Agricultural Sci. J. 41 : 1 (Suppl.) : 299-302 (2010) ว. วิทย. กษ. 41 : 1 (พิเศษ) : 299-302 (2553)

การทดสอบ casein hydrolysis เพื่อจำแนก species ของ *Colletotrichum* สาเหตุโรคแอนแทรคโนส

Casein Hydrolysis Test for Species Identification of *Colletotrichum* Causing Chilli Antracnose

วรานันท์ วิญญูรัตน์[1], **รัติยา พงศ์พิสุทธา**[1] **และ ชัยณรงค์ รัตนกรีฑากุล**[1]
Waranun Winyarat[1], Ratiya Pongpisutta[1] and Chainarong Rattanakreetakul[1]

Abstract

One hundred and seventy isolates of *Colletotrichum* causing chilli antracnose collected from Chiang Rai, Nakhon Pathom, Nakhon Sawan, Nakhon Si Thammarat, Prachuap Khiri Khan, Phitsanulok, Sukhothai and Si Sa Ket were examined. Thirty-nine isolates were recognized as *C. acutatum* while sixty-eight and sixty-three isolates were identified as *C. capsici* and *C. gloesporioides*, respectively. All isolates were grown on casein hydrolysis medium (CHM) under alternating lighting condition of 12 hr black light/12 hr dark at 26°C for 4 days, then clear zone was assessed. *C. acutatum* displayed the greatest clear zone in a range of 6.3-15.6 mm. However, *C. gloesporioides* grew with clear zone at 0.9-9.6 mm. Of the *C. capsici* isolates showed a range of clear zone from 0 to 6.7 mm. This research supported species identification of *Colletotrichum* causing anthracnose disease of vegetables and fruits.

Key word: Casein hydrolysis, *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum gloesporioides* , *Colletotrichum capsici,* Identification

บทคัดย่อ

ศึกษาเชื้อรา *Colletotrichum* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก จำนวน 170 ไอโซเลท ซึ่งสำรวจจากแหล่งปลูกพริกในจังหวัดเชียงราย นครปฐม นครสวรรค์ นครศรีธรรมราช ประจวบคีรีขันธ์ พิษณุโลก สุโขทัย และศรีสะเกษ โดยจำแนกเป็น *C. acutatum* จำนวน 39 ไอโซเลท ขณะที่ *C. capsici* และ *C. gloesporioides* พบจำนวน 68 และ 63 ไอโซเลท ตามลำดับ นำเชื้อรา *Colletotrichum* ทั้งหมดมาทดสอบบนอาหาร Casein hydrolysis medium (CHM) ภายใต้แสง black light 12 ชั่วโมง สลับกับความมืด 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส นาน 4 วัน บันทึก clear zone พบว่าเชื้อรา *C. acutatum* สร้าง clear zone ได้ชัดเจนที่สุดคือ มีขนาดระหว่าง 6.3-15.6 มิลลิเมตร ส่วน *C. gloesporioides* มีขนาด 0.9-9.6 มิลลิเมตร สำหรับ *C. capsici* นั้นขนาดของ clear zone อยู่ระหว่าง 0-6.7 มิลลิเมตร งานวิจัยนี้เป็นวิธีหนึ่งที่ใช้สนับสนุนการตรวจสอบสปีชีส์ของเชื้อรา *Colletotrichum* ที่เป็นสาเหตุโรคแอนแทรคโนสของผักและผลไม้ได้

คำสำคัญ Casein hydrolysis, *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum capsici, Colletotrichum gloesporioides*, การจัดจำแนก

คำนำ

พริก (chili, pepper) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย แหล่งปลูกพริกที่สำคัญอยู่ในหลายพื้นที่ของประเทศ (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2549) ปัญหาที่สำคัญในการปลูกพริกคือเรื่องโรคและแมลง โรคที่สำคัญและทำให้เกิดความเสียหายกับผลผลิตพริกมากที่สุดคือ โรคแอนแทรคโนส ซึ่งเกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สามารถเข้าทำลายผลพริกได้ทุกระยะและเกิดขึ้นได้ทั้งก่อนและหลังเก็บเกี่ยวผลผลิต (บุญญวดี, 2540) ในประเทศไทยพบเชื้อรานี้ 3 สปีชีส์ คือ *C. acutatum*, *C. capsici* และ *C. gloesporioides* (ธารทิพย์ และคณะ, 2548) เนื่องจากเชื้อรา *Colletotrichum* spp. มีความผันแปรทางพันธุกรรมสูง ทำให้การจำแนกสปีชีส์โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ทั้งลักษณะโคโลนี และรูปร่างของสปอร์ค่อนข้างยุ่งยากสับสน เนื่องจากลักษณะใกล้เคียงกันมาก งานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. บนอาหาร CHM เพื่อใช้เป็นเครื่องมือที่จะช่วยในการจัดจำแนกอีกหนทางหนึ่ง

[1] ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ นครปฐม 73140
[1] Department of Plant Pathology at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Nakhon Pathom 73140

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างจากแหล่งปลูกเพื่อนำมาแยกเชื้อ และศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อสาเหตุ

เก็บตัวอย่างจากแหล่งปลูกพริก 8 จังหวัด คือจังหวัดเชียงราย, นครปฐม, นครสวรรค์, นครศรีธรรมราช, ประจวบคีรีขันธ์, พิษณุโลก, สุโขทัย และศรีสะเกษ โดยเก็บผลพริกที่มีอาการของโรคแอนแทรคโนส แยกเชื้อจากผลพริก โดยใช้ chlorox 1.5% ฆ่าเชื้อที่ผิวพืชและล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ นำชิ้นส่วนพืชวางบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) บ่มเชื้อ ภายใต้แสง black light เป็นเวลา 12 ชั่วโมงสลับกับความมืด 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน เมื่อเชื้อราสร้างกลุ่มของสปอร์ (conidial mass) จึงนำมาแยกเป็นสปอร์เดี่ยวโดยวิธี single spore isolation บนอาหาร water agar (WA)

การศึกษาการจัดจำแนกสปีชีส์ ทำโดยนำเชื้อรา *Colletotrichum* ที่มีอายุ 5 วัน เลี้ยงบนอาหาร PDA ภายใต้แสง black light เป็นเวลา 12 ชั่วโมงสลับกับความมืด 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน บันทึกโครงสร้างของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2. ศึกษาเชื้อรา *Colletotrichum* spp. บนอาหาร CHM

เลี้ยงเชื้อราทั้ง 170 ไอโซเลท บนอาหาร PDA มีอายุ 5 วัน จากนั้นย้ายเชื้อมาทดสอบบนอาหาร CHM ภายใต้แสง black light เป็นเวลา 12 ชั่วโมงสลับกับความมืด 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ทดลองจำนวน 5 ซ้ำ บันทึกผลการทดลองโดยวัดขนาดของ clear zone

ผล

1. การเก็บตัวอย่างจากแหล่งปลูกเพื่อนำมาแยกเชื้อ และศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อสาเหตุ

แยกเชื้อรา *Colletotrichum* จำนวน 170 ไอโซเลท อาศัยลักษณะโคโลนี และลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราตามวิธีการของ Sutton (1980) สามารถจำแนกเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสได้ดังนี้คือ พบเป็น *C. capsici* จำนวน 68 ไอโซเลท ส่วน *C. gloeosporioides* และ *C. acutatum* พบจำนวน 63 และ 39 ไอโซเลท ตามลำดับ

2. ศึกษาเชื้อรา *Colletotrichum* spp. บนอาหาร Casein hydrolysis medium (CHM)

พบว่าเชื้อรา *C. acutatum* มีการสร้างส่วนของ clear zone กว้างที่สุด (Figure 1) มีช่วงระหว่าง 6.3-15.6 มิลลิเมตร และ *C. gloeosporioides* มีช่วงระหว่าง 0.9-9.6 มิลลิเมตร ส่วน *C. capsici* อยู่ระหว่าง 0-6.7 มิลลิเมตร (Table 1) สำหรับเชื้อรา *C. acutatum* นั้น พบว่าไอโซเลทที่แยกจากจังหวัดนครปฐมมีพื้นที่ clear zone กว้างกว่าไอโซเลทที่แยกมาจากจังหวัดเชียงราย โดยมีค่าเฉลี่ย 11.9 มิลลิเมตร ส่วน *C. capsici* ในเขตจังหวัดประจวบคีรีขันธ์และนครสวรรค์มีค่าเฉลี่ยการสร้าง clear zone 2.2 และ 2.1 มิลลิเมตร ตามลำดับ ส่วนไอโซเลทที่แยกจากจังหวัดนครปฐมนั้นพบค่าเฉลี่ยเพียง 1.4 มิลลิเมตร เท่านั้น สำหรับเชื้อรา *C. gloeosporioides* นั้น ไอโซเลทจากจังหวัดพิษณุโลกแสดงค่าเฉลี่ยได้สูงสุดคือ 6.9 มิลลิเมตร (Table 1)

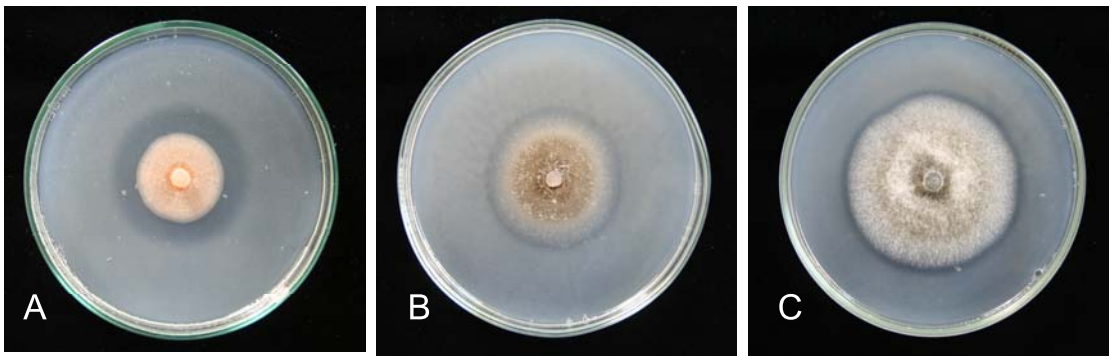

Figure1 Clear zone was produced on casein hydrolysis medium, *Colletotrichum acutatum* (**A**), *Colletotrichum capsici* (**B**) and *Colletotrichum gloesporioides* (**C**)

Table 1 Clear zone of *Colletotrichum* spp. tested on casein hydrolysis medium at day 4 which incubated at 26°C under black light for 12 hr.

Plantation Area	Clear zone size (mm)		
	C. acutatum	*C. capsici*	*C. gloeosporioides*
Chiang Rai	8.4-11.8 (10.1)	-	1.6
Nakhon Pathom	6.3-15.6 (11.9)	0.0-2.2 (1.4)	1.0-6.0 (2.5)
Nakhon Sawan	-	1.5-2.4 (2.1)	2.7-9.3 (6.6)
Nakhon Si Thummarat	-	1.0-3.5 (1.8)	-
Prachuap khiri Khun	-	1.4-6.7 (2.2)	1.4-6.9 (4.2)
Phitsanulok	-	2.5	3.3-9.6 (6.9)
Sukhothai	-	-	0.9-4.9 (3.1)
Si Sa Ket	-	1.1-2.5 (2.0)	1.5-2.6 (2.0)
Range (minimum-maximum)	6.3-15.6	0.0-6.7	0.9-9.6

(….) = Mean of clear zone of each species and location

วิจารณ์และสรุป

จากผลการทดลองพบว่าเมื่อนำเชื้อรา *Colletotrichum* spp. มาเลี้ยงบนอาหาร CHM บ่มเชื้อไว้ 4 วัน ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส เชื้อราแต่ละสปีชีส์สามารถสร้าง clear zone ให้เห็นความแตกต่างได้ค่อนข้างชัดเจน ทำให้สามารถนำข้อมูลที่ได้มาสนับสนุนการจัดจำแนกเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ทั้ง 3 สปีชีส์ ได้ โดยพบว่า *C. acutatum* มีความสามารถในการสร้าง clear zone ได้ชัดเจนและกว้างที่สุดคือ มีขนาดระหว่าง 6.3-15.6 มิลลิเมตร รองลงมาคือ *C. gloesporioides* มีขนาดระหว่าง 0.9-9.6 มิลลิเมตร ส่วน *C. capsici* มีขนาดของ clear zone อยู่ระหว่าง 0-6.7 มิลลิเมตร อย่างไรก็ตามในบางไอโซเลทของเชื้อรา *C. gloeosporioides* สร้าง clear zone ได้มากกว่า 6.0 มิลลิเมตร ซึ่งพบจำนวน 17 ไอโซเลท ได้แก่ NKP054-2,NKS137, NKS141, NKS144, NKS147, NKS150, PKK068, PKK075, PKK077, PKK084,PSL076, PSL106, PSL107, PSL113, PSL115, PSL076126, และ PSL131 คิดเป็น 27 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนไอโซเลททั้งหมดของสปีชีส์นี้ที่นำมาทดสอบ ทั้งนี้อาจเกิดจากเชื้อรา *C. gloeosporioides* นั้นมีความหลากหลายและมีความผันแปรทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง ในขณะที่เชื้อรา *C. capsici* พบเพียง 1 ไอโซเลท คิดเป็น 1.47 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนไอโซเลทของ C. capsici ที่ทดสอบ

การเลี้ยงเชื้อรา *Colletotrichum* spp. บนอาหาร CHM และเกิดส่วนของ clear zone ขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากบนอาหาร casein hydrolysis medium มีองค์ประกอบของโปรตีนซึ่งพบได้ทั่วไปในนมและอยู่ในรูปของเกลือแคลเซียม จัดเป็นพวกฟอสโฟโปรตีนซึ่งโครงสร้างโมเลกุลของเคซีน ประกอบด้วยพันธะเปปไทด์ (peptide linkage) ที่มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ สารพวกเคซีนรวมทั้งเจลาตินมักถูกนำมาใช้ในการทดสอบกับเชื้อจุลินทรีย์ เมื่อถูกย่อยสลายโดยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ทำให้ส่วนใสปรากฏขึ้นรอบๆ โคโลนีแทนส่วนทึบแสง (McDade and Weaver, 1958) ในสภาพธรรมชาติจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น แบคทีเรีย เชื้อรา และแอคติโนมัยซิส สร้างเอนไซม์มาย่อยสลายโปรตีนได้ ประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ของเอนไซม์ที่สร้างเป็นประเภทเอนไซม์ไฮโดรไลติก และพบว่า 60 เปอร์เซ็นต์ในจำนวนนั้นเป็นเอนไซม์โปรทีเอส (Trevan, 1987) จากผลการทดลองครั้งนี้เป็นไปได้ว่าเชื้อรา *C. acutatum* อาจสร้างเอนไซม์ protease ได้มากกว่า *C. capsici* และ *C. gloeosporioides* จึงย่อยสลายส่วนของเคซีนได้ดีกว่า ทำให้เกิดการสร้าง clear zone ได้กว้างกว่า สิ่งที่น่าสนใจคือเอนไซม์ที่สร้างได้มากกว่านี้มีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรคที่เกิดขึ้นด้วยหรือไม่ สำหรับบางไอโซเลทของเชื้อรา *C. acutatum* มีการสร้างเส้นใยเจริญฟูบนผิวหน้าอาหาร ซึ่งอาจทำให้เกิดความสับสนกับลักษณะของ *C. gloeosporioides* ดังนั้นการทดสอบบนอาหาร CHM อาจจะช่วยสนับสนุนการจัดจำแนกให้ชัดเจนขึ้นได้อีกทางหนึ่ง โดยสามารถนำมาใช้ร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัย ขอขอบคุณ คุณนวรัตน์ อิ่มจิตร คุณโชติรส รอดเกตุ และคุณเทพพนม แสงเพลิง ที่ให้การช่วยเหลือในการทำงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2549. สถิติการปลูกตามชนิดพืช. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

ธารทิพย ภาสบุตร, กรรณิการ์ เพี้ยนภักตร์ และธนิตย์ ปล่องบรรจง. 2548. รวบรวมและจัดจำแนกชนิดเชื้อราสกุล *Colletotrichum* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของไม้ผลและพืชเศรษฐกิจ. กลุ่มวิจัยโรคพืช. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. กรุงเทพฯ.

บุญญวดี จิระวุฒิ. 2540. การทำให้เกิดโรคของเชื้อรา *Colletotrichum capsici* บนผลพริกและถ่ายทอดเชื้อจากผลที่เป็นโรคส่วนเมล็ดและต้นกล้า. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท.มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

McDade, J.J. and R.H. Weaver. 1958. Rapid methods for the detection of gelatin hydrolysis. J. Bacteriol. 77: 60-64.

Sutton, B.C. 1980. The Coelomycetes: Fungi Imperfecti with Pycnidia, Acervuli and Stromata. CMI. Kew Surrey, England. 696 p.

Trevan, M.D. 1987. Enzyme Production. *In* Biotechnology. The Biological Principles, (Indian ed.). Tata McGraw Hill Pub. Co., New Delhi, India. pp: 155-225.