การลดความเสียหายที่เกิดจากโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงโดยจุลินทรีย์ที่แยกได้จากทรงพุ่ม

Reduction in Mango Fruit Anthracnose by Antagonistic Microorganisms Obtained from the Canopies

ศิริรัตน์ ตรีกาญจนวัฒนา[1] ,นวลวรรณ ฟ้ารุ่งสาง[2] ,ชลิดา เล็กสมบูรณ์ ,[1]และ อุดม ฟ้ารุ่งสาง[1]

Sirirat Trikanchanawattana[1], Nuanwan Farungsang[2], Chalida Leksomboon[1] and Udom Farungsang[1]

Abstract

Isolation of phylloplane microorganisms from shoots, inflorescences and young fruit of the fruit tree canopies was accomplished on nutrient-glucose-agar (NGA) and glucose-yeast-peptone medium (GYP) supported by enrichment technique. The obtained microorganisms were screened primarily based on their antagonism towards radial growth, spore germination and fruiting body formation of *Colletotrichum gloeosporioides* (CG). Experiments on antagonistic protection against infection by CG (unwounded inoculation) on detached mango leaves and rose apple (*Syzygium aqueum*) fruit selected 3 bacteria (3103, 3107 and 3503) and a yeast (4113), respectively. On the fruit of Nam-dok-mai mango, smart biological control was provided with 58-77 % reduction in lesion diameter when the antagonists were applied before or concurrently with the inoculation with CG.

บทคัดย่อ

การแยกจุลินทรีย์จากยอด ช่อดอก และผลอ่อน ที่เก็บจากทรงพุ่มของไม้ผลประสบความสำเร็จโดยการใช้อาหาร nutrient-glucose-agar และ glucose-yeast-peptone medium ร่วมกับขั้นตอน enrichment technique คัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีคุณลักษณะเป็นศัตรูธรรมชาติของรา *Colletotrichum gloeosporioides* โดยใช้การต่อต้านการเจริญของเส้นใย การงอกของสปอร์ และการสร้าง fruiting body ของราเป็นดัชนี การทดสอบความสามารถของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ในการคุ้มกันเนื้อเยื่อสดของพืชจากการเข้าทำลายของรา *C. gloeosporioides* สามารถคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการคุ้มกันการเข้าทำลายใบมะม่วงโดยราได้ 3 ไอโซเลต (3103, 3107 และ 3505) และคัดเลือกยีสต์ที่มีประสิทธิภาพในการคุ้มกันการเข้าทำลายผลชมพู่ได้ 1 ไอโซเลต (4113) ในการนำจุลินทรีย์ทั้ง 4 ไอโซเลตนี้ไปทดสอบประสิทธิภาพในการคุ้มกันการเข้าทำลายของราบนผลมะม่วงน้ำดอกไม้ พบว่าจุลินทรีย์ทุกไอโซเลตสามารถลดความรุนแรงของโรคได้อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อใช้ก่อนหรือพร้อมการปลูกเชื้อรา โดยการคุ้มกันของจุลินทรีย์สามารถลดขนาดแผลลงได้ระหว่าง 58-77 %

คำนำ

มะม่วงเป็นผลไม้ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย ในแต่ละปีประเทศไทยมีผลผลิตมะม่วงออกมาสู่ตลาดจำนวนมากในขณะเดียวกันก็พบว่าผลผลิตหลังการเก็บเกี่ยวจำนวนมากได้รับความเสียหาย โดยมีโรคแอนแทรคโนส (*Colletotrichum gloeosporioides*) เป็นสาเหตุที่สำคัญประการหนึ่งของความเสียหายนี้ การใช้สารเคมีควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยวนอกจากจะมีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมแล้วในปัจจุบันยังไม่เป็นที่ยอมรับจากผู้บริโภคด้วย การควบคุมโรคพืชโดย ชีววิธีจึงเป็นทางเลือกที่มีศักยภาพที่จะได้รับการยอมรับในด้านความปลอดภัย สำหรับการนำมาใช้กับผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อทดแทนการใช้สารเคมี (Janiscwicz and Korsten, 2002) งานวิจัยนี้เป็นการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีลักษณะเป็นศัตรูธรรมชาติของรา *C. gloeosporioides* จากทรงพุ่ม เพื่อศึกษาประสิทธิภาพและแนวทางการนำมาใช้ลดการเข้าทำลายของรา *C. gloeosporioides* ในสภาพแปลงและลดความเสียหายเนื่องจากโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงภายหลังการเก็บเกี่ยว

อุปกรณ์และวิธีการ

[1] ภาควิชาโรคพืชคณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม73140

[1] Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Kamphaengsaen Campus, Nakhon Pathom 73140

[2] ฝ่ายปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม73140

[2] Central Laboratory and Greenhouse Complex, Kasetsart University Research and Development Institute, Kamphaengsaen Campus, Nakhon Pathom 73140

1. การแยกและเก็บรวบรวมจุลินทรีย์จากทรงพุ่มพืช

สุ่มเก็บตัวอย่างยอดอ่อน ช่อดอก และผลอ่อนของไม้ผลเขตร้อนจากสวนผลไม้ นำมาแยกจุลินทรีย์ทรงพุ่มโดยใช้อาหาร Nutrient glucose agar (NGA) ด้วยวิธี dilution plate technique และอาหาร Glucose yeast peptone (GYP) ร่วมกับขั้นตอน enrichment technique (Farungsang *et al*., 1996)

2. การคัดเลือกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อรา *Colletotrichum gloeosporioides*

คัดเลือกจุลินทรีย์ที่เก็บรวบรวมไว้ โดยการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของรา *C. gloeosporioides* ในสภาพ dual culture บนอาหาร PDA การเป็นปฏิปักษ์ต่อการงอกของสปอร์ในสภาพ dual suspension ในอาหาร GYPB การสร้าง fruiting body ของรา ด้วยวิธี leaf disk assay (Farungsang *et al*., 1997) และการควบคุมการเข้าทำลาย (infection) ของราบนใบมะม่วงที่เกิดจากการปลูกเชื้อโดยไม่ทำแผลด้วยด้วย spore suspension ของราโดยวิธี detached leaf ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของวราภรณ์ (2545)

3. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสบนผลชมพู่

ปลูกเชื้อรา *C. gloeosporioides* และ suspension ของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์บนผลชมพู่ที่มีอายุหลังเก็บเกี่ยวไม่เกิน 24 ชั่วโมง และผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวแล้ว โดยแบ่งการทดลองดังนี้ การปลูกเชื้อราก่อนการหยดจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ 12 ชั่วโมง การปลูกเชื้อราหลังการหยดจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ 12 ชั่วโมง และการปลูกเชื้อราพร้อมการหยดจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ โดยการปลูกเชื้อรา *C. gloeosporioides* เป็นการปลูกเชื้อแบบไม่ทำแผล (unwounded inoculation) ด้วย spore suspension (10^6 สปอร์/มิลลิลิตร) ปริมาตร 0.02 มิลลิลิตร และ suspension ของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (OD 0.2) ปริมาตร 0.02 มิลลิลิตร

4. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วง

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3 โดยใช้ผลมะม่วงน้ำดอกไม้ที่แก่เต็มที่ (matutre green) แทนผลชมพู่

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การแยกและเก็บรวบรวมจุลินทรีย์จากทรงพุ่มพืช

สุ่มเก็บจุลินทรีย์ที่มีลักษณะสัณฐานของโคโลนีแตกต่างกันได้ทั้งหมด 347 ไอโซเลต เป็นจุลินทรีย์ที่แยกได้จากอาหาร NGA 117 ไอโซเลต และอาหาร GYP 230 ไอโซเลต

2. การคัดเลือกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อรา *Colletotrichum gloeosporioides*

2.1การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่แยกได้โดยใช้อาหาร NGA

การทดสอบความสามารถของจุลินทรีย์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของรา *C. gloeosporioides* พบว่าจุลินทรีย์ 82 ไอโซเลต (จาก 117 ไอโซเลต) ทำให้เกิด inhibition zone ยับยั้งการเจริญของเส้นใยของราบนอาหาร PDA ได้อย่างมีนัยสำคัญ และมี 30 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยของราได้มากกว่า 45 % ซึ่งได้นำมาคัดเลือกในขั้นตอนต่อไป

การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่เป็นปฏิปักษ์ต่อการสร้าง fruiting body ของรา โดยวิธี leaf disk assay โดยใช้ระดับการสร้าง fruiting body (Fruiting body formation lavel - FBL) เป็นดัชนี พบว่าจุลินทรีย์จำนวน 12 ไอโซเลต (จาก 30 ไอโซเลต) ทำให้ราไม่สามารถสร้าง fruiting body ได้ (FBL 0)

การทดสอบความสามารถในการควบคุมการเข้าทำลายใบมะม่วงของราโดยวิธี detached leaf จากจุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบ 12 ไอโซเลต สามารถคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงไว้ได้ 3 ไอโซเลต (3103, 3107 และ 3503) ทั้งนี้การหยด 3103 ก่อนการปลูกเชื้อ รา 12 ชั่วโมง และการหยด 3503 พร้อมกับการปลูกเชื้อรา สามารถป้องกันการเข้าทำลายเนื้อเยื่อใบสดได้ 100% นอกจากนี้การใช้ไอโซเลต 3107 ให้ผลการเข้าทำลายใบสดของราในระดับต่ำ และไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในแต่ละกรรมวิธี

2.2 การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่แยกได้โดยใช้อาหาร GYP

การทดสอบความสามารถของจุลินทรีย์ในการยับยั้งการงอกของสปอร์รา *C. gloeosporioides* พบว่าแบคทีเรียจำนวน 11 ไอโซเลต (จาก 54 ไอโซเลต) สามารถลดอัตราการงอกของสปอร์ได้อย่างมีนัยสำคัญ 13 ไอโซเลตสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ได้ 100% และยีสต์ 26 ไอโซเลต (จาก 176 ไอโซเลต) สามารถลดอัตราการงอกและความยาว germ tube ของสปอร์ได้อย่างมีนัยสำคัญ และ 4 ไอโซเลต ที่ยับยั้งการงอกได้ 100% นอกจากนี้สามารถตรวจพบว่าความความผิดปกติในการงอกของสปอร์ของราที่เป็นผลมาจากแบคทีเรียและยีสต์มีความแตกต่างกัน โดยแบคทีเรียทำให้สปอร์และ germ tube มีลักษณะโป่งพอง เจริญผิดรูป อาจเกิดจากที่แบคทีเรียมีการสร้างปฏิชีวนสาร (Jeffries and Kooman, 1992) ส่วนยีสต์ทำให้ germ tube ที่งอกมีขนาดสั้นลงอย่างเห็นได้ชัด ในขณะที่รูปร่างของสปอร์ปกติ อาจเกิดจากยีสต์สามารถแข่งขันใช้สารอาหารที่

มีอยู่ได้รวดเร็วกว่าสปอร์รา (มณฑาทิพย์, 2540) ในการทดสอบนี้ได้คัดเลือกแบคทีเรีย 24 ไอโซเลต และยีสต์ 30 ไอโซเลต ไปทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ต่อการสร้าง fruiting body ของรา โดยวิธี leaf disk assay

การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่เป็นปฏิปักษ์ต่อการสร้าง fruiting body ของรา โดยวิธี leaf disk assay พบว่าแบคทีเรีย 8 ไอโซเลต ทำให้ราไม่สามารถสร้าง fruiting body ได้ และยีสต์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุด 3 ไอโซเลต ทำให้รา มี FBL ระหว่าง 0.4-0.6 เมื่อเทียบกับ FBL 4ของการสร้าง fruiting body ปกติของรา

3. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสบนผลชมพู่

เป็นการทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้จากขั้นตอน leaf disk assay (ผลการทดลองและวิจารณ์ 2.2) โดยคัดเลือกแบคทีเรีย 1 ไอโซเลต คือ 2835 (FBL 0) และยีสต์ 2 ไอโซเลต คือ 3723 และ 4113 (FBL 0.4 และ 0.6 ตามลำดับ) เป็นตัวแทนในการทดสอบ ยีสต์ 4113 ให้ผลในการควบคุมการเข้าทำลายของรา *C. gloeosporioides* ได้ดีที่สุดเมื่อมีการใช้พร้อมและก่อนการปลูกเชื้อรา 12 ชั่วโมง โดยมีขนาดแผลเฉลี่ย 1.9 และ 2.7 มิลลิเมตร ตามลำดับ เทียบกับการเข้าทำลายในสภาพที่ไม่มีการคุ้มกันคือ 9.3 มิลลิเมตร แบคทีเรีย 2835 ให้ผลในการคุ้มกันได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อมีการใช้ก่อนและพร้อมกับการปลูกเชื้อรา โดยมีขนาดแผลเฉลี่ย 5 และ 6.9 มิลลิเมตร ตามลำดับ เทียบกับการเข้าทำลายในสภาพที่ไม่มีการคุ้มกันคือ 13.1มิลลิเมตร (Figure 1)

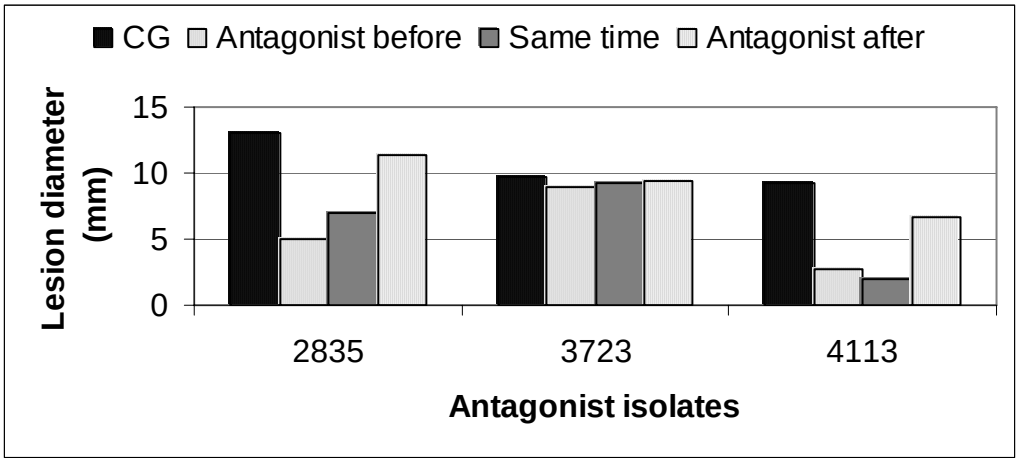

Figure 1 Disease severity on rose apples affected by timing of antagonist application (12 hrs before, concurrently, or 12 hrs after inoculation with CG)

4. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วง

นำจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ 4 ไอโซเลทได้แก่ 3103 3107 3503 (จากผลการทดลองขั้นตอนที่ 2) และ 4113 (จากผลการทดลองขั้นตอนที่ 3) มาทดสอบการควบคุมโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วงน้ำดอกไม้ พบว่า จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทุกไอโซเลตสามารถลดการเกิดโรคได้อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อมีการใช้ก่อนหรือพร้อมกับการปลูกเชื้อรา โดยจุลินทรีย์ไอโซเลต 3103 สามารถลดขนาดแผลลงได้ 72.4 หรือ 65.2 % (ขนาดแผล 1.38 หรือ 1.74 มิลลิเมตร เมื่อเทียบกับขนาดแผล 5 มิลลิเมตร เมื่อไม่มีการคุ้มกันด้วยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์) จุลินทรีย์ไอโซเลต 3107 สามารถลดขนาดแผลลงได้ 70.75 หรือ 69.6 % (ขนาดแผล 1.55 หรือ 1.61 มิลลิเมตร เมื่อเทียบกับขนาดแผล 5.3 มิลลิเมตร เมื่อไม่มีการคุ้มกันด้วยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์) จุลินทรีย์ไอโซเลต 3503 สามารถลดขนาดแผลลงได้ 62.6 หรือ 58.4 % (ขนาดแผล 2.2 หรือ 2.45 มิลลิเมตร เมื่อเทียบกับขนาดแผล 5.89 มิลลิเมตร เมื่อไม่มีการคุ้มกันด้วยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์) จุลินทรีย์ไอโซเลต 4113 สามารถลดขนาดแผลลงได้ 77.05 หรือ 76.68 % (ขนาดแผล 1.23 หรือ 1.25 มิลลิเมตร เมื่อเทียบกับขนาดแผล 5.36 มิลลิเมตร เมื่อไม่มีการคุ้มกันด้วยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์) (Figure 2)

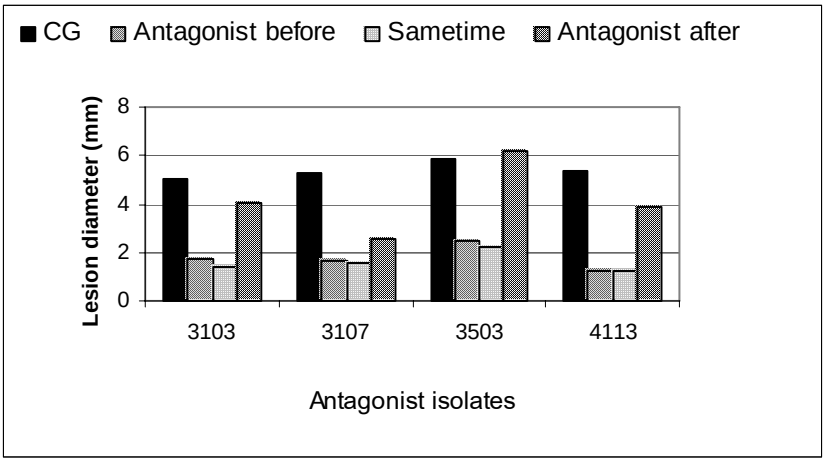

Figure 2 Disease severity on Nam-dok-mai mangoes affected by timing of antagonist application (12 hrs before, concurrently, or 12 hrs after inoculation with CG)

สรุป

การศึกษาครั้งนี้ได้พิสูจน์ให้เห็นว่าจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้มีประสิทธิภาพในการขัดขวางการเข้าทำลายผลไม้ของรา *C. gloeosporioides* ในสภาพแวดล้อมในห้องปฏิบัติการ โดยประสิทธิภาพสูงสุดได้รับเมื่อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ปรากฏอยู่บนผิวของผลไม้ก่อนหรือพร้อมกับการปรากฏของรา ประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ชี้ให้เห็นประสิทธิภาพของขบวนการคัดเลือกจุลินทรีย์ในสภาพแวดล้อมบนผิวของผลไม้ ยีสต์มีประสิทธิภาพในการต่อต้านการเข้าทำลายผลไม้ของราสูงกว่าแบคทีเรีย แม้ว่าบางครั้งจะมีประสิทธิภาพด้อยกว่าในขั้นตอนการคัดเลือกจุลินทรีย์ และพบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์สามารถป้องกันการเข้าทำลายของราบนใบพืชได้เมื่อปรากฏอยู่ก่อนหรือพร้อมกับการปรากฏของราบนผิวใบ

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณโครงการพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และทุนอุดหนุนและส่งเสริมวิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโท-เอก บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้ทุนสนับสนุนวิจัยงานนี้

เอกสารอ้างอิง

มณฑาทิพย์ เสาร์ห้า .2540 .การควบคุมโรคขั้วผลเน่าโดยใช้ยีสต์ .วิทยานิพนธ์ปริญญาโท .มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ,กรุงเทพฯ .

วราภรณ์ สุทธิสา .2545 .การคัดเลือกและการใช้จุลินทรีย์ที่แยกได้จากผิวพืชในการควบคุมเชื้อรา *Alternaria brassicicola* สาเหตุโรคใบจุดของคะน้า .วิทยานิพนธ์ปริญญาโท .มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ,กรุงเทพฯ .

Farungsang, N., U. Farungsang and F. Chantaniyom. 1996. Preliminary investigation of antagonistic yeasts for biological control of postharvest rambutan fruit rot caused by *Colletotrichum gloeosporioides*, pp. 177-182. *In* 34th Kasetsart University Annual conference. Jan 30-Feb 1, 1996. Bangkok.

Farungsang, N., U. Farungsang, S. Sangchote and F. Chantaniyom. 1997. Leaf disk assay for effective screening of antagonistic yeasts against *Greeneria* fruit rot of rambutan, pp. 345-350. *In* 35th Kasetsart University Annual Conference. Feb3-5, 1997. Bangkok.

Janisiewicz, W. J. and L. Korsten. 2002. Biological control of postharvest disease of fruits. Annual Review of Phytopathology 40: 411-441.

Jeffries, P. and Kooman, I. 1992. Strategies and prospects for biological control of diseases caused by *Colletotrichum.* pp. 337-357. . *In Colletotrichum*: Biology, Pathology and Control. Bailey, J. A. and M. J. Jeger eds. CAB international, Wallingford.