Agricultural Sci. J. 50 : 3 (Suppl.) : 139-142 (2019) ว. วิทย. กษ. 50 : 3 (พิเศษ) : 139-142 (2562)

การตรวจหาเชื้อสาเหตุโรคผลเน่าของลำไยหลังการเก็บเกี่ยวและการคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรค

Detection of Fruit Rot Disease Pathogens on Longan and Selection of Antagonistic Bacteria to Control the Disease

เอมลิน พิพัฒนภักดี[1] ดนัย บุณยเกียรติ[2,3] ฉันทลักษณ์ ติยายน[2,3] พิมพ์ใจ สีหะนาม[2,3] และอรอุมา เรืองวงษ์[1,3]

Aimalin Pipattanapuckdee[1], Danai Boonyakait[2,3], Chantalak Tiyayon[2,3], Pimjai Seehanam[2,3] and Onuma Ruangwong[1,3]

Abstract

Fruit rot disease causes considerable loss of longan fruit. This research focused on detecting pathogens and selecting antagonistic bacteria to control fruit rot disease after harvesting longan. Result revealed that *Lasiodiplodia* sp. was the major pathogenic fungus that is a cause of fruit rot disease. Efficacy of antagonistic bacteria obtained from healthy part of longan i.e.; flowers, leaves, young fruits and ripen fruits against *Lasiodiplodia* sp. was investigated by dual culture technique. It was found that antagonistic bacteria 3 isolates, i.e.; RFMC45, YFBH6 and RFCD306, collected from young fruits (YF) and ripen fruits (RF) could inhibit the mycelial growth of pathogenic fungi by 72.80, 79.71 and 94.40 %, respectively. The effects of cell suspensions and culture filtrates of 3 isolates antagonistic bacteria on the inhibition of *Lasiodiplodia* sp. spore germination were tested by slide culture technique. All isolates had the ability to inhibit fungal spore. The maximum inhibition was in RFCD306. Moreover, some germinated spore showed swollen germ tube and could not continue growth.

Keywords: Fruit rot disease, longan, antagonistic bacteria

บทคัดย่อ

โรคผลเน่าหลังการเก็บเกี่ยวของลำไย สร้างความเสียหายแก่ผลผลิตลำไยเป็นอย่างมาก งานวิจัยนี้จึงตรวจสอบชนิดเชื้อสาเหตุของโรคและคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์เพื่อใช้ควบคุมโรค พบว่าเชื้อราที่เป็นสาเหตุของการเน่าเสียมากที่สุด คือ *Lasiodiplodia* sp. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่แยกมาจาก ดอก ใบ ผลอ่อนและผลแก่ของลำไยที่ไม่เป็นโรคเพื่อยับยั้งเส้นใยของเชื้อรา *Lasiodiplodia* sp. สาเหตุโรคด้วยวิธี dual culture พบแบคทีเรียปฏิปักษ์ จำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ RFMC45, YFBH6 และ RFCD306 ซึ่งแยกมาจาก ผลลำไยอ่อน (YF) และผลลำไยแก่ (RF) โดยสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคได้ร้อยละ 72.80, 79.71 และ 94.40 ตามลำดับ และทดสอบการยับยั้งการงอกของสปอร์ โดยใช้ cell suspensions และ culture filtrate ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 3 ไอโซเลท โดยวิธี slide culture พบว่าทั้ง 3 ไอโซเลทสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ได้ โดย RFCD306 สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ได้มากที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่าสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรคบางสปอร์ที่งอก มีลักษณะผิดปกติ โดย germ tube มีการบวมพอง และไม่สามารถเจริญต่อไปได้

คำสำคัญ: โรคผลเน่า ลำไย เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

คำนำ

ลำไย (*Dimocarpus longan* Lour.) เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Sapindaceae ซึ่งมีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่งของประเทศไทย ปลูกกันแพร่หลายทั้งภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงใต้ของประเทศ ผลผลิตส่วนใหญ่ใช้บริโภค และส่งออกลำไยสดมีอายุการเก็บรักษาและอายุการวางจำหน่ายสั้น โดยสีของผลลำไยเปลี่ยนจากสีเหลืองน้ำตาลเป็นสีน้ำตาลเข้มจนถึงดำ เนื่องมาจาก สภาวะขาดน้ำ (dehydration) อาการสะท้านหนาว (chilling injury) และ เชื้อจุลินทรีย์ (microorganism) (Pan, 1994) ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บรักษาและขนส่งลำไย คือ อุณหภูมิ 5-7 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 90-95 และเมื่ออุณหภูมิสูงหรือต่ำจนเกินไป อายุการเก็บรักษาและอายุการวางจำหน่ายของลำไยจะสั้นลง ทั้งนี้การเก็บรักษา

[1]ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 50200

[1] Department of Entomology and Plant pathology, Faculty of Agriculture at Chiang Mai University, 50200

[2]ภาควิชาพืชศาสตร์และปฐพีศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 50200

[2] Department of Plant and Soil Sciences, Faculty of Agriculture at Chiang Mai University, 50200

[3]ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กทม. 10400

[3] Postharvest Technology Innovation Center, Office of the Higher Education Commission, Bangkok 10400, Thailand

ลำไยไว้ที่อุณหภูมิห้องนั้น มีอายุการเก็บรักษาสั้น โดยสาเหตุหลักของการสิ้นสุดอายุการเก็บรักษาหรืออายุการวางจำหน่ายเกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อรา ซึ่งทำให้เกิดโรคผลเน่า (Drinnan, 2004)

การเกิดโรคผลเน่าของลำไย มีรายงานว่าพบเชื้อราที่เป็นสาเหตุมากที่สุด คือ *Lasiodiplodia* sp. (Chang-ngern *et al*., 2010) สำหรับวิธีการควบคุมโรคผลเน่าภายหลังการเก็บเกี่ยวนิยมใช้ การรมผลลำไยสดด้วยสารซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (SO_2) แต่มักประสบปัญหาเรื่องสารตกค้าง SO_2 เกินเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนด ดังนั้นเพื่อหลีกเลี่ยงการใช้สารเคมี การใช้จุลินทรีย์จึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจ งานวิจัยครั้งนี้จึงคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ เพื่อควบคุมเชื้อสาเหตุโรคผลเน่าของลำไย เพื่อลดการสูญเสียของผลผลิตและช่วยยืดอายุการเก็บรักษาหลังการเก็บเกี่ยวให้ยังคงคุณภาพที่ดีต่อการจำหน่าย และมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค เกษตรกร สิ่งแวดล้อม และระบบนิเวศน์

อุปกรณ์และวิธีการ

1) การสำรวจโรคและการแยกเชื้อสาเหตุโรคผลเน่าของลำไย

สำรวจและเก็บตัวอย่างผลเน่าของลำไยในระยะต่าง ๆ ของการเจริญเติบโต จากแปลงปลูกในจังหวัดเชียงใหม่ และจังหวัดลำพูน นำมาแยกเชื้อด้วยเทคนิค tissue transplant จากผลลำไยที่แสดงอาการเน่า แล้วนำไปวางลงบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง นำเชื้อราที่แยกได้มาทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค ด้วยวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Munirah *et al*. (2017) โดยการปลูกเชื้อกลับลงไปบนผลลำไย สังเกตุการเกิดโรคและบันทึกอาการ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้ทำการปลูกเชื้อ

2) การแยกและการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของลำไย

แยกเชื้อแบคทีเรียที่อาศัยในเนื้อเยื่อพืช (endophytic bacteria) จากส่วนต่าง ๆ ของลำไยที่ไม่เป็นโรค เช่น ใบ ดอก ผลอ่อน เปลือกของผลลำไยแก่ นำชิ้นพืชวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1-2 วัน แล้วจึงเก็บรวบรวมแบคทีเรียเอนโดไฟต์มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรค ด้วยเทคนิค dual culture โดยเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียล่วงหน้าเป็นเวลา 1, 3, 5 และ 7 วัน บนอาหาร PDA จากนั้นนำเชื้อราสาเหตุโรค ดังกล่าวมาวางบนจานอาหารที่ได้ทำการขีดแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบ โดยวางเชื้อราให้ห่างจากเชื้อแบคทีเรีย 4 เซนติเมตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3-4 วัน วัดผลโดยวัดความยาวรัศมีของเส้นใยของเชื้อรา คำนวณหาร้อยละการยับยั้งการเจริญของเชื้อ (percent inhibition of radial growth; PIRG) เปรียบเทียบกับชุดควบคุม ตามสูตรการคำนวณของ Skidmore and Dickinson (1976) และประเมินประสิทธิภาพโดยใช้เกณฑ์ของ Kumar *et al*. (2007)

3) การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ในการยับยั้งการงอกสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของลำไย

เตรียมสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรค โดยกระตุ้นให้เชื้อราสร้างสปอร์บนอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม จากนั้นนำสปอร์ความเข้มข้น 10^6 spore/ml มาทดสอบความสามารถในการงอกของสปอร์กับเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ โดยนำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคได้สูง (ประสิทธิภาพในการยับยั้งมากกว่าร้อยละ75) นำมาเลี้ยงในอาหาร nutrient broth (NB) เขย่าด้วยเครื่องเขย่าสาร (shaker) ที่ความเร็ว 150 rpm เป็นเวลา 7 วัน นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้กรองเซลล์แบคทีเรีย (non-culture filtrate) และ อาหารเลี้ยงเชื้อที่กรองเซลล์แบคทีเรีย (culture filtrate) ซึ่งผ่านที่กรองเซลล์แบคทีเรียขนาด 0.22 µm (membrane filter, Minisart®) นำมาทดสอบประสิทธิภาพในยับยั้งการงอกสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรค เปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อ NB เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม) โดยใช้เทคนิค slide culture บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจนับสปอร์งอกที่ 3, 6, 12 และ 24 ชั่วโมงหลังการบ่มเชื้อ โดยนับสปอร์ที่งอกภายใต้กล้อง นำผลในแต่ละกรรมวิธีมาคำนวนเป็นร้อยละการยับยั้งการงอกของสปอร์ (Percentage of spore germination inhibition; PSGI) (Gemeda *et al*., 2014)

ผล

1. ผลการสำรวจโรคและการแยกเชื้อสาเหตุโรคผลเน่าของลำไย

การสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างลำไยที่เป็นโรคในระยะต่าง ๆ จากพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ และจังหวัดลำพูน สามารถเก็บตัวอย่างผลลำไยที่แสดงอาการผลเน่าในระยะเก็บเกี่ยว ได้จำนวน 34 ตัวอย่าง พบว่าร้อยละ 38.23 ของตัวอย่างเป็นเชื้อรา *Lasiodiplodia* sp. โดยเชื้อรามีโคโลนีสีขาว เส้นใยสีขาวฟู เมื่ออายุมากขึ้นเส้นใยจะเปลี่ยนเป็นสีเทาดำ สร้าง

fruiting body เมื่ออายุ 15 วัน โคนิเดียรูปร่างค่อนข้างรีคล้ายไข่ สีน้ำตาลเข้ม และมีผนังกั้น แบ่งออกเป็น 2 เซลล์ ถ้ายังอ่อนอยู่จะใสไม่มีสี และมีเซลล์เดียว จากนั้นนำเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าที่พบมากที่สุดมาทดสอบในขั้นตอนต่อไป (Figure 1)

2. การแยกและการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคลำไยผลเน่า

การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งหมด 1,413 ไอโซเลท โดยแยกจากดอกลำไย จำนวน 13 ไอโซเลท แยกได้จากใบลำไย จำนวน 72 ไอโซเลท แยกได้จากผลอ่อนลำไย จำนวน 301 ไอโซเลท และแยกได้จากผลแก่ลำไยจำนวน 1,027 ไอโซเลท ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรค พบเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อรา *Lasiodiplodia* sp. จำนวน 3 ไอโซเลท คือ RFMC45 YFBH6 และ RFCD306 ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ทำการเพาะเลี้ยงล่วงหน้าไปแล้ว 7 วันบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเฉลี่ยอยู่ที่ร้อยละ 72.80, 79.71 และ 94.40 ตามลำดับ (Figure 2)

3. ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ในการยับยั้งการงอกสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของลำไย

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท RFMC45, YFBH6 และ RFCD306 ในการยับยั้งการงอกสปอร์ของเชื้อรา *Lasiodiplodia* sp. หลังบ่มสปอร์ไว้ 3 ชั่วโมง พบว่าสปอร์ของเชื้อราในชุดควบคุมสามารถงอกได้ตามปกติ โดยมีการงอกอยู่ที่ร้อยละ 93.33 ในขณะที่สปอร์เชื้อราใน non-culture filtrate ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท RFMC45, YFBH6 และ RFCD306 สามารถยับยั้งการงอกของเชื้อราได้ร้อยละ 50.08, 33.15 และ 54.48 ตามลำดับ โดยสปอร์ที่มีการงอก มีลักษณะของ germ tube ผิดปกติ โดยเกิดการโป่งพอง รูปร่างกลมขนาดใหญ่ (swollen germ tube) และไม่สามารถงอกต่อไปได้ ส่วนสปอร์ของเชื้อราใน culture filtrate ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท RFMC45, YFBH6 และ RFCD306 สามารถยับยั้งการงอกของเชื้อราได้ร้อยละ 45.51, 27.46 และ 54.39 ตามลำดับ ลักษณะของ germ tube มีความผิดปกติ เกิดการโป่งพอง รูปร่างกลมขนาดใหญ่และไม่สามารถงอกต่อไปได้ (Table 1, Figure 3)

วิจารณ์ผล

จากการสำรวจและแยกเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของลำไยพบว่าเชื้อรา *Lasiodiplodia* sp. เป็นสาเหตุที่พบมากที่สุด ร้อยละ 38.23 สอดคล้องกับงานวิจัยของ Chang-ngern *et al*. (2010) และ Jiang *et al*. (2002) ที่รายงานว่าเชื้อราในวงศ์ *Botryosphaeria* สามารถก่อโรคผลเน่าของลำไยมากที่สุด โดยเชื้อราเข้าสู่พืชผ่านทางช่องเปิดธรรมชาติบริเวณขั้วผลลำไย ซึ่งเชื้อจะแฝงตัวอยู่ในเซลล์พืช (latent) โดยไม่ทำให้เกิดโรค จนกว่าลำไยจะถูกเก็บเกี่ยวจึงเริ่มแสดงอาการผลเน่า โดยเฉพาะเมื่อสภาพแวดล้อมมีความชื้นและอุณหภูมิสูง (Zhang, 2014) ในส่วนของการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ได้ เชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราได้สูงจำนวน 3 ไอโซเลท คือ RFMC45, YFBH6 และ RFCD306 และเมื่อนำเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลทมาทำการทดสอบการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *Lasiodiplodia* sp. โดยทั้ง 3 ไอโซเลทสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ได้บางส่วน ส่วนสปอร์ที่งอกนั้นแสดงอาการผิดปกติ (swelling germ tubes) ซึ่งได้มีงานวิจัยของ Kim and Chung (2004) รายงานว่าสปอร์ที่บวมพองนั้นเกิดจากการที่เชื้อแบคทีเรียสร้างโปรตีน หรือปฏิชีวนะสารบางชนิด รบกวนกระบวนการสร้างผนังเซลล์ของเชื้อราจึงส่งผลให้มีการยับยั้งการสร้างเส้นใยและการงอกของสปอร์

สรุปผลการทดลอง

จากการแยกเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของลำไยพบว่ามีเชื้อรา *Lasiodiplodia* sp. เป็นเชื้อราสาเหตุมากที่สุด โดยแยกได้ ร้อยละ 38.23 ส่วนการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์พบว่าเชื้อแบคทีเรีย ไอโซเลท RFCD306 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเส้นใยและการงอกของสปอร์ของเชื้อรา *Lasiodiplodia* sp. ได้สูงที่สุด โดยสปอร์ที่มีการงอก มีลักษณะของ germ tube ผิดปกติ

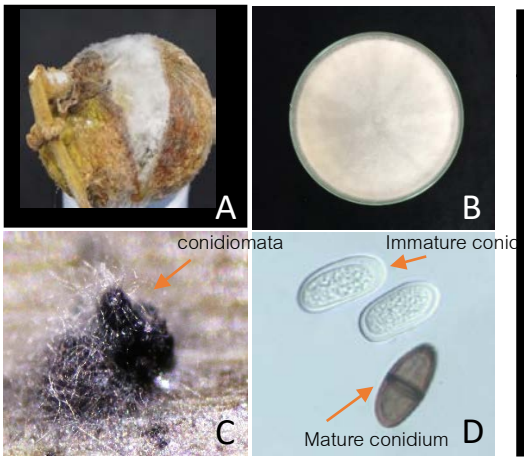

Figure 1 Symptom and morphology of *Lasiodiplodia* sp. causing fruit rot disease (A) symptom on longan fruit (B) colony on PDA (C) conidiomata (D) immature and mature conidia

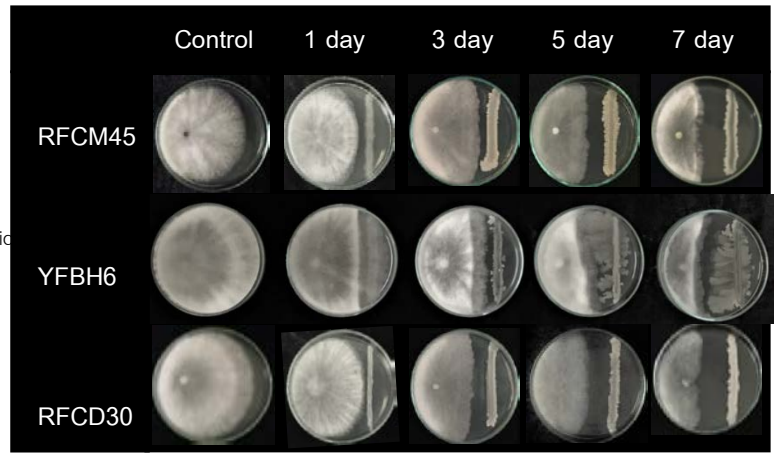

Figure 2 Inhibition of *Lasiodiplodia* sp. by 3 antagonistic bacteria at 1, 3, 5 and 7 days after incubation on PDA

Table 1 Test of antagonistic bacteria for inhibitory effect of spore germination

Treatment	Isolates	Inhibition of spore germination
Non-culture filtrate	RFMC45	50.08
	YFBH6	33.15
	RFCD306	54.48
culture filtrate	RFMC45	45.51
	YFBH6	27.46
	RFCD306	54.39

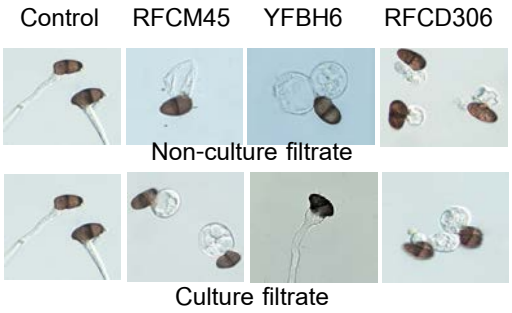

Figure 3 Efficacy of three antagonistic bacteria have been found to inhibit the process of spore germination at 3 hours.

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว ที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัยในครั้งนี้ และภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้การสนับสนุนในเรื่องของสถานที่ และอุปกรณ์ที่ใช้ทำการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

Chang-ngern, P., U. Sardsud, W. Pathomaree, P. Chantrasri and E. Chukeatirote. 2010. Diversity of Molds in Fresh Longan. Agricultural Science Journal 41(1): 322-324.

Drinnan, J. 2004. Longan postharvest handling and storage. A report foe the Rural Industries Research and Development Corporation. RIRDC publishing, Australia. 18 p.

Gemeda, N., Y. Woldeamanuel, D. Asrat and A. Debella. 2014. Effect of essential oils on *Aspergillus* spore germination, growth and mycotoxin production: a potential source of botanical food preservative. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine 4: 373-381.

Jiang, Y.M., Z.Q. Zhang, D.C. Joyce and S. Ketsa. 2002. Postharvest biology and handling of longan fruit (*Dimocarpus longan* lour). Postharvest Biology and Technology 26: 241-252.

Kim, P.I. and K.C. Chung. 2004. Production of an antifungal protein for control of *Colletotrichum lagenarium* by *Bacillus amyloliquefaciens* MET0908. FEMS Microbiology Letters 234(1): 177-183.

Kumar, A.S., N.P.E. Reddy, K.H. Reddy and M.C. Devi. 2007. Evaluation of fungicidal resistance among *Colletotrichum gloeosporioides* isolates causing mango anthracnose in Agri Export Zone of Andhra Pradesh, India. Plant Pathology Bulletin 16: 157-160.

Munirah, M.S., A.R. Azmi, S.Y.C. Yong and A.I.M.Z. Nur. 2017. Characterization of *Lasiodiplodia theobromae* and *L. pseudotheobromae* causing fruit rot on pre-harvest mango in Malaysia. Plant Pathology & Quarantine 7(2): 202-213.

Pan, X.C. 1994. Study on relationship between preservation and microstructure of Euphoria longan fruit. Journal of Guangxi Agricultural University 13: 185-188.

Skidmore, A.M. and C.H. Dickinson. 1976. Colony interactions and hyphal interference between *Septoria nodorum* and phylloplane fungi. Transactions of the British Mycological Society 66(1): 57–64.

Zhang, J. 2014. *Lasiodiplodia theobromae* in citrus fruit (*Diplodia* stem-rot). Postharvest Decay. Academic Press, USA. p. 309-335.