

ฤทธิ์ต้านเชื้อราของ *Trichoderma asperellum* V76-14 ต่อเชื้อรา *Sclerotium* sp. สาเหตุโรครากและโคนเน่า

Antifungal Activity of *Trichoderma asperellum* V76-4 Against *Sclerotium* sp., the Causal Agent of Root and Stem

อนุรักษ์ สันป่าเป้า^{1*}, วิไลลักษณ์ แดงสุวรรณ¹ และ ปรีศนา วงศ์ล้อม²

Anurag Sunpapao^{1*}, Wilailuk Daengsuwan¹ and Prisana Wonglom²

บทคัดย่อ: งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราเอนโดไฟต์ *Trichoderma asperellum* V76-14 ต่อเชื้อ *Sclerotium* sp. LS01 และ SZ01 สาเหตุโรครากและโคนเน่าของพืชอาศัยหลายชนิด เชื้อ *T. asperellum* V76-14 ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Sclerotium* sp. LS01 และ SZ01 ได้ 79.05 และ 78.10 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ โดยกรรมวิธี dual culture เมื่อทดสอบการสร้างสารระเหยต้านเชื้อราพบว่าเชื้อ *T. asperellum* V76-14 ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Sclerotium* sp. LS01 และ SZ01 ได้ 33.89 และ 43.81 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับโดยกรรมวิธี volatile antifungal bioassay เมื่อวิเคราะห์สารระเหยด้วย GC/MS พบว่ามีสารสร้างสารระเหยต้านเชื้อรา phenylethyl alcohol จากการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์จากน้ำเลี้ยงเชื้อ *T. asperellum* V76-14 พบว่ามีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ chitinase และ β -1,3-glucanase เท่ากับ 0.05 และ 0.08 U/mL สูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเชื้อ *T. asperellum* V76-14 มีกลไกการแก่งแย่งแข่งขัน (competition) และกลไกยับยั้งและทำลาย (antibiosis) เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Sclerotium* sp. LS01 และ SZ01
คำสำคัญ: โรครากและโคนเน่า, กลไกการยับยั้งทำลาย, ฤทธิ์ต้านเชื้อรา, การแก่งแย่งแข่งขัน

ABSTRACT: The objective of this study was to test efficacy of endophytic *Trichoderma asperellum* V76-14 against root and stem rot disease pathogen *Sclerotium* sp. LS01 and SZ01. The *T. asperellum* V76-14 inhibited fungal growth of *Sclerotium* sp. LS01 and SZ01 with 79.05 and 78.10% respectively, by dual culture assay. Volatile antifungal compounds emitted from *T. asperellum* V76-14 suppressed fungal growth of *Sclerotium* sp. LS01 and SZ01 with 33.89 and 43.81% respectively, by volatile antifungal bioassay. GC/MS analysis revealed antifungal compound as phenylethyl alcohol. Activity of chitinase and β -1,3-glucanase in cell free culture filtrate showed 0.05 and 0.08 U/mL respectively, significantly higher than that of control. From this finding, *T. asperellum* V76-14 presented multifaceted action against *Sclerotium* sp. LS01 and SZ01 by competition and antibiosis.

Keywords: root and stem rot, antibiosis, antifungal activity, competition

¹ ภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90112

Department of Pest Management, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hatyai, Songkhla 90112

² สาขาวิชาพืชศาสตร์ คณะเทคโนโลยีและการพัฒนาชุมชน มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง จังหวัดพัทลุง 93120

Faculty of Technology and Community Development, Thaksin University, Pa Payom District, Phattalung 93120

* Corresponding author: anurag.su@psu.ac.th

บทนำ

โรครากและต้นเน่า (root and stem rot) สาเหตุจากเชื้อ *Sclerotium* sp. พบก่อให้เกิดความเสียหายต่อการปลูกพืชหลายชนิด เนื่องจากมีพืชอาศัยกว้าง เช่น พริก เมล่อน มะเขือเทศ และแตงโม (Faret al., 1989; Mullen, 2001) และส่งผลกระทบต่อระบบราก ทำให้โคนต้นเน่า หักพับและตาย เชื้อสาเหตุโรคอาศัยอยู่ในดิน และพบแพร่กระจายในสภาพอากาศที่ร้อนชื้น (Mullen 2001; Roberts 2003) ลักษณะเด่นของเชื้อสกุลนี้คือเส้นใยสีขาวฟู คล้ายปุยฝ้าย และสร้างเม็ดสเคลอโรเทียม (sclerotium) สีน้ำตาลคล้ายเมล็ดผักกาด การใช้สารเคมีกำจัดเชื้อสาเหตุโรคนั้นพบว่ามีประสิทธิภาพสูง อย่างไรก็ตามยังมีโครงสร้างสเคลอโรเทียมที่สามารถอยู่รอด ทำให้ต้องเพิ่มโปรแกรมการใช้สารเคมี และการใช้สารเคมีในปริมาณมากส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศน์ และทำให้เชื้อสาเหตุโรคต้านทานต่อสารกำจัดโรคพืช

การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีพบว่าเป็นอีกทางเลือกที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะการใช้เชื้อราเอนโดไฟต์ *Trichoderma* ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคหลายชนิดเนื่องจากเชื้อราเอนโดไฟต์ *Trichoderma* มีกลไกการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อสาเหตุโรคพืชหลากหลายเช่น กลไกการแก่งแย่งแข่งขัน (Elad et al., 1999) และกลไกการยับยั้งทำลาย (Xiao-Yan et al., 2006) จากรายงานของอรุณิชา (2561) ได้แยกเชื้อราเอนโดไฟต์จากปาล์มน้ำมันและได้ทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อ *Curvularia oryzae* พบว่าเชื้อราเอนโดไฟต์ *Trichoderma asperellum* V76-14 มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคและลดการเกิดโรคในสภาพเรือนทดลองได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบกลไกการต้านเชื้อราของเชื้อราเอนโดไฟต์ *T. asperellum* V76-14 ในการยับยั้งเชื้อ *Sclerotium* sp. สาเหตุโรครากและลำต้นเน่าของผักสลัด (LS01) และสละ (SZ01) ในห้องปฏิบัติการเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการคัดเลือกเชื้อเพื่อพัฒนาเป็นสูตรสำเร็จและชีวภัณฑ์ในการควบคุมโรครากและโคนเน่า

วิธีการศึกษา

เชื้อสาเหตุโรคและราเอนโดไฟต์ *T. asperellum* V76-14

เชื้อราสาเหตุโรครากเน่าและลำต้นเน่า *Sclerotium* sp. ไอโซเลท LS01 แยกได้จากผักสลัด ไอโซเลท SZ01 แยกได้จากสละ และเชื้อราเอนโดไฟต์ *T. asperellum* V76-14 ได้รับความอนุเคราะห์จาก Culture Collection of Pest Management คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ เลี้ยงเชื้อ *Sclerotium* sp. และ *T. asperellum* V76-14 บนอาหาร potato dextrose agar (PDA) เป็นระยะเวลา 3 วันก่อนนำไปทดลอง

การทดสอบการเป็นปฏิปักษ์เบื้องต้นด้วยกรรมวิธี dual culture

ทดสอบกลไกการแก่งแย่งแข่งขันของเชื้อราเอนโดไฟต์ *T. asperellum* V76-14 กับเชื้อ *Sclerotium* sp. บนอาหาร PDA โดยกรรมวิธี dual culture assay วางชิ้นวุ้นของเชื้อ *Sclerotium* sp. ห่างจากขอบจานเลี้ยงเชื้อ 2 cm และเชื้อ *T. asperellum* V76-14 วางฝั่งตรงกันข้ามห่างจากขอบจานเลี้ยงเชื้อ 2 cm ชูดควบคุมวางแค้ชิ้นวุ้นของ *Sclerotium* sp. บนอาหาร PDA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 5 วัน ทำการทดลองจำนวน 4 ซ้ำ วัดการเจริญของเชื้อ *Sclerotium* sp. และคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งโดยสูตร

$$\text{Percentage of inhibition} = [(R1-R2)/R1] \times 100$$

R1 = รัศมีโคโลนีของเชื้อสาเหตุโรคในกรรมวิธีควบคุมและ R2 = รัศมีโคโลนีของเชื้อสาเหตุโรคในกรรมวิธีทดสอบ

การทดสอบสารระเหยต้านเชื้อราจากเชื้อ *T. asperellum* V76-14 และการวิเคราะห์สารระเหยโดย GC/MS

ทดสอบประสิทธิภาพของสารระเหยที่ผลิตโดยเชื้อราเอนโดไฟต์ *T. asperellum* V76-14 ต่อการเจริญของเชื้อ *Sclerotium* sp. โดยกรรมวิธี volatile

antifungal bioassay (Dennis and Webster 1971) โดยวางชิ้นส่วนของเชื้อ *Sclerotium* sp. และเชื้อราเอนโดไฟต์ *T. asperellum* V76-14 ลงตรงกลางบนอาหาร PDA นำฝาจานเลี้ยงเชื้อออกและประกบส่วนจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารและชิ้นส่วนของเชื้อ *Sclerotium* sp. และเชื้อราเอนโดไฟต์ *T. asperellum* V76-14 พันด้วยพาราฟิล์ม ส่วนชุดควบคุมทำการประกบจานเลี้ยงเชื้อที่มีชิ้นส่วนของ *Sclerotium* sp. กับจานที่มีอาหาร PDA ทำการทดลอง 4 ซ้ำ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 5 วันวัดการเจริญของเชื้อ *Sclerotium* sp. และคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งโดยสูตร

Percentage of inhibition = $[(D1-D2)/D1] \times 100$

D1 = เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อสาเหตุโรคในกรรมวิธีควบคุมและ D2 = เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อสาเหตุโรคในกรรมวิธีทดสอบ

วิเคราะห์สารระเหยด้านเชื้อราที่ผลิตจากเชื้อราเอนโดไฟต์ *T. asperellum* V76-14 โดยเลี้ยงเชื้อราในหลอดเลี้ยงเชื้อแบบฝาเกลียวเป็นเวลา 7 วัน และสกัดโดยกรรมวิธี solid-phase microextraction วิเคราะห์สารระเหยโดย head space gas chromatography-mass spectrophotometry (GCMS)

การวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์

เลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟต์ *T. asperellum* V76-14 ในอาหารสูตร potato dextrose broth เป็นเวลา 7 วัน กรองอาหารเหลวโดยกระดาษกรองที่มีรูพรุนขนาด $0.45 \mu\text{m}$ จนได้น้ำเลี้ยงเชื้อ วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ chitinase และ β -1,3-glucanase ในน้ำเลี้ยงเชื้อโดยกรรมวิธี dinitrosalicylic acid (Miller 1959) โดยใช้ 1% colloidal chitin เป็นสารตั้งต้นของเอนไซม์ chitinase และ laminarin เป็นสารตั้งต้นของเอนไซม์ β -1,3-glucanase วัดปริมาณผลิตภัณฑ์น้ำตาลกลูโคส และ N-acetyl-D-glucosamine ที่ค่าความยาวคลื่น 550 และ 575 nm ตามลำดับ ทำการทดลองทั้งหมด 4 ซ้ำ วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติด้วย Duncan's multiple range test ที่ค่าความเชื่อมั่น 95%

ผลการศึกษาและวิจารณ์

เมื่อทดสอบการเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟต์ *T. asperellum* V76-14 และเชื้อสาเหตุโรค *Sclerotium* sp. บนอาหาร PDA โดยกรรมวิธี dual culture พบว่าเชื้อราเอนโดไฟต์ *T. asperellum* V76-14 เจริญได้เร็วกว่าเชื้อสาเหตุโรค (Fig.1) และมีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งเชื้อ *Sclerotium* sp. ไอโซเลท LS01 และ SZ01 ได้ 79.05% และ 73.10% ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเชื้อราเอนโดไฟต์ *T. asperellum* V76-14 มีกลไกการแก่งแย่งแข่งขันสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Sclerotium* sp. สาเหตุโรครากและลำต้นเน่าได้ สอดคล้องกับ Hirpara (2017) ซึ่งได้รายงานเชื้อ *Trichoderma* spp. มีกลไกการแก่งแย่งแข่งขันในด้านการใช้อาหารและพื้นที่ในการเจริญบนอาหาร PDA ได้

เมื่อทดสอบการสร้างสารระเหยด้านเชื้อราที่ปลดปล่อยจากเชื้อราเอนโดไฟต์ *T. asperellum* V76-14 ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Sclerotium* sp. โดยกรรมวิธี volatile antifungal bioassay พบว่าสารระเหยที่ปลดปล่อยจากเชื้อราเอนโดไฟต์ *T. asperellum* V76-14 ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อ *Sclerotium* sp. ไอโซเลท LS01 และ SZ01 ได้ 33.89% และ 43.81% ตามลำดับ (Fig.2) เมื่อวิเคราะห์สารที่ระเหยออกมาจากเชื้อเอนโดไฟต์ *T. asperellum* V76-14 ด้วย HS GC/MS พบว่าเป็นสารกลุ่มแอลกอฮอล์ชนิด phenylethyl alcohol (Fig.3) โดยสารระเหยชนิดนี้มีรายงานว่าเป็นสารระเหยด้านเชื้อรา (Angel et al., 2016)

เมื่อวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่เชื้อราเอนโดไฟต์ *T. asperellum* V76-14 สร้างและปลดปล่อยออกมาในน้ำเลี้ยงเชื้อ พบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์ chitinase และ β -1,3-glucanase เท่ากับ 0.05 และ 0.08 U mL^{-1} ตามลำดับ ซึ่งมีค่าสูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญที่ค่าความเชื่อมั่น 95% องค์ประกอบผนังเซลล์ของเชื้อราส่วนมากเป็นสารกลุ่ม chitin และ β -1,3-glucan (Lorito et al., 1994) เอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ในกลุ่ม chitinase และ β -1,3-glucanase

มีรายงานว่าเอนไซม์หลักในกลไกยับยั้งและทำลาย (antibiosis) เชื้อสาเหตุโรคพืชหลายชนิด (Kubicek et al., 2001) แสดงให้เห็นว่ากิจกรรมของเอนไซม์

ทั้ง 2 ชนิดนี้ในเชื้อราเอนโดไฟต์ *T. asperellum* V76-14 เกี่ยวข้องกับการยับยั้งและทำลายเชื้อสาเหตุโรค *Sclerotium* sp. ไอโซเลท LS01 และ SZ01

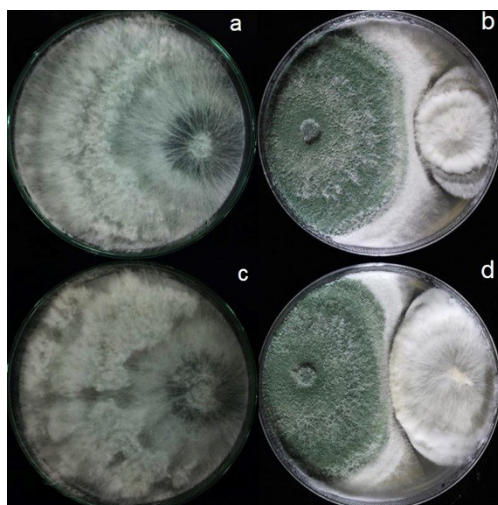


Fig.1 Antifungal activity of *Trichoderma asperellum* V76-14 against *Sclerotium* sp. by dual culture assay, a: *Sclerotium* sp. LS01, b: *T. asperellum* V76-14 and *Sclerotium* sp. LS01, c: *Sclerotium* sp. SZ01 and d: *T. asperellum* V76-14 and *Sclerotium* sp. SZ01

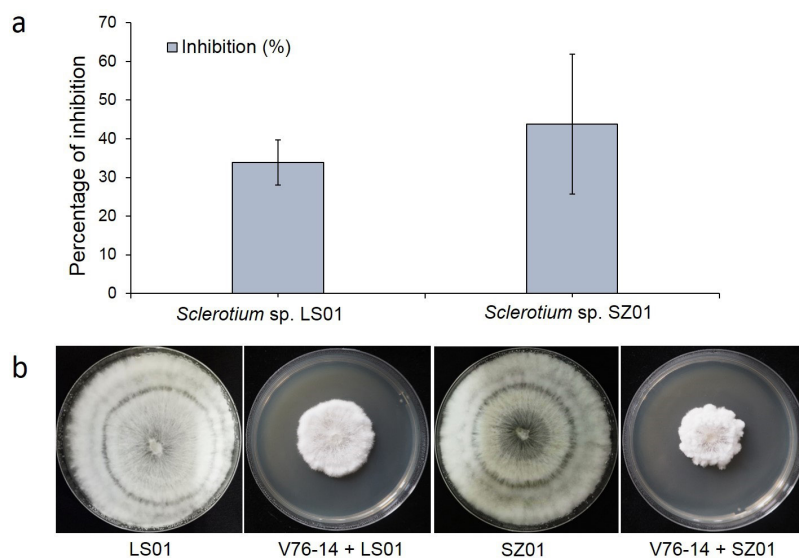


Fig.2 Effect of volatile emitted from *Trichoderma asperellum* V76-14 against *Sclerotium* sp. by volatile antifungal bioassay, a: percentage of inhibition and b: inhibition of fungal colony.

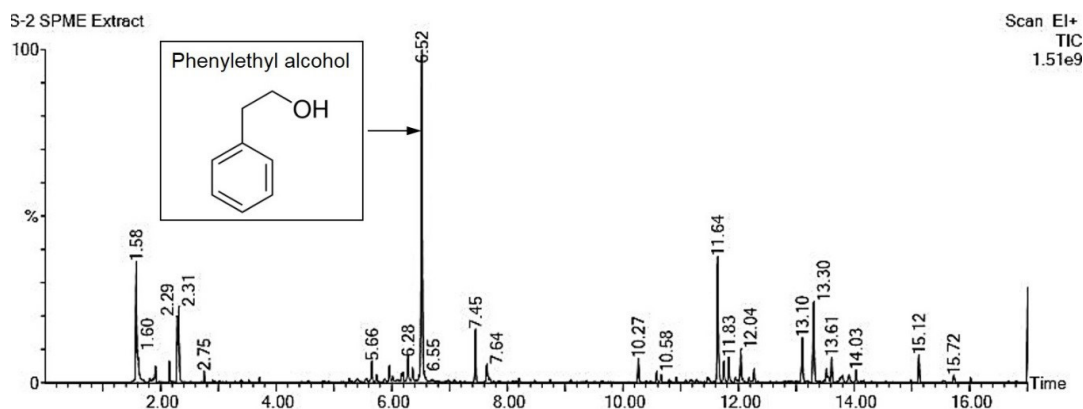


Fig.3 Detection of volatile antifungal compounds emitted by *Trichoderma asperellum* V76-14 shows phenylethyl alcohol and its structure.

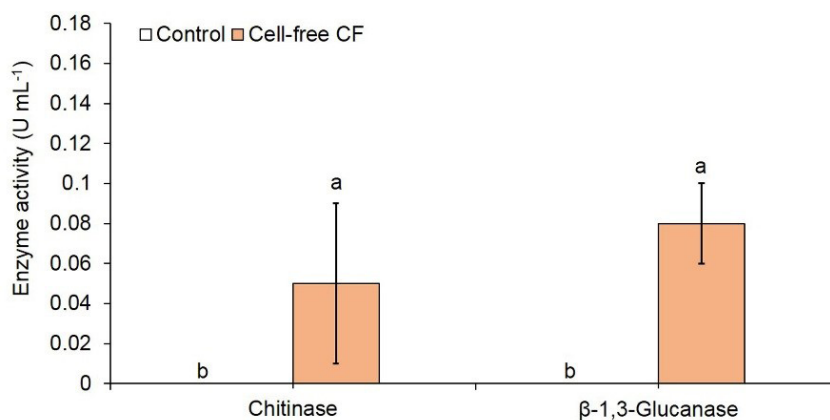


Fig.4 Activity of cell wall-degrading enzymes in cell-free culture filtrate of *Trichoderma asperellum* V76-14. Mean from 4 replications, the same letters are not significantly different according to Duncan's multiple range test ($p > 0.05$).

สรุป

จากผลการทดลองเชื้อราเอนโดไฟต์ *T. asperellum* V76-14 มีกลไกการต้านเชื้อราประกอบด้วย การแก่งแย่งแข่งขัน (competition) และกลไกการยับยั้งทำลาย (antibiosis) ซึ่งประกอบด้วยการสร้างสารระเหยต้านเชื้อรา (volatile antifungal compounds) ในกลุ่ม phenylethyl alcohol และการสร้างเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ในกลุ่ม chitinase และ β -1,3-glucanase แสดงให้เห็นว่าเชื้อราเอนโดไฟต์ *T. asperellum* V76-14 มีคุณสมบัติการเป็น biological control agent (BCA)

สำหรับใช้ควบคุมเชื้อในสกุล *Sclerotium* sp. และเหมาะสมที่จะนำไปใช้ทดสอบในพืชและในสภาพแปลงต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

อรณิชา ตันติพลานนท์. 2561. การคัดกรองและเตรียมสูตรสำเร็จของรา *Trichoderma* spp. เพื่อควบคุมโรคใบจุด *Curvularia* ของกล้าปาล์มน้ำมัน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 79 หน้า

- Angel, L.P.L., M.T.Yusof, I.S. Ismail, B.T.Y. Ping, I.N.A.M.Azni, N.H.Kamarudin, and S.Sundram. 2016. An in vitro study of antifungal activity of *Trichoderma virens* 7b and profile of its non-polar antifungal components released against *Ganoderma boninense* J. Microbiol. 54(11): 732–744.
- Dennis, C. and J. Webster. 1971. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*, II. Production of volatile antibiotic. Trans. Br. Mycol. Soc. 57(1): 41–48.
- Elad, Y., D.R. David, T. Levi, A. Kapat, and B. Kirshner. 1999. *Trichoderma harzianum* T-39- mechanisms of biocontrol of foliar pathogens. In: H. Lyr, P.E. Russell, H.W. Dehne, H.D. Sisler (Eds.), Modern Fungicides and Antifungal Compounds, Intercept, Andover, Hants, UK, pp. 459–467.
- Farr, D. F., G. F. Bills, G. P. Chamuris, and A. Y. Rossman. 1989. Fungi on Plants and Plant Products in the United States. Amer. Phytopath. Soc., St. Paul, Minnesota.
- Hirpara, D.G., H.P. Gajera, H.Z. Hirpara, and B.A. Golakiya. 2017. Antipathy of *Trichoderma* against *Sclerotium rolfsii* Sacc.: Evaluation of cell wall-degrading enzymatic activities and molecular diversity analysis of antagonistic. J. Molec. Microbiol. Biotech. 27: 22–28.
- Kubicek, C.P., R.L. Mach, C.K. Peterbauer, and M. Lorito, 2001. *Trichoderma*: from genes to biocontrol. J. Plant Pathol. 83: 11–23.
- Lorito, M., C.K. Hayes, A. Di Pietro, S.L. Woo, and G.E. Harman. 1994. Purification, characterization, and synergistic activity of a glucan 1,3- β glucosidase and an N-acetyl- β -glucosamidase from *Trichoderma harzianum*. Phytopathol. 84: 398–405.
- Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Biochem. 31: 426–428.
- Mullen, J. 2001. Southern blight, Southern stem blight, White mold. *The Plant Health Instructor*. DOI: 10.1094/PHI-I-2001-0104-01
- Roberts, P. D. 2003. Southern Blight. Pp. 20–21 in: Compendium of Pepper Diseases. In: K. L. Pernezny, P. D. Roberts, J. F., Murphy and N. P. Goldberg (eds.). APS Press. St. Paul, MN.
- Xiao-Yan, S., S. Qing-Tao, X. Shu-Tao, C. Xiu-Lan, S. Cai-Yun, and Z. Yu-Zhong. 2006. Broad-spectrum antimicrobial activity and high stability of Trichokonins from *Trichoderma koningii* SMF2 against plant pathogens. FEMS Microbiol. Lett. 260: 119–125.