

ผลของสารพิษที่ผลิตโดยเชื้อรา *Cercospora canescens* จากถั่วเขียว

เกษม สร้อยทอง¹

บทคัดย่อ

เชื้อรา *Cercospora canescens* ที่แยกได้จากใบถั่วเขียวที่เป็นโรคใบจุด สามารถสร้างสารพิษซึ่งมีสีสีแดง ในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ จากการทดสอบสารพิษที่สกัดโดยใช้ acetone นั้น เมื่อนำไปทดสอบบนแผ่น silica gel พบว่า สารพิษสามารถเคลื่อนที่จาก yellow band ของ impurities ขึ้นไป ปรากฏเป็นจุดสีน้ำตาลปนแดง มีค่า RF เท่ากับ 0.71 ซึ่งคาดว่าเป็นสาร cercosporin สารพิษที่สกัดได้ดังกล่าวนี้ มีผลต่อการงอกของเมล็ดและความยาวของรากถั่วเขียว ทั้งในสายพันธุ์ต้านทานโรคและสายพันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรค จึงกล่าวได้ว่า สารพิษที่สร้างจากเชื้อราดังกล่าวนี้ มีลักษณะเป็นสารพิษที่ไม่เฉพาะเจาะจง (non-host specific toxin) และพบว่าสารพิษบริสุทธิ์ (purified toxin) นั้น มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการเจริญของรากถั่วเขียว และลดเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดได้ดีกว่าสารสกัดอย่างหยาบ (crude extract)

งานวิจัยเกี่ยวกับสารพิษ cercosporin และสารประกอบอื่น ๆ ที่ผลิตโดยเชื้อรา *Cercospora* sp. นั้น Schmidt et al. (1964) เป็นผู้ริเริ่มสกัดสารจากอาหารเลี้ยงเชื้อรา ซึ่งก็มีลักษณะสีแดงและสามารถแยกผลึกสีแดงจากเชื้อรา *C. beticola* เจริญอยู่ได้เช่นกัน Kuyama and Tamura (1975) ได้แยกสารบริสุทธิ์จากจุดสีของเชื้อรา *C. kikuchii* สาเหตุของโรคที่ติดต่อกทางเมล็ดพันธุ์ของถั่วเหลือง และเป็นผู้ให้ชื่อสารพิษที่แยกได้นี้ว่า cercosporin จากการศึกษาคุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของสารพิษนี้ พบว่ามีสูตรทางเคมี คือ $C_{30}H_{28}O_{10}$ (empirical formula) ในการศึกษาผลของ cercosporin ที่มีต่อพืช Fajola (1978) ได้ทดลองฉีดสารพิษดังกล่าวเข้าไปในพืชอาศัยของ *Cercospora* sp. พบว่า ใบถั่วเหลือง ยาสูบ และถั่วเขียว มีอาการเหลืองซีดและเกิดเซลล์แห้งตาย ปริมาณสารพิษที่ใช้เพียงเล็กน้อยเท่านั้นก็มีผลต่อการเกิดอาการผิดปกติบนพืชอาศัยหลายชนิด และเมื่อใช้ปริมาณสารพิษที่มีความเข้มข้นสูงขึ้นนั้น มีผลทำให้เกิดอาการผิดปกติรุนแรงมากขึ้น Steinkamp (1981) ได้ศึกษาโครงสร้างจุลภาคของเซลล์แห้งตายพบว่าเกิดจากการชักนำของ cercosporin ซึ่งภายในช่องว่างระหว่างเซลล์จะพบ granule จำนวนมากสะสมในบริเวณใกล้

ผนังเซลล์ และเยื่อหุ้มเซลล์จะถูกทำลาย Daub (1982) กล่าวว่า Cercosporin มีบทบาทต่อ photosensitizing agent ในพืชอาศัยที่เป็นโรค ซึ่งได้สันนิษฐานว่า อาจจะมีบทบาทสำคัญต่อการเกิดของการเกิดความรุนแรง หรือความสามารถในการเกิดโรคในพืชชั้นสูงที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Cercospora* sp. และเชื้อโรคอื่น ๆ

วัตถุประสงค์ในการทดลองนี้ เพื่อที่จะทดสอบผลของสารสกัดอย่างหยาบ (crude extract) และสารพิษบริสุทธิ์ (purified toxin) ที่ได้จากเชื้อรา *Cercospora canescens* Ell. & Mart. ที่มีต่อการงอกและการเจริญเติบโตของถั่วเขียวสายพันธุ์ต้านทานโรคและสายพันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรค และเพื่อทดสอบคุณสมบัติของสารพิษว่า มีลักษณะเป็นสารพิษที่เฉพาะเจาะจง (host specific toxin) หรือสารพิษที่ไม่เฉพาะเจาะจง (non-host specific toxin) ต่อพืชอาศัย

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

แยกเชื้อรา *Cercospora canescens* ที่เป็นสาเหตุโรคใบจุดของถั่วเขียวโดยวิธี tissue transplanting แล้วนำไปเลี้ยงในอาหาร mungbean seed decoction agar (MSDA) ซึ่งประกอบด้วย น้ำต้มจากเมล็ดถั่วเขียว 50 กรัม วัน 17 กรัม และน้ำกลั่น 1,000 มล. เมื่อได้เชื้อบริสุทธิ์แล้ว นำเชื้อราเลี้ยงในอาหาร potato dextrose broth (PDB) เป็นเวลา 10 วัน

¹อาจารย์ประจำภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520

จึงนำเชื้อราไปสกัดสารพิษ โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Steinkamp (1981) นำเชื้อราไปสกัดโดยใช้ acetone ในเครื่องบดละเอียดไฟฟ้า และนำไปกรองใน Scheitz filter ภายใต้ระบบสุญญากาศ เพื่อแยกชิ้นส่วนของสปอร์และเส้นใยของเชื้อราออกให้หมด ก็จะได้สารสกัดอย่างหยาบประเภท 1 (crude extract I) ดังกล่าวไปสกัดโดยใช้ acetone แล้วนำไประเหยให้แห้งในอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน จากนั้นใช้ acetone ในปริมาณเล็กน้อยละลายสารที่ตกค้างอยู่ แล้วนำไป centrifuge ที่ความเร็ว 2.5×10^3 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที แล้วเก็บส่วนของสารตัวอย่างจากส่วนบน (supernatant) ซึ่งสารตัวอย่างที่ได้ดังกล่าวจัดเป็นสารสกัดอย่างหยาบประเภท II (crude extract II) นำตัวอย่างสารสกัดไปหยดบนแผ่น silica gel ที่ได้จากการทำ thin layer silica gel สังเกตและวัดการเคลื่อนที่ของสารตัวอย่าง คำนวณหาค่า RF ในการแยกสารบริสุทธิ์ ขูดบริเวณจุดสีน้ำตาลบนแผ่น silica gel แล้วละลายใน chloroform 5 มล. นำไป centrifuge ที่ความเร็ว 2.5×10^3 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เก็บสารตัวอย่างจากส่วนบนเป็นสารพิษบริสุทธิ์ (purified toxin)

ทำการทดลองสารสกัดที่ได้ แบบ 2-factors factorial Randomized Completely Block จำนวน 3 ซ้ำ โดยใช้เมล็ดถั่วเขียว 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ Pagasa 3:MK เป็นสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อโรค และสายพันธุ์ NCM 53 เป็นสายพันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรคใบจุดของถั่วเขียว ที่เกิดจากเชื้อรา *C. canescens* นำเมล็ดถั่วเขียวแต่ละสายพันธุ์ จำนวนสายพันธุ์ ๑ ละ 40 เมล็ดต่อหนึ่งซ้ำ จุ่มลงในสารสกัดอย่างหยาบประเภท I, สารสกัดอย่างหยาบประเภท II สารพิษบริสุทธิ์ และใช้ acetone, chloroform และน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วเป็นตัวเปรียบเทียบ (control) ตรวจสอบการงอกของเมล็ดภายในเวลา 72 ชั่วโมง วัดการเจริญเติบโตของต้นกล้าดังต่อไปนี้ ความยาวราก และเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด

ผลการทดลองและวิจารณ์

RF ของสารที่สกัดได้

การทดสอบสารพิษบริสุทธิ์ที่สกัดได้จากเชื้อรา *C. canescens* โดยวิธี thin layer silica gel พบว่า สารพิษสามารถเคลื่อนที่จาก yellow band ของ impurities ขึ้นไป ปรากฏเป็นจุดสีน้ำตาลบนแผ่น มีค่า RF เท่ากับ 0.71 ซึ่งสูงกว่าค่า RF ของ cercosporin มาตรฐานเล็กน้อย (Macri, 1980) รายงาน

จากการตรวจสอบ cercosporin ที่ได้จากเชื้อรา *C. beticola* ได้ค่า RF 0.75 ซึ่งสูงกว่าค่า RF มาตรฐานเช่นกัน สำหรับค่า RF ของ cercosporin มาตรฐานที่แยกจากเชื้อรา *C. kikuchii*, *C. canescens* และ *C. oryzae* มีค่าเท่ากับ 0.68 ซึ่งเป็นสารพิษสีแดง มีจุดหลอมเหลวที่อุณหภูมิ 260 องศาเซลเซียส (Koyama and Tamura, 1972) นอกจากนี้ยังมีสารพิษที่แยกได้อีกชนิดหนึ่ง จากเชื้อรา *C. beticola* มีสีเหลือง ค่า RF 0.82 จุดหลอมเหลว 215 องศาเซลเซียส (Macri, 1980) ซึ่ง Daub (1982) รายงานว่า โครงสร้างทางเคมีของ cercosporin เกี่ยวข้องกับ photosensitizing compound hypericin และ cercosporin ที่แยกได้จาก *C. beticola* และ *C. nicotianae* เป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อใบยาสูบ

ผลของสารพิษที่มีต่อความยาวของรากในต้นกล้าถั่วเขียว

การทดลองพบว่า สารพิษจากเชื้อรา *C. canescens* มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของราก ในต้นกล้าถั่วเขียวทั้งสองสายพันธุ์ ซึ่ง Lynch and Geoghegan (1979) รายงานว่า cercosporin สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของรากมะเขือเทศ 30% จากผลการทดลองดังกล่าว พิจารณาได้ว่า สารพิษที่สร้างจากเชื้อรา *C. canescens* นี้มีลักษณะเป็นสารพิษที่ไม่เฉพาะเจาะจง (non-host specific toxin) จากการทดลองพบว่า สารพิษบริสุทธิ์นั้น มีประสิทธิภาพสูงสุดต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของถั่วเขียวทั้งสองสายพันธุ์ รองลงมาคือสารสกัดอย่างหยาบประเภท I และสารสกัดอย่างหยาบประเภท II ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 1% ส่วนเมล็ดถั่วเขียวที่

TABLE 1. Effect of *C. canescens* toxin on root elongation of mungbean varieties

Treatment	Root elongation (inch)	
	Resistant Var.	Susceptible Var.
Crude extract I	1.76	1.91
Crude extract II	2.00	2.16
Purified toxin	0.07	0.92
Distilled water	5.60	4.73
Acetone	2.60	2.73
Chloroform	3.06	2.73

L.S.D. 0.01 = 1.52

L.S.D. 0.05 = 1.04

C.V. = 29.27%

จุ่มด้วย acetone, chloroform และน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อเพื่อเป็น
ตัวเปรียบเทียบ พบว่าเมล็ดที่จุ่มในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อ ส่วนของ
รากเจริญเติบโตเป็นปกติ ส่วนที่จุ่มใน acetone และ chloroform
มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของรากเพียงเล็กน้อย ในระดับต่ำ
กว่าสารสกัดอย่างหยาดทั้งสองประเภทและสารพิษบริสุทธิ์
(Table 1)

ผลของสารพิษที่มีต่อการงอกของเมล็ดถั่วเขียว

การทดลองพบว่า การจุ่มเมล็ดด้วยสารพิษบริสุทธิ์นั้น
มีผลต่อการลดเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดทั้งสองสายพันธุ์
สำหรับเมล็ดที่จุ่มด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อ ไม่มีผลต่อการงอกของ
เมล็ดในสายพันธุ์ด้านทานและอ่อนแอต่อโรค โดยมีเปอร์เซ็นต์
การงอก 100% และ 95% ตามลำดับ (Table 2) ส่วนการจุ่ม
เมล็ดด้วยสารสกัดอย่างหยาดประเภท I พบว่ามีผลต่อการ
ลดเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดถั่วเขียวสายพันธุ์ด้านทานต่อโรค
(70%) แต่ไม่มีผลต่อการงอกของเมล็ดถั่วเขียวสายพันธุ์อ่อนแอ
ต่อโรค (90%) สำหรับสารสกัดอย่างหยาด II ไม่มีผลต่อการ
ลดเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดถั่วเขียวทั้งสองสายพันธุ์ สันนิษ-
ฐานว่ามีปริมาณสารพิษอยู่ในระดับต่ำสุดที่ไม่เป็นอันตรายต่อพืช

สรุปได้ว่า *C. canescens* สร้างสารพิษซึ่งมีสีแดงใน
อาหารเลี้ยงเชื้อ และสามารถสกัดสารดังกล่าวได้โดยวิธี thin
layer silica gel มีค่า RF เท่ากับ 0.71 พบว่าสารพิษดังกล่าวนี้
มีผลต่อการยับยั้งความยาวของรากและเปอร์เซ็นต์การงอก
ของเมล็ดถั่วเขียวทั้งสองสายพันธุ์ด้านทานและอ่อนแอต่อโรค

Table 2. Effects of *C. canescens* toxin on seed germination of mungbean varieties

Treatment	Seed germination (%)	
	Resistant Var.	Susceptible Var.
Crude extract I	70	90
Crude extract II	100	90
Purified toxin	70	75
Distilled water	100	95
acetone	100	60
chloroform	90	70

เอกสารอ้างอิง

- Daub, M.E. 1982. Peroxidation of tobacco membrane lipid by the photosensitizing toxin, Cercosporin. *Plant Physiology* 69 : 1361 - 1364.
- Fajola, A.O. 1978. Cercosporin, a phytotoxin from *Cercospora* spp. *Physiol. Plant Pathol.* 13 : 157 - 164.
- Kayama, S. and T. Tamura. 1957. Cercosporin : A pigment of *Cercosporina kikuchii*. *Mat. et. Tom II. Physical and chemical properties of cercosporin and its derivatives.* *J. Amer. Chem. Soc.* 79 : 5726 - 5729.
- Lynch, T.J. and M.J. Geoghegan. 1979. Regulation of growth and cercosporin photoinduction in *Cercospora beticola*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 73 : 311 - 327.
- Macri, F.A. 1980. Effect of *Cercospora beticola* toxin on ATP level of maize roots and on the phosphorylating activity of isolated pea mitochondria. *Plant Sci Letters.* 18 : 207 - 214.
- Schmidt, W.H., D.F. Meigh and J.C. Parker. 1964. Effects of damage and fungal infection on production of ethylene by carnation. *Nature. Lond.* 204 : 92 - 93.
- Steinkamp, M.P. 1981. Ultrastructure of lesions produced in leaves of *Beta vulgaris* by Cercosporin : a toxin from *Cercospora beticola*. *Phytopathology* 71 : 1272 - 1281.

Effects of Toxin Produced by *Cercospora canescens* on Mungbean

By

Kasem Soyong

Department of Plant Pest Management Technology, Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Chaokuntaharn Ladkrabang (KMIT-L), Bangkok 10520, Thailand.

ABSTRACT

Cercospora canescens Ell. & Mart. is capable of producing a red pigmented toxin when grown on potato dextrose broth. A concentrated acetone extract of the purified toxin showed the deep yellow band, RF value 0.71, suggesting that it is cercosporin. An extract of the toxin affected root elongation and seed germination of both resistant and susceptible varieties of mungbean. The purified toxin had greater effect in inhibiting root growth and reducing seed germination of the same varieties. It is indicating that the toxin produced by the fungus as non-host specific toxin.
