Agricultural Sci. J. 41 : 1 (Suppl.) : 291-294 (2010) ว. วิทย. กษ. 41 : 1 (พิเศษ) : 291-294 (2553)

การจำแนกและคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์เพื่อใช้ควบคุมโรคเน่าของผลไม้หลังการเก็บเกี่ยว

Microbial Isolation and Identification for Biological Control of Posthaevest Diseases

คนึงนิจ บุศราคำ[1], **อนวัช สุวรรณกุล**[1], **ศิริพงษ์ พัฒนวิบูลย์**[1], **สดศรี เนียมเปรม**[1],**สุภาวดี ชนะพาล**[1] **และ มนฑิณี กมลธรรม**[1]
Kanungnid Busarskam[1], Anawat Suwanagul[1], Siripong Pattanavibul[1], Sodsri Neamprem[1], Supavadee Chanapaln[1] and Montinee Kamoltham[1]

Abstract

The aim of this investigation is to isolate, classify and identify the effective antagonist microorganisms to against pathogenic fungi for postharvest uses, from natural substrate, leaf and rhizosphere soil of durian, mango, mangosteen, longan, lychee and rambutan by alcohol treatment, rice baiting technique, soil plate method and tissue transplanting method. High efficiency antagonist microorganisms from natural substrate were selected by modified plate method. Among the highest antagonistic bacteria isolated by this investigation are *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens* TISTR1894, TISTR1898,TISTR1895,TISTR1896,TISTR1893 and TISTR1897.These were demonstrated for controlled postharvest plant pathogenic fungi, including *Alternaria* sp., C*ollectotrichumgloeosporioides*, *Fusarium semitectum*, *Penicillium digitatum*, *Phomopsis* sp. and *Lasiodiplodia theobromae*, the average percent growth inhibition were 74.4, 62.8, 59.2, 57.6, 57.1 and 55.3 1 respectively.

Key word: antagonist microorganisms, biological control, postharvest plant pathogenic fungi

บทคัดย่อ

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์ในการ แยก จำแนก และคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อราสาเหตุโรคหลังการเก็บเกี่ยวจากแหล่งธรรมชาติ พืชที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ ทุเรียน มะม่วง มังคุด ลำไย ลิ้นจี่ และมังคุด โดยใช้ใบ และดินบริเวณรอบรากโดยวิธี alcohol treatment, baiting technique, soil plate และ tissue transplanting การคัดเลือกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ประสิทธิภาพสูงทำโดยวิธี modified plate method การคัดเลือกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ประสิทธิภาพสูงทำโดยวิธี modified plate method แบคทีเรียปฏิปักษ์ประสิทธิภาพสูง ที่จำแนกได้ ได้แก่ *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens* TISTR1894, TISTR1898, TISTR1895, TISTR1896, TISTR1893 และ TISTR1897 โดยสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของราสาเหตุโรคพืชคิดเป็นเปอร์เซ็นต์โดยเฉลี่ยเท่ากับ 74.4, 62.8, 59.2, 57.6, 57.1 และ 55.3 ตามลำดับ ราสาเหตุโรคหลังการเก็บเกี่ยวที่ใช้ในการทดลองได้แก่ *Alternaria sp.*, *Collectotrichum gloeosporioides*, *Fusarium semitectum*, *Penicillium digitatum*, *Phomopsis sp.* และ *Lasiodiplodia theobromae*.

คำสำคัญ จุลินทรีย์ปฏิปักษ์, การควบคุมโดยชีววิธี, ราสาเหตุโรคพืชหลังการเก็บเกี่ยว

คำนำ

การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี (biocontrol, biological control) เป็นวิธีที่นำมาใช้แทนที่การใช้สารเคมีการควบคุมโรคพืช โดยชีววิธี คือ การควบคุมโรคพืชโดยการใช้คุณสมบัติการเป็นปฏิปักษ์กันระหว่างจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช(plant pathogen) กับ จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (antagonistic microorganism) โดยการนำจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ไปพัฒนาและผลิตเป็นสารชีวภัณฑ์ (biocontrol agent) ในต่างประเทศนั้นแยกได้จากบริเวณผิวใบพืช (epiphyte) ภายในเซลล์พืช (endophyte และดินบริเวณรอบราก (rhizosphere soil) ตัวอย่าง เช่น Biosave™ และ Aspire™ ซึ่งเหมาะกับพืชฤดูหนาว เช่น แอปเปิ้ล แพร์ เป็นต้น ดังนั้นการนำเอาชีวภัณฑ์ดังกล่าว มาใช้ควบคุมโรคพืชเขตร้อนนั้นจึงไม่มีประสิทธิภาพเท่าที่ควร จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องแยกและจำแนกจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่มี คุณสมบัติการเป็นปฏิปักษ์กับจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืชที่มีอยู่ตามแหล่งธรรมชาติ เพื่อนำไปพัฒนาเป็นสารชีวภัณฑ์และนำไปใช้ใน การเกษตรทั้งก่อนและหลังการเก็บเกี่ยวในอนาคต โดยงานวิจัยนี้อยู่ภายใต้

[1] ฝ่ายเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ปทุมธานี 12120
[1] Department of Agricultural Technology, Thailand Institute of Scienctific and Technological Research (TISTR), Pathumthani 12120 Thailand

ชุดโครงการ "การวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการยืดอายุละการปรับปรุงคุณภาพผลิตผลสดหลังการเก็บเกี่ยว" ของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

อุปกรณ์และวิธีการ

แยกเชื้อราจากวัสดุธรรมชาติ เก็บตัวอย่างใบและดินของทุเรียน และ เงาะ จากจังหวัดระยองและจันทบุรี ลิ้นจี่และลำไย จากจังหวัดเชียงใหม่ และส้มและมะม่วงจากจังหวัดเชียงรายและระยอง ตัวอย่างที่เก็บมาได้จากสวนของเกษตรกรที่ไม่ได้ใช้สารเคมีในการทำการเกษตร แยกด้วยวิธีต่างๆ ได้แก่ soil plate method, alcohol treatment และ การแยกราเอนโดไฟท์ การทดสอบประสิทธิภาพของอาหารเหลวที่แยกเซลล์ออกแล้วต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของราสาเหตุโรคพืช โดยใช้วิธี modified plate method โดยอาหารเหลวที่ใช้ในการทดลองคือ supplemented TSB (Trypic Soy Broth supplemented with monosodiumglutamate)

ราสาเหตุโรคพืชที่ใช้ในการทดลองได้แก่ *Alternaria* sp., *Fusarium longipes, Lasiodiplodia theobromae, Penicillium digitatum* และ *Phomopsis* sp. โดยราเหล่านี้เป็นสาเหตุโรคเน่าของผล เข้าทำลายผลิตผลทางการเกษตรบริเวณบาดแผลที่เกิดจากการเก็บเกี่ยว ดังนั้นการแสดงอาการเน่าเสียนั้นจะเกิดที่บริเวณขั้วผล

ผลและวิจารณ์

แบคทีเรียที่แยกได้โดยวิธี modified-plate method จากการทดลองแยกได้ทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ *Acinetobacter baumanni*, , *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens*, *Ochrobactrum anthropi*, *Pseudomonas putida, Pseudomonas syringae* และ *Staphylococcus xylosus* (Table1)

Table 1 Isolated bacteria from natural substances by dilution plate method and Identified by IPA system (Biochem test).

ชื่อ	สายพันธุ์
Acinetobacter baumannii	PHT49
Bacillus subtilis/amyloliquefaciens	TISTR1893, TISTR1894, TISTR1895, TISTR1896, TISTR1897, TISTR1898, PHT36, PHT42, PHT43, PHT56 ,PHT62
Ochrobactrum anthropi	PHT23
Pseudomonas putida	PHT26
Staphylococcus xylosus	PHT57

เชื้อแบคทีเรียจะสร้างสารไปยับยั้งหรือทำลาย (antibiosis) ราสาเหตุโรคพืช สังเกตได้จากการเกิด clear zone ระหว่างโคโลนีราและแบคทีเรีย (Figure1 and Figure 2) ขนาดของ clear zone นั้น เป็นตัวบ่งบอกประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ โดยเชื้อที่มีความสามารถในการยับยั้งสูง มี clear zone ขนาด 30 มิลลิเมตร ความสามารถในการยับยั้งปานกลาง มี clear zone ขนาด 15-20 มิลลิเมตร และความสามารถในการยับยั้งต่ำ มี clear zone ขนาด ต่ำกว่า 15 มิลลิเมตร (McSpadder and Fravel, 2002)

แบคทีเรีย *B. subtilis/amyloliquefaciens* ที่แยกและจัดจำแนกได้นั้นมีการนำไปใช้ควบคุมจุลินทรีย์สาเหตุโรคหลายชนิด (Table 2) แบคทีเรียทั้งสองชนิดนั้นแยกได้จากดินบริเวณราก (rhizosphere soil) สอดคล้องกับรายงานของ Idris et al., 2004

โดยแบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้นำไปผลิตเป็นสารกำจัดโรคพืชโดยมีชื่อทางการค้ามากมาย (Brian, 2002) เช่นเดียวกับในประเทศไทย ได้แก่ Laminar™ บริษัทผู้ผลิตคือ แอพพลายด์เค็ม จำกัด *B.subtilis/amyloliquifaciens* เมื่อนำไปใช้ในสภาพไร่ที่ความเข้มข้น 10^7 cfu/ml นั้นสามารถลดการเข้าทำลายของ *Fusarium verticilloides* ในข้าวโพด ทำให้ปริมาณสารพิษ คือ fumonisin B1 และ B2 ที่ราชนิดนี้ลดลงเมื่อไปปนเปื้อนในเมล็ด (Paola et al. 2006) โดยสารที่แบคทีเรียทั้งสองชนิดที่สร้างขึ้นและมีฤทธิยับยั้ง และกำจัดรา (antifungi) นั้นได้แก่ สารพิษประเภทโพลีเปปไตท์ ชื่อ อิทูลิน (Itulin)

นอกจากนี้ผลิต เอนไซม์หลายชนิด เช่น ไลเปส (lipase) อะไมเลส(amylase) ซูเครส (sucrase)โปรตีเอส(protease)และเปปติเดส(peptidase) (http://www.anathenature.com/index.php?lay=show&ac=article&Ntype=12&Id=519315)

Table 2 Inhibition percent antagonistic bacteria to plant pathogenic fungi, *Alternaria sp., C. gloeosporioides, F. longipes, L. theobromae, P. digitatum* and *Phomopsis sp.*by by modified-plate method

จุลินทรีย์ปฏิปักษ์	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของราสาเหตุโรคพืช						
	Alternaria sp	*C. gloeosporioides*	*F. longipes*	*L. theobromae*	*P. digitatum*	*Phomopsis ap.*	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย
1. *B. subtilis/ amyloliquefaciens* TISTR1893	63.6	55.4	58.8	54.1	41.4	69.4	57.1
2. *B. subtilis/ amyloliquefaciens* TISTR1894	82.0	68.2	64.7	73.7	79.9	78.0	74.4
3. *B. subtilis/ amyloliquefaciens* TISTR1895	71.9	53.1	66.5	54.1	47.6	61.8	59.2
4. *B. subtilis/ amyloliquefaciens* TISTR1896	63.0	49.2	62.7	53.8	47.6	69.4	57.6
5. *B. subtilis/ amyloliquefaciens* TISTR1897	56.5	62.0	24.7	51.8	79.2	58.0	55.3
6. *B. subtilis/ amyloliquefaciens* TISTR1898	58.8	72.2	33.3	57.7	86.1	69.0	62.8

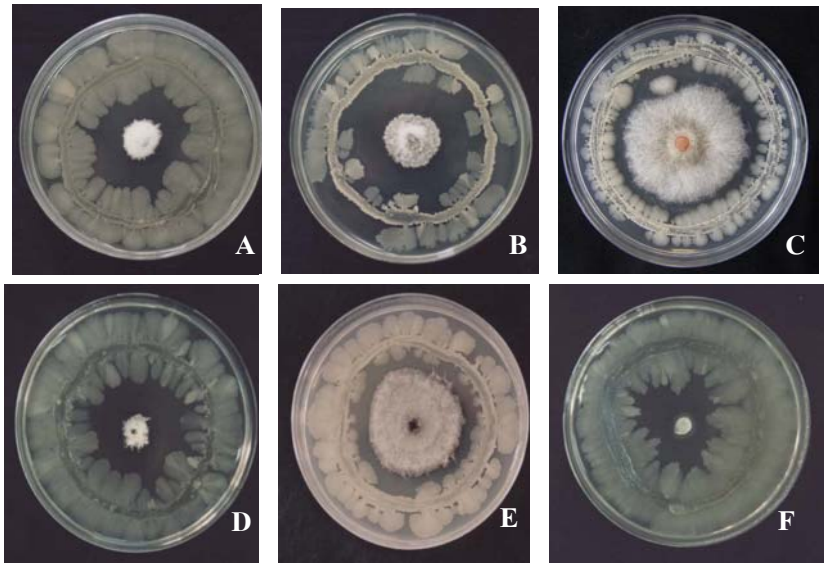

Figure 1 The selection of *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens* TISTR1895 with plant pathogenic fungi by modified-plate method, TISTR1895 vs *Alternaria sp.* (A); TISTR1895 vs *C. gloeosporioides* (B); TISTR1895 vs *F. longipes* (C); TISTR1895 vs *L. theobromae* (D); TISTR1895 vs *P. digitatum* (E) and TISTR1895 vs *Phomopsis sp.* (F)

คำขอบคุณ

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยที่ให้การสนับสนุนการวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

Brian B. Spadden Gardener. 2002. Biological control of plant pathogens: research commercialization and application in the USA. [online].

Idris, E.E., Bochow, H. Ross, H. and Borriss, R. 2004. Use of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent.VI. Phytohormone-like action of culture filtrates prepared from plant growth-promoting *Bacillus amyloliquifaciens* FZB24, FZB42, FZB45 and *Bacillus subtilis* FZB37. (abstract) [online]

McSpadder , G B.B.M. and Fravel, D.R. 2002. Biological control of plant pathogens: research, commercialization and application in USA. [online]http://www.anathenature.com/index.php?lay=show&ac=article&Ntype=12&Id=519315