructicora* พบว่า สารทั้งสามชนิดสามารถลดการเกิดโรคผลเน่าของผลพีชได้

สรุป

สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรากลุ่ม Quinone outside inhibitor (QoI) ทั้งสามชนิด คือ azoxystrobin, pyraclostrobin และ trifloxystrobin สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตทางเส้นใยของเชื้อรา *Aspergillus* spp. ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้นระหว่าง 1 ถึง 100 mg/l มีประสิทธิภาพดี

คำขอบคุณ

ขอขอบพระคุณสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง วิทยาเขตชุมพรเขตรอุดมศักดิ์ จังหวัดชุมพร ที่สนับสนุน การทำงานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วง

เอกสารอ้างอิง

ธรรมศักดิ์ สมมาตย์. 2543. สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืชสำหรับประชาชน. สำนักพิมพ์รั้วเขียว. กรุงเทพฯ. 101 น.

สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร. 2559. ทะเบียนวัตถุอันตรายทางการเกษตร. กรมวิชาการเกษตร (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล: https://www.egov.go.th/th/government-agency/228/. (11 มิถุนายน 2560).

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2560. ปริมาณและมูลค่าการนำเข้าสารกำจัดศัตรูพืช. กรมวิชาการเกษตร (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล: http://www.oae.go.th/economicdata/pesticides.html (11 มิถุนายน 2560).

Burnett, A.L., N. Lalancette and K.A. McFarland. 2010. Effect of QoI fungicides on colonization and sporulation of *Monilinia fructicola*on peach fruit and blossom blight cankers. Plant Disease 94: 1000-1008.

Fungicide resistance action committee. 2016. Fungicides sorted mode of action including Fungicide resistance action committee code cumbering. [Online]. Available: http://manatee.ifas.ufl.edu/lawn_and_garden/master.../frac-code-list.pdf. (11 June 2018).

Ishii, H. 2006. Impact of fungicide resistance in plant pathogens on crop disease control and agricultural environment. Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ. 40: 205-211.

Li-hua, J., C. Yu, C. Chang-jun, W. Jian-xin and Z. Ming-guo. 2009. Activity of azoxystrobin and SHAM to four phytopathogens. Agricultural Sciences in China 8(7): 835-842.

Raper, K. B. and D. J. Fennell. 1965. The genus *Aspergillus*. Baltimore: Williams & Wikins Company. 686 p.

Schwartz, H.F. and S.K. Mohan. 1995. Compendium of onion and garlic diseases. Minnesota: APS Press, St. Paul. 54 p.

Torres, J. 1980. Morphological changes in strains of *Aspergillus flavus* Link ex Fries and *Aspergillus parasiticus* spears related with aflatoxin production. Mycopathologia 72: 171-174.

Wong, F. P., S. L. Midland and K. A. de la Cerda. 2007. Occurrence and distribution of QoI-resistant isolates of *Colletotrichum cereale* from annual bluegrass in California. Plant Disease 91:1536-1546.