



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)
ปริญญา

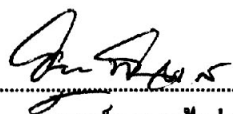
โรคพืช	โรคพืช
สาขา	ภาควิชา

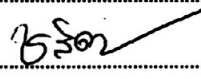
เรื่อง การคัดเลือกและศักยภาพของจุลินทรีย์ชีวพิชในการควบคุมโรคแอนแทรกโนสของ
มะม่วงหลังการเก็บเกี่ยว

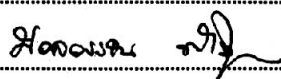
Phylloplane Microorganisms, Screening and Disease Control Potential towards
Postharvest Anthracnose of Mango

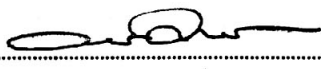
นามผู้วิจัย นางสาวศิริรัตน์ ตรีกาญจน์วัฒนา

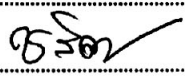
ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ ()
(อาจารย์อุดม ฟุ้งสง, วท.ม.)

กรรมการ ()
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ชลิตา เล็กสมบูรณ์, วท.ค.)

กรรมการ ()
(อาจารย์นวลวรรณ ฟุ้งสง, วท.ม.)

กรรมการ ()
(รองศาสตราจารย์จรัส แก้วศิริพานิช, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา ()
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ชลิตา เล็กสมบูรณ์, วท.ค.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

()
(รองศาสตราจารย์วินัย อากงหาญ, M.A.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ 29 เดือน ธันวาคม พ.ศ. 2549

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การคัดเลือกและศึกษาของจุลินทรีย์ผิวพืชในการควบคุมโรคแอนแทรกโนสของ
มะม่วงหลังการเก็บเกี่ยว

Phylloplane Microorganisms, Screening and Disease Control Potential towards
Postharvest Anthracnose of Mango

โดย

นางสาวศิริรัตน์ ศรีกาญจนวัฒนา

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)
พ.ศ. 2549

ISBN 974-16-1289-3

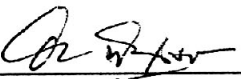
ศิริรัตน์ ตรีกาญจน์วัฒนา 2549: การคัดเลือกและศักยภาพของจุลินทรีย์ผิวพืชในการควบคุมโรค
แอนแทรคโนสของมะม่วงหลังการเก็บเกี่ยว ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)
สาขาโรคพืช ภาควิชาโรคพืช ปรธานกรรมการที่ปรึกษา: อาจารย์อุดม ฟ้ารุ่งแสง, วท.ม. 95 หน้า
ISBN 974-16-1289-3

การแยกจุลินทรีย์จากยอด ช่อดอก และผลอ่อน ที่เก็บจากทรงพุ่มไม้ผลเขตร้อนโดยการใช้อาหาร NGA
และ GYP ร่วมกับ enrichment technique สามารถรวบรวมจุลินทรีย์ได้ทั้งหมด 347 ไอโซเลต เพื่อคัดเลือก
จุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นปฏิปักษ์ต่อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วง
โดยการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเส้นใย การงอกของสปอร์ และการสร้าง fruiting body
ของรา การทดสอบความสามารถของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ในการคุ้มกันเนื้อเยื่อพืชจากการเข้าทำลายของรา
C. gloeosporioides สามารถคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการคุ้มกันใบมะม่วงจากการเข้าทำลายของรา
ได้ 3 ไอโซเลต คือ 3103 3107 และ 3503 และยีสต์ที่มีประสิทธิภาพในการคุ้มกันผลชมพูจากการเข้าทำลายของ
รา 1 ไอโซเลต คือ D4113

การทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมการเกิดโรคแอนแทรคโนสพบว่ายีสต์
D4113 สามารถลดการเกิดโรคได้ดีที่สุด เมื่อมีการใช้จุลินทรีย์ก่อน หรือพร้อมกับการปลูกราสาเหตุโรคแบบไม่
ทำแผล โดยมีขนาดผลของการเกิดโรค 1.3 และ 1.2 มิลลิเมตร ตามลำดับ เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่
ปลูกรา *C. gloeosporioides* เพียงอย่างเดียวมีขนาดแผล 5.36 มิลลิเมตร การทดสอบบนผลมะม่วงโชคอนันต์
พบว่ายีสต์ D4113 ยังคงมีประสิทธิภาพควบคุมโรคได้ดีกว่าแบคทีเรีย โดยมีขนาดแผล 1.2 1.4 และ 1.6
มิลลิเมตร เมื่อมีการใช้จุลินทรีย์ก่อน พร้อม และหลังการปลูกรา *C. gloeosporioides* ตามลำดับ เปรียบเทียบกับ
กรรมวิธีควบคุมที่ปลูกรา *C. gloeosporioides* เพียงอย่างเดียวมีขนาดแผล 4.49 มิลลิเมตร

การใช้เซลล์แขวนลอยและ culture filtrate ของแบคทีเรีย 3103 3107 3503 และเซลล์แขวนลอยของยีสต์
D4113 สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์และการเจริญของ germ tube ของรา แต่การใช้ culture filtrate ของยีสต์
D4113 ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของราได้ ผลการจำแนกแบคทีเรีย 3103 3107 และ 3503 พบว่าทุกไอโซเลต
คือ *Bacillus megaterium* และผลการจำแนกยีสต์ D4113 พบว่าเป็น *Cryptococcus humicola*

ศิริรัตน์ ตรีกาญจน์วัฒนา
ลายมือชื่อนิติ


ลายมือชื่อประธานกรรมการ

๔๔ / ๑๓๓๖ / ๒๕๔๙

Sirirat Trikananawatana 2006: Phylloplane Microorganisms, Screening and Disease Control Potential towards Postharvest Anthracnose of Mango. Master of Science (Agriculture), Major Field: Plant Pathology, Department of Plant Pathology. Thesis Advisor: Mr. Udom Farungsang, M.S. 95 pages.
ISBN 974-16-1289-3

The total 347 isolates of phylloplane microorganisms were isolated from shoots, inflorescences and young fruit of tropical tree fruit canopies by using GYP supported by enrichment technique and NGA, the obtained microflora were screened based on their antagonism towards radial growth, spore germination and fruiting body formation of *Colletotrichum gloeosporioides*. The experiments on antagonistic protection against infection by *C. gloeosporioides* (unwounded infection) on detached mango leaves and rose apple fruits selected 3 bacteria, 3103, 3107 and 3503, and a yeast, D4113, respectively.

Direct testing on detached Nam-dok-mai mangoes demonstrated that the isolate D4113 was the most effective antagonist against infection by *C. gloeosporioides* when the application was occurred before or concurrently with pathogenic inoculation (unwounded) with the lesion diameter of 1.3 and 1.2 millimetres, respectively compared to 5.36 millimeters of non-protective treatment. On detached choke-anan mangoes, the most effective biological control was provided by D4113 with the lesion diameter of 1.2, 1.4 or 1.6 millimeters when the antagonist was applied before, concurrently or after unwounded inoculation with *C. gloeosporioides*, respectively compared to 4.49 millimeters of non-protective treatment.

The investigation on active parts of the antagonists demonstrated abnormal development of *C. gloeosporioides* spore germination among either cells or culture filtrates of bacteria 3103, 3107 and 3503, and among cell but not culture filtrate of the yeast D4113. The antagonists were identified belonging to *Bacillus megaterium* and *Cryptococcus humicola* for the bacteria (3103, 3107 and 3503) and the yeast (D4113), respectively.

<u>Sirirat Trikananawatana</u>	<u>Udom Farungsang</u>	<u>24 March 2006</u>
Student's signature	Thesis Advisor's signature	

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาและวิจัยของข้าพเจ้าสำเร็จเป็นวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้ ข้าพเจ้าขอกราบ
ขอบพระคุณ อาจารย์อุดม และอาจารย์นวลวรรณ ฟุ้งสง ประธานกรรมการที่ปรึกษา และ
กรรมการวิชาเอก ที่ดูแลเอาใจใส่ให้คำปรึกษาที่ดีในทุกเรื่องเสมอมา ตลอดจนตรวจแก้ไข
วิทยานิพนธ์ให้เสร็จสมบูรณ์ กราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชลิดา เล็กสมบูรณ์
กรรมการวิชาเอก รองศาสตราจารย์ ดร. จริ่งแท้ ศิริพานิช กรรมการวิชาการ และผู้ช่วย
ศาสตราจารย์ พิศมัย หาญมงคลพิพัฒน์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์
ให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอบคุณโครงการพัฒนานับพันศึกษาและวิจัยเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว สถาบันวิจัยและ
พัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ที่มอบทุน
สนับสนุนการวิจัยครั้งนี้

ขอบคุณครอบครัวที่น่ารักที่ให้การสนับสนุนด้านการศึกษาเป็นอย่างดี และเป็นกำลังใจที่
สำคัญตลอดมา ขอบคุณ พี่ๆ เพื่อนๆ ในห้องปฏิบัติการโรคพืชหลังการเก็บเกี่ยว น้องๆ นิสิต
เจ้าหน้าที่ และบุคลากร ภาควิชาโรคพืชทุกท่าน สำหรับมิตรภาพและความร่วมมือช่วยเหลือจนการ
ทำวิทยานิพนธ์สำเร็จลุล่วง

คุณประโยชน์จากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้พึงมีเพียงใดขอมอบไว้แด่ คุณพ่อ และคุณแม่
ตลอดจนคณาจารย์ผู้มีพระคุณทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาให้มาจนถึงปัจจุบัน

ศิริรัตน์ ตรีกาญจนวัฒนา

มีนาคม 2549

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(5)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	2
การตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีการ	14
ผลการทดลอง	26
วิจารณ์	68
สรุป	73
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	75
ภาคผนวก	83

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	จุลินทรีย์ผิวพืชที่แยกได้จากทรงพุ่มไม้ผลเขตร้อนบนผิวหนังอาหาร NGA	27
2	จุลินทรีย์ผิวพืชที่แยกได้จากทรงพุ่มไม้ผลเขตร้อนบนผิวหนังอาหาร GYPA	28
3	ประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่แยกได้จากทรงพุ่มไม้ผลเขตร้อนใน ยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา <i>C. gloeosporioides</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA	30
4	ประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการยับยั้งการสร้าง fruiting body ของ รา <i>C. gloeosporioides</i> ด้วยวิธี leaf disk assay	33
5	ประสิทธิภาพการควบคุมโรคแอนแทรคโนสบนใบมะม่วงของจุลินทรีย์ ปฏิปักษ์โดยการปลูกกราสาเหตุโรคด้วยวิธี detached leaf แบบไม่ทำแผล	34
6	การยับยั้งการงอกของสปอร์รา <i>C. gloeosporioides</i> โดยจุลินทรีย์ผิวพืชที่แยก ได้จากอาหาร GYPA	37
7	ประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งการสร้าง fruiting body ของ รา <i>C. gloeosporioides</i> ด้วยวิธี leaf disk assay	40
8	ประสิทธิภาพของยีสต์ปฏิปักษ์ในการยับยั้งการสร้าง fruiting body ของรา <i>C. gloeosporioides</i> ด้วยวิธี leaf disk assay	41
9	ประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสบนผล ชมพู่ที่เกิดจากการปลูกรา <i>C. gloeosporioides</i> แบบไม่ทำแผล หลังบ่มเชื้อไว้ ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 7 วัน	43

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
10	อิทธิพลของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อขนาดแผลของโรคแอนแทรกโนสบนผลมะม่วงน้ำดอกไม้โดยการปลูกราसाเหตุโรคแบบไม่ทำแผล หลังบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 7 วัน	46
11	อิทธิพลของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อระดับการเกิดโรคแอนแทรกโนสบนผลมะม่วงน้ำดอกไม้โดยการปลูกราसाเหตุโรคแบบไม่ทำแผล หลังบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 7 วัน	47
12	อิทธิพลของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อขนาดแผลของโรคแอนแทรกโนสบนผลมะม่วงโชคอนันต์โดยการปลูกราसाเหตุโรคแบบไม่ทำแผลหลังบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 7 วัน	51
13	อิทธิพลของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อระดับการเกิดโรคแอนแทรกโนสบนผลมะม่วงโชคอนันต์โดยการปลูกราसाเหตุโรคแบบไม่ทำแผลหลังบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 7 วัน	52
14	ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา <i>C. gloeosporioides</i> ไอโซเลตต่างๆ โดยแบคทีเรียปฏิปักษ์	56
15	อิทธิพลของเซลล์แขวนลอยและ culture filtrate ของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อการงอกของสปอร์รา <i>C. gloeosporioides</i> หลังการทดสอบและบ่มเชื้อไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	58
16	อิทธิพลของเซลล์แขวนลอยและ culture filtrate ของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อการเจริญของเส้นใยรา <i>C. gloeosporioides</i>	61

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
17	ผลการทดสอบทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีเบื้องต้นของแบคทีเรีย ไอโซเลต 3103 3107 และ 3503 เปรียบเทียบกับแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> spp.	65
ตารางผนวกที่		
1	คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีของแบคทีเรียไอโซเลต 3103 3107 และ 3503 เปรียบเทียบกับ <i>Bacillus megaterium</i> และ <i>B. subtilis</i>	92
2	รายละเอียดคุณลักษณะของยีสต์ไอโซเลต D4113	94

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ระดับการสร้าง fruiting body ของรา <i>C. gloeosporioides</i> บน leaf disk	18
2	ระดับการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนใบมะม่วงโดยการปลูกราสาเหตุโรคด้วยวิธี detached leaf แบบไม่ทำแผล	19
3	ระดับการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วงโดยการปลูกราสาเหตุโรคแบบไม่ทำแผล	23
4	การยับยั้งการเจริญของโคโลนีรา <i>C. gloeosporioides</i> ในสภาพ dual culture บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยจุลินทรีย์ผิวพืชที่แยกได้จากอาหาร NGA	32
5	ประสิทธิภาพการป้องกันใบพืชของแบคทีเรียปฏิชีวนาจากการเข้าทำลายโดยรา <i>C. gloeosporioides</i>	35
6	การยับยั้งการงอกของสปอร์รา <i>C. gloeosporioides</i> โดยจุลินทรีย์ผิวพืชที่แยกได้โดยใช้อาหาร GYP	38
7	การยับยั้งการสร้าง fruiting body ของรา <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> โดยจุลินทรีย์ปฏิชีวนาด้วยเทคนิค leaf disk assay หลังการบ่มเชื้อ 7 วัน	42
8	การควบคุมการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนผลชมพูโดยจุลินทรีย์ปฏิชีวนาหลังการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 7 วัน	44
9	อาการโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วงน้ำดอกไม้ เมื่อหยดเซลล์แขวนลอยของจุลินทรีย์ปฏิชีวนาก่อนปลูกรา <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 7 วัน	48

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
10	อาการโรคแอนแทรกโนสบนผลมะม่วงน้ำดอกไม้เมื่อหยดเซลล์แขวนลอยของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์พร้อมปลูกรา <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> และบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 7 วัน	49
11	อาการโรคแอนแทรกโนสบนผลมะม่วงน้ำดอกไม้เมื่อหยดเซลล์แขวนลอยของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์หลังปลูกรา <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 7 วัน	50
12	อาการโรคแอนแทรกโนสบนผลมะม่วงโชคอนันต์เมื่อหยดเซลล์แขวนลอยของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ก่อนปลูกรา <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 7 วัน	53
13	อาการโรคแอนแทรกโนสบนผลมะม่วงโชคอนันต์เมื่อหยดเซลล์แขวนลอยของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์พร้อมกับปลูกรา <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> และบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 7 วัน	54
14	อาการโรคแอนแทรกโนสบนผลมะม่วงโชคอนันต์เมื่อหยดเซลล์แขวนลอยของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์หลังปลูกรา <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 7 วัน	55
15	กลไกการยับยั้งการงอกและความยาวของ germ tube จากสปอร์รา <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> โดยการหยดเซลล์แขวนลอยหรือ culture filtrate ของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์บนแผ่นสไลด์พร้อมสปอร์แขวนลอยของรา บ่มในสภาพชื้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่กำลังขยาย 400 เท่า	59

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
16	กลไกการยับยั้งการพัฒนของเส้นใยของรา <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> โดยการหยดเซลล์แขวนลอยหรือ culture filtrate ของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์บนแผ่นสไลด์หลังหยดสปอร์รา 12 ชั่วโมง บ่มในสภาพชื้นจนครบเวลา 36 ชั่วโมง ที่กำลังขยาย 400 เท่า	62
17	ลักษณะโคโลนีของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์บนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ	66
18	ลักษณะรูปร่างเซลล์ของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า	67

การคัดเลือกและศักยภาพของจุลินทรีย์ผิวพืชในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของ มะม่วงหลังการเก็บเกี่ยว

Phylloplane Microorganisms, Screening and Disease Control Potential towards Postharvest Anthracnose of Mango

คำนำ

มะม่วง (*Mangifera indica* L.) เป็นผลไม้ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย มีการปลูกอย่างแพร่หลายทั่วทุกภาคของประเทศ โดยมีจุดประสงค์การปลูกเพื่อใช้รับประทานทั้งผลดิบ ผลสุก และแปรรูป ผลผลิตมะม่วงส่วนใหญ่ใช้บริโภคภายในประเทศ มีเพียงบางส่วนที่ส่งออกจำหน่ายยังต่างประเทศในรูปผลสุก และแปรรูป ในปี 2541 ประเทศไทยมีผลผลิตมะม่วงทั้งหมด 994,708 ตัน ส่งออกจำหน่ายยังต่างประเทศในรูปผลสดและผลิตภัณฑ์ 15,735 ตัน มูลค่า 407.553 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2543) แม้ว่าตลาดจะมีความต้องการมะม่วงไทยเพิ่มสูงขึ้น แต่การส่งออกกลับถูกจำกัดด้วยอุปสรรคที่สำคัญคือ ปัญหาการเน่าเสียของผลมะม่วงอันเนื่องมาจากโรคภายหลังการเก็บเกี่ยวในระหว่างการขนส่ง และเก็บรักษา โรคแอนแทรคโนสซึ่งเกิดจากรา *Colletotrichum gloeosporioides* เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ความเสียหายอย่างรุนแรงในผลมะม่วงหลังการเก็บเกี่ยวของประเทศไทย จากการสำรวจมะม่วงจากแหล่งต่างๆ ของอังสุมา (2530) พบว่ามะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ไม่มีการเกิดโรคแอนแทรคโนสมากที่สุด (63.15 เปอร์เซ็นต์) รองลงมาคือพันธุ์หนังกลางวัน แก้ว ทองคำ และอกร่อง ตามลำดับ

การใช้สารเคมีควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยวของผลไม้ในปัจจุบันนี้ประสบปัญหาเรื่องสารพิษตกค้างเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคและการต้านทานต่อสารเคมีของราสาเหตุโรค (Farungsang and Farungsang, 1992; Janiscwicz and Korsten, 2002) การใช้น้ำร้อน (hot water treatment) และการควบคุมสภาพบรรยากาศในการเก็บรักษา (modified atmosphere) สามารถลดการเกิดโรคได้ในระดับหนึ่ง แต่ยังมีข้อจำกัดด้านสรีรวิทยาของผลมะม่วงและค่าใช้จ่ายที่สูง (จริงแท้, 2546; Jeffries *et al.*, 1990) ดังนั้นการควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยวของผลไม้โดยชีววิธีจึงเป็นอีกทางเลือกที่น่าสนใจและมีโอกาสประสบความสำเร็จ (Wilson and Pusey, 1985; Farungsang *et al.*, 1997)

จุดมุ่งหมายของงานทดลองในครั้งนี้เพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในสภาพธรรมชาติมาควบคุมการเกิดโรคแอนแทรคโนสของผลิตผลหลังเก็บเกี่ยวเพื่อทดแทนการใช้สารเคมี

วัตถุประสงค์

1. เพื่อค้นหาจุลินทรีย์ที่เป็นปฏิปักษ์ต่อรา *Colletotrichum gloeosporioides* จากสภาพสวนไม้ผลเขตร้อน
2. เพื่อคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมการเจริญของรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงในระดับห้องปฏิบัติการ
3. เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่คัดเลือกได้ในการควบคุมการเกิดโรคแอนแทรคโนสหลังการเก็บเกี่ยวบนผลมะม่วง

การตรวจเอกสาร

1. มะม่วง

มะม่วงมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Mangifera indica* Linn อยู่ในวงศ์ Anacardiaceae มีถิ่นกำเนิดอยู่ในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และอินเดีย มีลักษณะเป็นไม้ยืนต้นขนาดกลางถึงขนาดใหญ่ กิ่งก้านสาขาแผ่เป็นทรงพุ่มกลมกว้างหนาแน่นทึบ มีระบบรากแก้วสามารถชอนไชลงใต้ดินได้ลึกพอสมควร โดยทั่วไปรากดูดซึมอาหารอยู่ที่บริเวณผิวดินจนถึงระดับความลึก 30-60 เซนติเมตร แผ่รอบทรงพุ่ม ลำต้นตรงแข็งแรง เปลือกสีน้ำตาลเทา มีลักษณะขรุขระและมีเกล็ดมาก เนื้อไม้เมื่อแก่สามารถนำมาแปรรูปใช้ในการก่อสร้างได้ ใบมะม่วงเป็นใบเดี่ยว ไม่มีขนผิวใบเป็นมัน ใบมีรูปร่างหลายแบบ เช่น รูปไข่ รูปหอก รูปไข่ และเรียวยาว ออกดอกที่ปลายกิ่งหรือตามกิ่ง ดอกมะม่วงเรียงตัวเป็นช่อย่อยแบบ cyme มีกลิ่นหอม แต่ละช่อดอกประกอบด้วยดอกเพศผู้และดอกสมบูรณ์เพศ ผลมะม่วงเป็นแบบ flesh drup แต่ละพันธุ์มีความแตกต่างกันในเรื่องของขนาด รูปร่าง สี ปริมาณเสี้ยน รสชาติและกลิ่น เมล็ดมีตั้งแต่ขนาดเล็กจนถึงเมล็ดลิบ หรือไม่มีเมล็ด เปลือกหุ้มเมล็ดมีเยื่อหุ้มชั้นนอกและชั้นใน ใบเลี้ยง 2 อัน อาหารเลี้ยงชีพจะไม่อยู่ในใบเลี้ยง มะม่วงสามารถปลูกได้ตั้งแต่ในดินเหนียวจนถึงดินทรายแต่ที่เหมาะสมที่สุดคือดินร่วน และมีสภาพเป็นกรดอ่อนจนถึงเป็นกลางคือมีระดับ pH ระหว่าง 5.5-7.5 และระดับน้ำใต้ดินควรห่างจากผิวดิน 2-3 เมตร อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของมะม่วงควรมีค่าเฉลี่ยต่อปีอยู่ในช่วง 21.1-26.7 องศาเซลเซียส ในประเทศไทยมะม่วงมีการออกดอกในช่วงเดือนธันวาคมถึงเดือนกุมภาพันธ์เนื่องจากเป็นช่วงที่มีอุณหภูมิเหมาะสมในการกระตุ้นการออกดอก คือมีอุณหภูมิระหว่าง 15-20 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5-10 วัน และหลังดอกบานเต็มที่ประมาณ 100 วัน เป็นช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการเก็บเกี่ยวผลมะม่วง การขยายพันธุ์มะม่วงสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การเพาะเมล็ด การติดตา การเสียบยอด การต่อกิ่ง การตอน วิธีที่เป็นที่นิยมมากที่สุดในปัจจุบันคือการทาบกิ่งเนื่องจากต้นทุนที่ได้มีลักษณะตรงตามพันธุ์เดิมและมีระบบรากแก้วที่แข็งแรงเช่นเดียวกับการเพาะเมล็ด (เฉลิมชัย, 2539)

2. โรคแอนแทรคโนสในมะม่วง

โรคแอนแทรคโนสในมะม่วงมีสาเหตุมาจากรา *Colletotrichum gloeosporioides* การเกิดโรคสามารถพบได้ทุกระยะการเจริญเติบโตของมะม่วงตั้งแต่ในแปลงปลูกจนกระทั่งหลังการเก็บเกี่ยว ในสภาพแปลงมักพบโรคระบาดรุนแรงในระยะแตกใบอ่อนและแทงช่อดอกในฤดูฝนหรือ

ช่วงที่อากาศมีความชื้นสูง (Dodd *et al.*, 1992) โดยพบใบมะม่วงเป็นจุดสีน้ำตาลเนื้อเยื่อกลางจุดมักแตกหลุดร่อนเป็นรู ทำให้ใบอ่อนที่กำลังโตมีการยืดตัวของใบไม่สม่ำเสมอ ช่อดอกที่ถูกราเข้าทำลายมีอาการเน่าดำแห้งและร่วง เราสามารถเข้าทำลายผลอ่อนตั้งแต่ระยะที่ยังเป็นรังไข่และพักตัวในเนื้อเยื่อได้ ผิวผล เมื่อสภาพแวดล้อมมีฝนตกชุกความชื้นสูง พบแสดงอาการลักษณะเป็นจุดสีดำกระจายบนผลทำให้ผลมะม่วงเป็นแผลแตกตามความยาวของผล และอาจพบจุดดำเป็นทางยาวตามแนวไหลของน้ำค้ำ (tear stain) ทำให้ก้นผลเน่าดำรุนแรงกว่าที่ขั้วและไหลผล ผลมะม่วงส่วนใหญ่ที่ยังไม่แสดงอาการโรคในระยะก่อนเก็บเกี่ยว มักเริ่มพบอาการเมื่ออยู่ในระหว่างการบ่มและผลสุก เมื่อผลมะม่วงสุกงอมมากขึ้นแผลจะขยายโต และยวบตัวลงเล็กน้อยเป็นแอ่งบุ๋ม บริเวณกลางแผลปรากฏ acervulus ของราลักษณะเป็นจุดกลมมนขนาดเล็ก เมื่อ acervulus แตกออกจะเห็นกลุ่มสปอร์สีส้มหรือส้มอมชมพู ทำให้ผลมะม่วงเน่าเนิ่นมึนกลิ่นหมัก สปอร์สามารถแพร่กระจายไปตามน้ำฝน และเจริญเติบโตได้ดีในสภาพอากาศร้อนชื้น (อังสุมา, 2530; นิพนธ์, 2542)

3. ลักษณะวิทยาของรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc.

รา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. เป็นระยะ asexual stage ของ *Glomerella cingulata* (Stonem.) Spauld. And von Schrenk. สามารถพบได้ทั่วไปในเขตร้อนชื้นและกึ่งร้อนทั่วโลก เป็นสาเหตุให้เกิดโรคแอนแทรคโนสกับส่วนที่อยู่เหนือดินของพืชอาศัย ได้แก่ ใบ กิ่งอ่อน ดอก และผล มีกลุ่มพืชอาศัยกว้างทั้งพืชไร่ ผัก วัชพืช และไม้ยืนต้น รวมไม่ต่ำกว่า 197 ชนิด ประกอบด้วยพืชเศรษฐกิจที่สำคัญในเขตร้อน และเขตกึ่งร้อน เช่น อโวคาโด กล้วย มะม่วง มะละกอ ขางพารา มันเทศ พริก เป็นต้น (Farr *et al.*, 1989; Uhm *et al.*, 2003) เราสามารถเข้าทำลายได้ทุกระยะการเจริญเติบโตของพืช แต่พบทำความเสียหายมากในผลิตผลหลังเก็บเกี่ยวที่เริ่มสุกซึ่งอยู่ระหว่างการขนส่งและเก็บรักษา (Tandon and Singh, 1968)

Barnett and Hunter (1987) ได้จำแนกรา *C. gloeosporioides* ตามลักษณะทางอนุกรมวิธานไว้ดังนี้

Kingdom	Fungi
Division	Eumycota
Class	Deuteromycetes
Order	Melanconiales

Family	Melanconiaceae
Genus	<i>Colletotrichum</i>
Species	<i>C. gloeosporioides</i>

บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA มีลักษณะโคโลนีสีเทาอ่อนจนถึงเทาเข้ม กลม ขอบเรียบ ราบสร้างกลุ่มสปอร์ (spore mass) สีส้ม ถึงส้มอมชมพู มีลักษณะเป็นวงแหวน เส้นใยฟูเล็กน้อย แต่ละไอโซเลตอาจแตกต่างกันได้บ้างเล็กน้อยในเรื่องความหนาแน่น และสีของกลุ่มสปอร์ ราบสร้าง fruiting body เรียกว่า acervulus รูปร่าง cushion-shaped อาจมีหรือไม่มี setae เป็นที่เกิดของสปอร์ โดยทั่วไปสปอร์มีรูปร่างทรงกระบอก ปลายมน ไส เซลล์เดียว ขนาด 12-17 X 3.5-6 ไมครอน สร้าง appressorium รูปร่างค่อนข้างกลม หรือทรงกระบอก สีนํ้าตาล ขนาด 6-20 X 4-12 ไมครอน (Sutton, 1980; Barnett and Hunter, 1987)

4. การเข้าทำลายพืชของรา *Colletotrichum* spp.

รา *Colletotrichum* spp. สามารถทำความเสียหายได้กับทุกส่วนของพืชอาศัย ได้แก่ ราก ลำต้น ใบ ดอก และผล โดยมีความเฉพาะเจาะจงในการเข้าทำลายส่วนที่เป็นเนื้อเยื่ออ่อน จากการศึกษาที่ผ่านมาทำให้ทราบว่ารา *Colletotrichum* spp. มีรูปแบบการเข้าทำลายที่มีลักษณะเฉพาะทำให้เกิดอาการโรคแอนแทรคโนสบนพืชอาศัย (Perfect *et al.*, 1999) เมื่อสปอร์ราซึ่งแพร่กระจายโดยลม หรือกระเด็นตามหยดน้ำมาสัมผัสกับผิวของพืชอาศัยจะมีการยึดเกาะพื้นผิวบริเวณนั้น (spore adhesion) โดยสารเหนียวที่ปกคลุมอยู่รอบสปอร์เรียกว่า spore matrix หรือ mucilaginous material ซึ่งมีคุณสมบัติยับยั้งการงอกของสปอร์เพื่อป้องกันอันตรายที่อาจเกิดขึ้นกับรากจากสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น ความชื้นสัมพัทธ์ต่ำ อุณหภูมิที่สูงหรือต่ำเกินไป รังสีอัลตราไวโอเลต และสารพิษที่พืชผลิตได้แก่ ฟีนอล และแทนนิน (Nicholson, 1986) หลังจากนั้น 12-48 ชั่วโมงเมื่ออยู่ในสภาพความชื้นสัมพัทธ์ 95-100 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียส สปอร์มีการแบ่งเซลล์เกิดเป็น septum ก่อนที่จะงอก germ tube ขึ้นๆ ขนาด 10-20 ไมครอน และมีการสร้าง appressorium รูปร่างค่อนข้างกลม หรือทรงกระบอก ไม่มีสีย้อมที่ปลายซึ่งเป็นลักษณะของรา *Colletotrichum* spp. และเป็นโครงสร้างสำคัญในการเข้าทำลายพืช เมื่อ appressorium มีอายุมากขึ้น 12-24 ชั่วโมง ผนังจะหนาและเปลี่ยนจากไม่มีสีกลายเป็นสีน้ำตาลเข้มจากการสะสมเมลานิน แล้วงอก infection peg จาก appressorium ด้านที่สัมผัสกับผิวพืชแทงทะลุผ่านชั้น cuticle และ epidermis เข้าสู่พืชได้ด้วยการใช้แรงดัน (mechanical force) ร่วมกับการสร้างเอนไซม์คิวตินเอสออก

มาย่อยสารคิวตินที่เคลือบผิวพืชโดยไม่จำเป็นต้องอาศัยบาดแผลหรือช่องเปิดธรรมชาติ (Kuo, 1999) เมื่อราเข้าครอบครองเซลล์พืชได้แล้วจึงเริ่มกระบวนการเข้าทำลายพืชแบบ hemibiotroph ซึ่งแบ่งเป็น 2 ระยะ ได้แก่ ในระยะแรกมีการพัฒนาเส้นใยที่เรียกว่า intracellular hypha อยู่ภายในเซลล์พืชนั้น โดยยังไม่ทำอันตรายกับเซลล์พืช ต่อมาเมื่อมีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมจึงมีการพัฒนา intercellular hypha เข้าทำลายเซลล์พืชข้างเคียงทำให้เกิดอาการเซลล์ตายลุกลามเป็นแผลในรูปแบบเฉพาะของอาการโรคแอนแทรคโนส (Jeffries *et al.*, 1990; Bailey *et al.*, 1992; Son-Quang, 2002)

การศึกษากระบวนการเข้าทำลายแบบแฝง (quiescent infection) ของโรคแอนแทรคโนสที่เกิดกับผลผลิตหลังการเก็บเกี่ยวพบว่า ราสามารถพักตัวอยู่บนผลมะม่วงภายหลังการสร้าง appressorium แล้ว โดยมี appressorial matrix ปกคลุมอยู่จนกระทั่งถึงช่วงเวลาที่เหมาะสมแล้วจึงงอก infection hypha เข้าทำลายพืชต่อไป นอกจากนี้การพักตัวของราอาจเกิดขึ้นในระหว่างการพัฒนา intracellular hypha ซึ่งอยู่ภายในเซลล์พืชที่มีชีวิตได้เช่นกัน

อังสุมา (2530) ศึกษาการเข้าทำลายของรา *C. gloeosporioides* ที่อยู่บนผิวผลงอก germ tube แล้วสร้าง appressorium เกาะยึดผิวมะม่วง จากนั้นจึงสร้าง infection บนผลมะม่วง เริ่มจากสปอร์ hypha แทงลงไปบนผิวมะม่วงภายในเวลา 18-24 ชั่วโมง ผ่านชั้น cuticle ลงไปอยู่ในชั้น epidermis และ sub-epidermis ลึกลงไปจากผิวนอก 2-3 ชั้นของเซลล์ หรือประมาณ 90-205 ไมครอน โดยเส้นใยอยู่ระหว่างเซลล์ (intercellular) แล้วพักตัวอยู่เช่นนั้น กระทั่งผลมะม่วงเริ่มสุกราก็เจริญขยายการทำลายผลมะม่วงต่อไป เนื่องจากเมื่อกระบวนการสุกเกิดขึ้น แป้งเปลี่ยนเป็นน้ำตาล กรดอินทรีย์อาจเปลี่ยนไปเป็นน้ำตาล หรือถูกใช้ไปในการหายใจทำให้ความเป็นกรดลดลง สารประกอบฟีนอล ซึ่งมีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญเติบโตของราที่เข้าไปในเซลล์พืชมีปริมาณลดลง (จริงแท้, 2546) ส่งผลให้ราสามารถใช้อาหารและเจริญเติบโตได้ดี ขณะที่อัตราการผลิตเอทิลีนและการหายใจของผลมะม่วงที่เป็นโรคเพิ่มขึ้นกว่าผลมะม่วงปกติ พบว่าเปอร์เซ็นต์น้ำตาลภายในผลมะม่วงเริ่มลดลงเรื่อยๆ เมื่อผลมะม่วงแสดงอาการเป็นโรคมามากขึ้น จึงทำให้ผลมะม่วงมีคุณภาพและอายุการเก็บรักษาลดลง (Nadel *et al.*, 1985; ศุสดี 2529)

5. วงจรและการแพร่ระบาดของโรคแอนแทรคโนส

รา *C. gloeoporioides* สามารถดำรงวงจรโรคและพร้อมเข้าทำลายพืชอาศัยในสวนผลไม้ทั้งในระยะ sexual stage โดยการสร้าง ascospore และระยะ asexual stage โดยการสร้างสปอร์ที่เรียกว่า conidium ด้วยการดำรงชีวิตแบบ saprophyte อยู่บนเศษซากกิ่งไม้ ใบไม้ เพื่ออยู่ข้ามฤดู (Barki-Golan, 2001) สปอร์ที่ติดอยู่ภายในทรงพุ่ม เช่น บนใบ ช่อดอก ที่เป็นโรค และสปอร์ที่อยู่บริเวณผิวผลหรือเข้าทำลายแบบแฝงในเนื้อเยื่อพืชปกติ เมื่อมีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม สามารถกลายเป็นแหล่งแพร่กระจายสปอร์สำหรับการระบาดของโรคในฤดูถัดไป โดยมีลมและน้ำฝนเป็นพาหะสำคัญ อย่างไรก็ตามจากการศึกษาเปรียบเทียบอิทธิพลของปริมาณน้ำฝนต่อการเกิดโรคแอนแทรคโนสของ Dodd *et al.* (1989) พบว่าในสวนผลไม้ที่มีฝนตกปริมาณน้อยแต่ตกติดต่อกันเป็นระยะเวลานานจะมีการระบาดของโรคมากกว่าสภาพที่ฝนตกหนักในระยะเวลาสั้นๆ เนื่องจากปริมาณน้ำฝนจำนวนมากสามารถชะสปอร์ออกจากผิวผลไม้ได้ สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมสำหรับการออกและเข้าทำลายพืชอาศัยของสปอร์รา คือสภาพที่มีความชื้นสูงและมีอุณหภูมิที่เหมาะสมประมาณ 20-25 องศาเซลเซียส เป็นเวลาไม่ต่ำกว่า 4 ชั่วโมง ดังนั้นจึงพบว่าในช่วงฤดูฝนมักมีการระบาดของโรคแอนแทรคโนสอย่างรุนแรง เนื่องจากสภาพแวดล้อมเหมาะสมกับการเจริญของรา ประกอบกับเป็นช่วงที่พืชมีการพัฒนาเนื้อเยื่อเจริญซึ่งเป็นระยะที่อ่อนแอต่อการเข้าทำลายของรา (Waller, 1992)

6. การควบคุมโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วง

6.1 การควบคุมโรคโดยวิธีเขตกรรม

การควบคุมโรคในแปลงปลูกทำได้โดยการตัดแต่งกิ่งระยะต้นโตให้โปร่งทำให้ภายในทรงพุ่มมีอากาศถ่ายเทและแสงแดดส่องได้อย่างทั่วถึง การทำความสะอาดแปลงเก็บและทำลายเศษซากพืชเพื่อลดการสะสมของเชื้อสาเหตุโรค เมื่อมะม่วงอยู่ในระยะแตกใบอ่อน แทะช่อดอก และติดผลอ่อน ฉีดพ่นทรงพุ่มด้วยสารป้องกันกำจัดรา benomyl หรือ carbendazim สลับกันกับ mancozeb ทุก 7-10 วัน ร่วมกับการห่อผล จะสามารถลดการเกิดโรคแอนแทรคโนสในระหว่างการเก็บรักษา (วัลภา และ คารา, 2523; นิพนธ์, 2542)

6.2 การควบคุมโรคภายหลังการเก็บเกี่ยว

6.2.1 การควบคุมปัจจัยทางกายภาพและบรรยากาศ

การเก็บรักษาผลมะม่วงที่สภาพอุณหภูมิต่ำ 10 องศาเซลเซียส ไม่ควรต่ำกว่า 7.5 องศาเซลเซียส สามารถยืดอายุการเก็บรักษาแต่ต้องคำนึงถึงความเสี่ยงจากอาการสะท้านหนาว (chilling injury) ที่อาจขึ้นกับผลผลิตด้วย ความชื้นในห้องเก็บรักษาผลผลิตที่มากจะสามารถกระตุ้นการงอกของสปอร์ราแต่หากความชื้นต่ำเกินไปจะทำให้ผลผลิตสูญเสียน้ำและเกิดอาการเหี่ยว การปรับสภาพห้องเก็บรักษาผลไม้มให้มีออกซิเจนลดลงและมีคาร์บอนไดออกไซด์เพิ่มขึ้นสามารถลดอัตราการหายใจของผล Mendoza (1973) รายงานว่าห้องเก็บควบคุมสภาพบรรยากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ และออกซิเจน 5 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส สามารถเก็บรักษามะม่วงพันธุ์คาราบาวได้นาน 35-40 วัน การแช่ผลมะม่วงในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที สามารถลดอาการโรคแอนแทรคโนสได้ แต่อุณหภูมิที่สูงจะเร่งอัตราการหายใจและการผลิตสารเอทิลีนภายในผล จำเป็นต้องทำให้เย็นลงโดยใช้ลมโกรกหรือใช้น้ำเย็น (วิจิตร, 2523) นิพนธ์ และคณะ (2538) ทำการรมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 100 เปอร์เซ็นต์ กับมะม่วงน้ำดอกไม้เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง สามารถชะลอการเกิดโรคแอนแทรคโนสได้ และการรมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เข้มข้นนาน 72 ชั่วโมง สามารถลดการเน่าเสียจากโรคแอนแทรคโนส แต่ผลมะม่วงเกิดการหายใจแบบไม่ใช้ออกซิเจนทำให้เกิดกลิ่นหมัก และการหุ้มผลไม้ด้วยฟิล์มพลาสติกไม่สามารถควบคุมอาการ โรคแอนแทรคโนสได้ (Miller *et al.*, 1986)

6.2.2 การควบคุมโรคโดยใช้สารเคมี

แต่เดิมการควบคุมโรคแอนแทรคโนสนิยมใช้สารเคมีในกลุ่ม benzimidazole ได้แก่ benomyl carbendazim benzimidazole และ thiophanate ทั้งระยะก่อนและหลังเก็บเกี่ยว ซึ่งเป็นกลุ่มสารเคมีที่เสี่ยงสูงต่อการชักนำความต้านทานของรา เนื่องจากมีกลไกการออกฤทธิ์ไปยับยั้งการสังเคราะห์สารพันธุกรรมของ ทำให้ราเกิดการเปลี่ยนแปลงของพันธุกรรม ในเวลาต่อมาจึงมีรายงานพบว่ารา *C. gloeosporioides* มีพัฒนาการสามารถต้านทานต่อสารเคมีในกลุ่มนี้ได้ และมี การจำกัดการใช้สารเคมีเหล่านี้ในหลายประเทศ (Farungsang and Farungsang, 1992; Prior *et al.*, 1992) รายงานของ Spalding (1982) ที่ใช้สารเคมี imazalil ซึ่งเป็นสารเคมีที่มีความเสี่ยงต่อการเกิด ความต้านทานของราในระดับปานกลาง โดยใช้ที่ความเข้มข้น 1,000 ppm สามารถควบคุมโรคข้าว

ผลเน่าจากรา *Phomopsis citri* ได้ดีกว่าการใช้สารเคมี thiabendazole และ thiophanate-methyl ปัจจุบันจึงนิยมใช้สารเคมี prochloraz ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสทดแทนสารเคมีกลุ่มดังกล่าว แม้จะมีประสิทธิภาพต่ำกว่าและไม่สามารถควบคุมโรคข้อผลเน่าที่เกิดจาก *Lasiodiplodia theobromae* (อรุณี, 2533) นอกจากนี้การใช้สารเคมีในผลผลิตหลังการเก็บเกี่ยวยังต้องคำนึงถึงปริมาณสารพิษตกค้างในเนื้อเยื่อพืชเนื่องจากมีผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภคโดยตรง ทศพร (2537) ทดสอบหาสารพิษตกค้างโดยวิธี bioassay ในผลกล้วยหอมที่จุ่มสารเคมี imazalil ความเข้มข้น 250 ppm นาน 3 นาที หลังจากนั้น 1 ชั่วโมง พบว่ามีปริมาณสารพิษตกค้าง 44 ppm ที่เปลือกด้านนอก และหลัง 20 ชั่วโมง พบสารพิษตกค้างในเปลือกด้านนอก 12 ppm เปลือกด้านใน 13 ppm และไม่พบสารพิษตกค้างในเนื้อเยื่อของกล้วยหอมหลังจุ่มสารเคมี 40 ชั่วโมง Brown and Dezman (1990) รายงานว่าหลังจุ่มผลส้มในสารเคมี imazalil ความเข้มข้น 1,000 ppm นาน 15 วินาที ที่ทิ้งพักไว้ 40-45 นาที สารดังกล่าวสามารถแทรกซึมเข้าไปในผิวเปลือกได้มากกว่า 1 มิลลิเมตร และมีปริมาณสารตกค้าง 40 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเก็บรักษาผลส้มที่อุณหภูมิ 21 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 88-92 เปอร์เซ็นต์ นาน 0, 1, 2 และ 7 วัน พบสารพิษตกค้าง 2.15, 2.39, 2.30 และ 2.40 ppm ตามลำดับ

6.2.3 การควบคุมโรคโดยชีววิธี

การควบคุมโรคโดยชีววิธีในผักและผลไม้หลังการเก็บเกี่ยวเป็นอีกทางเลือกที่มีความจำเป็นเพื่อหลีกเลี่ยงผลกระทบจากการใช้สารเคมีในปัจจุบันจึงมีงานทดลองมากมายที่ศึกษารายงานถึงการประสบผลสำเร็จในนำจุลินทรีย์ต่างๆ ทั้งรา แบคทีเรีย และยีสต์ มาควบคุมโรคพืช ซึ่งมีคำเรียกจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคเหล่านี้ว่า จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (antagonist) รายงานส่วนใหญ่ที่ปรากฏเป็นรายงานการควบคุมโรคที่เกิดหลังการเก็บเกี่ยวที่มีสาเหตุมาจากการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรครกภายหลังการเก็บเกี่ยว (postharvest infection) ซึ่งแตกต่างจากโรคที่เกิดหลังการเก็บเกี่ยวบนผลผลิตเมื่อมีสาเหตุมาจากการเข้าทำลายแบบแฝง (quietcent infection) ของเชื้อสาเหตุโรคตั้งแต่ระยะก่อนการเก็บเกี่ยว (field infection) และทฤษฎีการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคพืชหลังการเก็บเกี่ยวมีแนวโน้มที่จะประสบความสำเร็จได้มากกว่าการใช้ในสภาพแปลงปลูกเนื่องจากสามารถจัดการสภาพแวดล้อมในการเก็บรักษาผลผลิตให้เหมาะสมต่อการเจริญและดำรงความเป็นปฏิปักษ์ได้ (Wilson and Wisniewski, 1989)

มีผู้เสนอทฤษฎีแหล่งที่มีแนวโน้มในการเสาะหาและแยกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ได้สำเร็จ Baker and Cook (1974) เสนอว่า จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ควรหาได้จากส่วนของพืชที่ไม่เป็นโรคถึงแม้พืช

นั่นจะเป็นสายพันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรคก็ตาม และ Janisewicz (1996) เสนอว่าการแยกจุลินทรีย์ ปฏิบัติจากสภาพสวนธรรมชาติที่ปราศจากการจัดการและการใช้สารเคมีมีแนวโน้มประสบความสำเร็จสูงกว่าสวนที่มีการใช้สารเคมีเนื่องจากประชากรจุลินทรีย์ในธรรมชาติบริเวณนั้นไม่ถูกรบกวน

คุณสมบัติของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ควรสามารถปรับตัวและเจริญเติบโตได้ดีในสภาพแวดล้อมบนผิวผลไม้ที่มีความผันแปรของหลายปัจจัย เช่น อุณหภูมิ ความชื้นกรดต่าง และ ปริมาณสารอาหารที่มีอยู่จำกัด เป็นต้น เพื่อประสิทธิภาพที่ดีในการยับยั้งโรค กลไกการทำงานของ จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในสภาพธรรมชาติมีหลายลักษณะ โดยกลไกที่สำคัญและมีรายงานพบมากคือ การ ปลดปล่อยปฏิชีวนสาร (antibiosis) ซึ่งเป็นสารประกอบโมเลกุลต่ำที่ได้จากกระบวนการ secondary metabolism ไปยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืชโดยตรง (Blackman and Fokkema, 1982) ดังมีรายงานครั้งแรกของการศึกษาเรื่องจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคพืชหลังการเก็บเกี่ยวมีโดยใช้แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ไอโซเลต B3 ควบคุมโรคผลเน่าสีน้ำตาล (brown rot) ของผลพืชโดยมีสาเหตุจากรา *Monilinia fructicola* (Pusey and Wilson, 1984) การใช้สาร agrocin จากแบคทีเรีย *Agrobacterium radiobacter* ไอโซเลต K-84 ในการควบคุมโรคปุ่มปม (crown gall) ของมันฝรั่งที่มีสาเหตุจากแบคทีเรีย *A. tumefaciens* ได้สำเร็จและมีการวิจัยอย่างต่อเนื่องจนสามารถพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ทางการค้าในปัจจุบัน (Cooksey and Moore, 1982)

การที่จุลินทรีย์ปฏิปักษ์สามารถปรับตัวอยู่ได้ในสภาพแวดล้อมเดียวกับเชื้อสาเหตุโรคแล้วสามารถแข่งขันใช้สารอาหารและแย่งพื้นที่ครอบครองผิวผลไม้จากเชื้อสาเหตุโรคได้สำเร็จ (competition) การชักนำให้พืชเกิดความต้านทานโรค (induce resistance) การเป็นปรสิตกับพืชโดยตรง (parasitism) เช่นการมีโครงสร้างที่สามารถเจาะทะลุเซลล์ของเชื้อสาเหตุโรคเพื่อใช้สารอาหารที่อยู่ภายใน และการสร้างเอนไซม์ออกมาย่อยสลายองค์ประกอบของเซลล์ที่อยู่ในผนังเซลล์ของเชื้อสาเหตุโรค (production of lytic enzyme) เป็นลักษณะกลไกที่น่าสนใจและนำมาใช้ในผลผลิตหลังการเก็บเกี่ยว เนื่องจากไม่มีสารพิษตกค้างบนผลผลิต Saligkarias *et al.* (2002) รายงานว่าการคัดเลือกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ยีสต์ *Candida guilliermondii* สายพันธุ์ 101 และ US7 และ *Candida oleophila* สายพันธุ์ I-182 ที่แยกได้จากลำต้นมะเขือเทศสามารถควบคุมการเข้าทำลายของรา *Botrytis cinerea* ได้ โดยมีกลไกการทำงานในการแย่งใช้สารอาหาร

Wisniewski *et al.* (1991) ศึกษากลไกการควบคุมรา *Botrytis cinerea* โดยยีสต์ *Pichia guilliermondii* ตรวจพบว่า ยีสต์สามารถผลิตเอนไซม์ β -(1-3) glucanase ออกมาย่อยผนังของผนังเส้นใยรา

ในการควบคุมโรคของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์แต่ละชนิดที่ประสบความสำเร็จอาจมีลักษณะการทำงานได้มากกว่าหนึ่งกลไกจึงสามารถลดอัตราเสี่ยงต่อการชักนำให้เชื้อสาเหตุโรคเกิดความต้านทานเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สารเคมี (Wilson and Wisniewski, 1989) โดยยีสต์ *Candida saitoana* สามารถใช้กลไกการแข่งขันใช้สารอาหารและแย่งพื้นที่กับเชื้อโรคร่วมกับการชักนำให้พืชเกิดความต้านทานโรคควบคุมรา *Botrytis cinerea* และ *Penicillium expansum* สาเหตุโรคผลเน่าในแอปเปิล (El Ghaouth *et al.*, 1998; Ippolito *et al.*, 2000) ยีสต์ *Candida pulcherrina* ใช้กลไกการแข่งขันใช้สารอาหารและแย่งพื้นที่กับเชื้อโรคร่วมกับการเข้าทำลายเชื้อสาเหตุโรคโดยตรง ได้แก่การเข้าเกาะ conidiophores และ conidium ของรา *B. cinerea* ทำให้ราไม่สามารถผลิตสปอร์เพิ่มสำหรับการเข้าทำลายพืชได้ (Cook, 2002)

การศึกษาถึงการนำจุลินทรีย์ปฏิปักษ์หลายชนิดที่มีกลไกการทำงานต่างกันมาใช้ควบคุมโรคร่วมกันพบว่ามีความโน้มทำให้ควบคุมโรคได้ดียิ่งขึ้น Guetsky *et al.* (2002) รายงานถึงการควบคุมโรค gray mold บนใบ และลำต้นสตรอเบอร์รี่ ซึ่งมีสาเหตุคือ *Botrytis cinerea* โดยใช้ยีสต์ *Pichia guilliermondii* ที่มีคุณสมบัติแข่งขันในการใช้ glucose, sucrose, adenine, histidine และ folic acid และสร้างสารประกอบที่สามารถยับยั้งสาเหตุโรคได้ ร่วมกับแบคทีเรีย *Bacillus mycoides* ที่สามารถสร้างสารประกอบออกมายับยั้งราและชักนำให้พืชเกิดความต้านทานโรค สามารถความรุนแรงของโรคได้ดีกว่าการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์แต่ละชนิดเพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญ

มีหลายงานวิจัยที่ศึกษาแนวทางในการส่งเสริมประสิทธิภาพการทำงานให้แก่จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ได้แก่ การใช้สารเสริมประสิทธิภาพการทำงานของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ โดยที่สาเหตุโรคไม่สามารถใช้ประโยชน์ได้ โดยการเติม calcium ทั้งที่อยู่ในรูป CaCl_2 และ calcium chelater (EGTA) เนื่องจากสารนี้มีอิทธิพลยับยั้งการงอกของสปอร์และการสร้าง appressorium ของรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Uhm *et al.*, 2003) ซึ่งสอดคล้องกับข้อเสนอของ Jeffries and Kooman (1992) เนื่องจาก appressorium เป็นโครงสร้างในการเข้าทำลายพืชของราที่สำคัญและมีความทนทานต่อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มากกว่า infection hypha รายงานของ Tian *et al.* (2002) พบว่า

การเติม calcium chloride 2%w/v มีผลยับยั้งการงอกเส้นใยและการเจริญของรา *Rhizopus stolonifer* สาเหตุโรคหลังการเก็บเกี่ยว ขณะเดียวกันเมื่อใช้ร่วมกับยีสต์ *Candida guilliermondii* และ *Pichia membranefaciens* พบว่าสามารถลดความรุนแรงของโรคได้ดีกว่าการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์อย่างเดียวได้อย่างมีนัยสำคัญ El-Ghaouth *et al.* (2000) ทำการศึกษาปัจจัยที่ส่งเสริมและยั่วยุการดำเนินกิจกรรมของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์แต่ไม่เป็นประโยชน์ต่อเชื้อสาเหตุโรคโดยการเติมน้ำตาลสังเคราะห์ 2-deoxy-D-glucose ร่วมกับสารละลายยีสต์ปฏิปักษ์ พบว่าได้ผลดีกว่าการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์เพียงอย่างเดียว การส่งเสริมประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์อาจทำได้โดยการใช้จุลินทรีย์ร่วมกับการควบคุมปัจจัยทางกายภาพ การเก็บรักษาผลผลิตที่อุณหภูมิต่ำดังรายงานการควบคุมโรคผลเน่าในส้มจากรา *P. italicum* โดยใช้ยีสต์ *Candida famata* ร่วมกับการเก็บรักษาผลส้มที่อุณหภูมิต่ำ (Arras *et al.*, 1998)

ปัจจุบันในต่างประเทศมีการวิจัยพัฒนาเพื่อจดสิทธิบัตรและขึ้นทะเบียนจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เป็นผลิตภัณฑ์ทางการค้าเพื่อใช้ในการควบคุมโรคพืชหลังการเก็บเกี่ยวยุหลายชนิดด้วยกัน โดยแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ B3 ได้รับการจดสิทธิบัตรเป็นลำดับแรก ในประเทศสหรัฐอเมริกา แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Pseudomonas syringae* สายพันธุ์ L-59-66 ซึ่งจดทะเบียนในชื่อ BioSave[®] โดยบริษัท EcoScience Corp. มีประสิทธิภาพควบคุมโรค blue mold ที่เกิดจากรา *Penicillium expansum* และ gray mold ที่เกิดจากรา *Botrytis cinera* ในแอปเปิล ยีสต์ปฏิปักษ์ *Candida oliophila* ในชื่อ Aspire[®] โดยบริษัท Ecogen-Israel Partnership, Ltd. มีประสิทธิภาพควบคุมโรค blue mold ที่เกิดจากรา *Penicillium italicum* และ green mold ที่เกิดจากรา *Penicillium digitatum* ในส้ม และผลิตภัณฑ์สำหรับการใช้ภายในแปลงปลูกซึ่งจดทะเบียนในประเทศแอฟริกาใต้ได้แก่ แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* sp. ในชื่อ Avogreen[®] มีประสิทธิภาพควบคุมโรค *Cercospora spot* และ แอนแทรคโนสในโอวากาโด

การศึกษาด้านการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีในประเทศไทยส่วนใหญ่พบเป็นการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคที่อยู่ในสภาพแปลงปลูก สำหรับการศึกษาด้านการควบคุมโรคพืชหลังการเก็บเกี่ยวโดยการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ยังพบมีรายงานจำนวนน้อย และเป็นการค้นหาจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในวงการอุตสาหกรรม หรือการพัฒนาวิธีการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีปฏิปักษ์จากสภาพธรรมชาติที่มีศักยภาพเหมาะสมสำหรับการพัฒนาเพื่อนำมาใช้แทนสารเคมีตลอดจนใช้ในการจัดการโรคพืชแบบผสมผสาน มณฑาทิพย์ (2540) ศึกษาการใช้ยีสต์ในอุตสาหกรรมอาหารควบคุมโรคข้าวผลเน่าบนผลมะม่วงน้ำดอกไม้ พบว่ายีสต์ *Candida tropicalis* สามารถยับยั้งการงอก และ

ความยาว germ tube ของ conidium รา *Lasiodiplodia theobromae* ได้ โดยที่ *Candida tropicalis* ไม่สร้างสารพิษในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยราสาเหตุโรคบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Farungsang *et al.* (1997, 1999) แยกจุลินทรีย์จากสภาพธรรมชาติ แล้วใช้วิธีการ leaf disk assay คัดเลือกจุลินทรีย์ปฏิบัติที่สามารถควบคุมการเกิดโรคผลเน่าภายหลังการเก็บเกี่ยวของเงาะที่มีสาเหตุจากราที่ติดมาจากแปลงได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทศวรรณ (2547) สามารถคัดเลือกยีสต์ *Candida krusei* และแบคทีเรีย *Bacillus amyloliquefaciens* ที่แยกได้จากทรงพุ่มของต้นเงาะแล้วนำมาใช้ควบคุมโรคผลเน่าในผลไม้ที่เกิดจากรา *Lasiodiplodia theobromae* ได้ผลดี

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การแยกและการเก็บรวบรวมจุลินทรีย์จากทรงพุ่มพีช

1.1 การแยกจุลินทรีย์โดยใช้อาหาร Nutrient Glucose Agar (NGA)

สุ่มเก็บตัวอย่างยอดอ่อน ช่อดอก และผลอ่อนของมะม่วง และอื่นๆ ได้แก่ ลำไย ฝรั่ง เงาะ และน้อยหน่า โดยวางแผนการเก็บต้นละ 3 จุกรอบทรงพุ่ม ส่วนละ 3 ต้น นำส่วนของพีชมาแช่ในน้ำนิ่งฆ่าเชื้อบนเครื่องเขย่า 150 รอบต่อชั่วโมง ที่สภาพอุณหภูมิห้อง จากนั้นนำ suspension ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาทำ dilution series ด้วยน้ำนิ่งฆ่าเชื้อ นำ suspension $10^{-1} - 10^{-5}$ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร มาทำการเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหาร Nutrient glucose agar (NGA) บ่มเชื้อ 24-48 ชั่วโมง สุ่มเก็บโคโลนีเดี่ยวจากผิวหน้าอาหารมา streak บนอาหาร NGA อีกครั้งเพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ ทำการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์นั้นบนอาหารแข็ง NA เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส สำหรับทำการทดลองต่อไป

1.2 การแยกจุลินทรีย์โดยใช้อาหาร Glucose Yeast Peptone Agar (GYPA) (Beech *et al.*, 197)

เก็บตัวอย่างพีชเช่นเดียวกับข้อ 1.1 โดยมีพีชดังนี้ มะม่วง ลำไย ฝรั่ง กระท้อน เงาะ ชมพู และน้อยหน่า นำตัวอย่างที่ได้มาเพิ่มปริมาณยีสต์ในอาหารเหลว Glucose yeast peptone broth (GYPB) pH 3.5 (Beech *et al.*, 1971) บนเครื่องเขย่า 150 รอบต่อชั่วโมง ที่สภาพอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15-20 ชั่วโมง จากนั้นนำ suspension ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาทำ dilution series ด้วย 1% peptone water นำ suspension $10^{-1} - 10^{-5}$ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร มาทำการเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหาร GYPA เพื่อทำการแยกจุลินทรีย์บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง นาน 2-7 วัน สุ่มเก็บโคโลนีเดี่ยวจากผิวหน้าอาหารมา streak บนอาหาร GYPA อีกครั้งเพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ ทำการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์นั้นบนอาหารแข็ง GYPA เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส สำหรับทำการทดลองต่อไป

2. การคัดเลือกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วง

ในการทดลองใช้รา *C. gloeosporioides* สายพันธุ์ 395-01-19 (CG-395) ซึ่งแยกได้จากอาการของโรคแอนแทรคโนสบนผลอ่อนที่เก็บตัวอย่างจาก อ. บ้านแพ้ว จ. สมุทรสาคร

2.1 การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่แยกได้โดยใช้อาหาร NGA

2.1.1 ความสามารถในการยับยั้งการเจริญเส้นใยของรา *C. gloeosporioides*

ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.8 เซนติเมตร เจาะเส้นใยบริเวณขอบโคโลนีเชื้อรา *C. gloeosporioides* อายุ 7 วัน แล้วย้ายชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยมาวางบนจานอาหาร PDA บ่มเชื้อไว้ 48 ชั่วโมง จากนั้นย้ายเชื้อแบคทีเรียทดสอบอายุ 48 ชั่วโมง บนอาหาร NGA โดยใช้เข็มเย็บตะเซลล์ของจุลินทรีย์ทดสอบมาแตะ 4 จูรอบโคโลนีราในแนวกากบาท ให้ห่างจากราประมาณ 3 เซนติเมตร นำไปบ่มในสภาพอุณหภูมิห้อง ให้แสง near UV สลับมืด 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน ตรวจสอบผลการทดลองโดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีรา

2.1.2 ความสามารถในการยับยั้งการสร้าง fruiting body ของรา *C. gloeosporioides* โดยวิธี leaf disk assay (Farrungsang *et al.*, 1997; Coates *et al.*, 1999)

เป็นวิธีการทดสอบจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้จากขั้นตอน 2.1.1

เตรียมสปอร์แขวนลอยจากสปอร์รา CG-395 อายุ 14 วัน บนอาหาร Potato carrot agar (PCA) ปรับความหนาแน่นของสปอร์ด้วยน้ำนิ่งมาเชื้อให้ได้ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยใช้ haemocytometer

เตรียมเซลล์แขวนลอยของจุลินทรีย์ทดสอบโดยเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหาร NGA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง 48 ชั่วโมง แล้วย้ายมาเลี้ยงในอาหาร Nutrient Glucose Broth (NGB) วางบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อชั่วโมง ในสภาพอุณหภูมิห้องนาน 48 ชั่วโมง ปรับค่าความขุ่นให้

ได้ 0.2 OD ด้วยเครื่อง spectrophotometer (ความหนาแน่นของเซลล์ประมาณ 10^8 เซลล์ต่อ มิลลิลิตร)

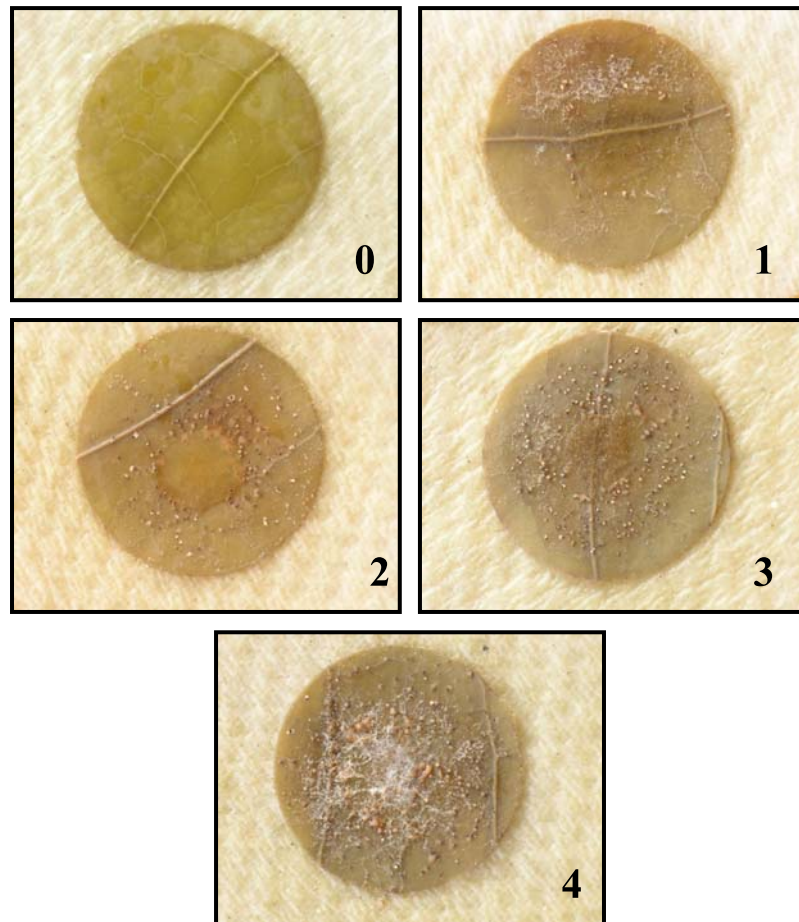
ทดสอบความสามารถในการยับยั้งการสร้าง fruiting body ของราโดยวิธี leaf disk assay นำใบมะม่วงน้ำดอกไม้ที่มีอายุ 6-8 สัปดาห์ ล้างด้วยน้ำสะอาด ผึ่งให้แห้ง ฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย 70% ethyl alcohol เจาะใบพืชให้ได้ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.6 เซนติเมตร (leaf disk) แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 30 วินาที จากนั้นนำ leaf disk วางในจานเลี้ยงเชื้อที่รองด้วยกระดาษกรองขึ้น นำสปอร์แขวนลอยของราและเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียผสมให้เข้ากันในอัตรา 1:1 แล้วหยดสารแขวนลอยดังกล่าวปริมาตร 0.02 มิลลิลิตร ลงบน leaf disk ที่เตรียมไว้ บ่มเชื้อในสภาพอุณหภูมิห้องใต้แสง near UV สลับมืด 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน บันทึกผลการทดลองโดยใช้สายตาตรวจประเมินการสร้าง fruiting body ของราบน leaf disk โดย stereoscopic microscope และบันทึกกระดับการสร้าง fruiting body เป็น 5 ระดับ (ภาพที่ 1)

2.1.3 ความสามารถในการยับยั้งการเข้าทำลายของรา *C. gloeosporioides* บนใบพืช

ใช้ detached leaf assay ที่ดัดแปลงจากวิธีการของ วราภรณ์ (2545) ในการทดสอบจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้จากขั้นตอน 2.1.2 โดยนำใบมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ ที่มีอายุ 6-8 สัปดาห์ ล้างด้วยน้ำสะอาด ผึ่งให้แห้ง ฆ่าเชื้อบริเวณผิวภายนอกด้วย 70% ethyl alcohol หุ้มปลายก้านใบด้วยสำลีชุบน้ำนิ่งฆ่าเชื้อแล้วห่อด้วย อลูมิเนียม ฟอยล์ เพื่อลดการระเหยน้ำ ใช้ permanent marker วงกำหนดตำแหน่งทดสอบบนใบ แล้วทำการปลูกเชื้อด้วยการหยดสปอร์แขวนลอยของราและเซลล์ของจุลินทรีย์ทดสอบปริมาตร 0.02 มิลลิลิตรที่ผิวหน้าใบ วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design: CRD) โดยมี 4 กรรมวิธีทดสอบดังนี้

- กรรมวิธีที่ 1 หยดสปอร์ *C. gloeosporioides*
- กรรมวิธีที่ 2 หยดเซลล์แขวนลอยของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ก่อนหยดสปอร์รา
C. gloeosporioides เป็นเวลา 12 ชั่วโมง
- กรรมวิธีที่ 3 หยดเซลล์แขวนลอยของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์พร้อมกับสปอร์รา
C. gloeosporioides
- กรรมวิธีที่ 4 หยดเซลล์แขวนลอยของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์หลังหยดสปอร์รา
C. gloeosporioides เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

โดยทำกรรมวิธีละ 12 ชั่วโมง และใช้ใบมะม่วง 1 ใบต่อ 1 ชั่วโมง จากนั้นนำใบมะม่วงมาบ่ม
ในตะกร้าขึ้นที่คลุมทับด้วย ถุงพลาสติก วางไว้ในสภาพอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน ทำการประเมิน
ระดับการเกิดโรคด้วยสายตาโดยแบ่งออกเป็น 5 ระดับ (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 1 ระดับการสร้าง fruiting body ของรา *C. gleosporioides* บน leaf disk

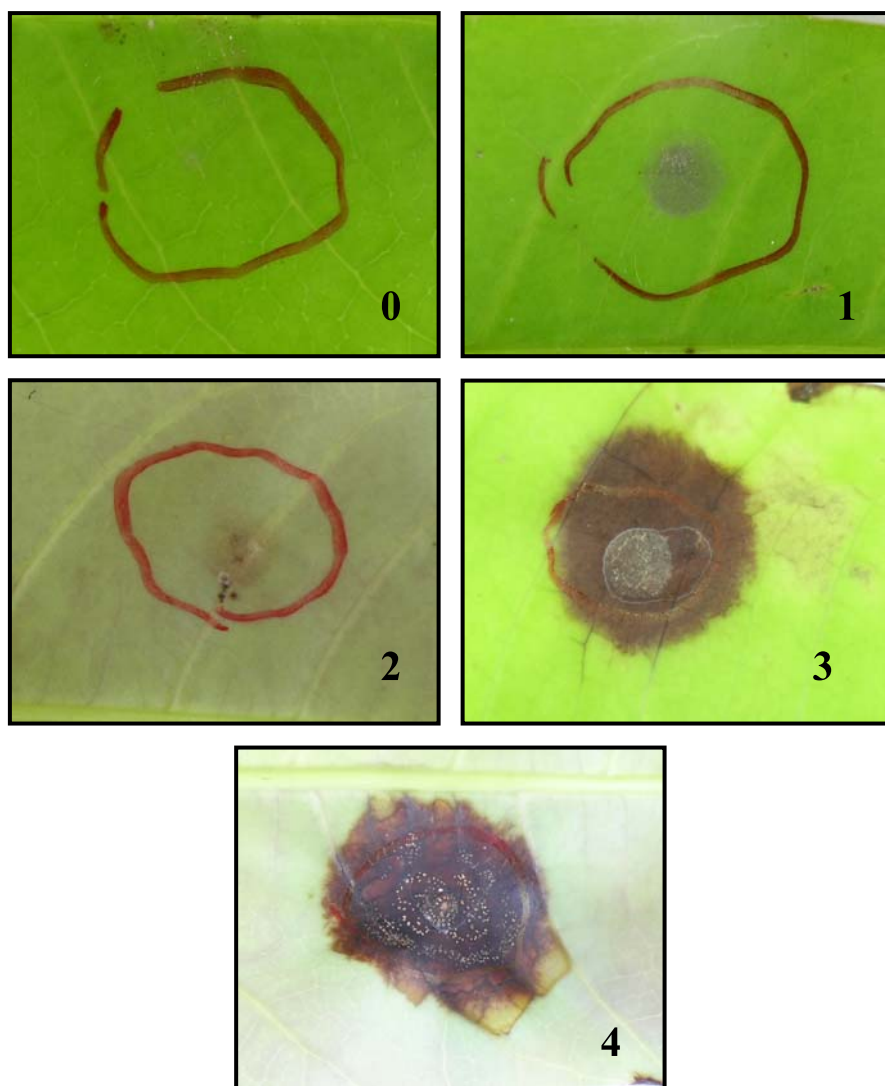
0 ไม่พบ fruiting body

1 มีปริมาณ fruitng body 1 – 25 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ leaf disk

2 มีปริมาณ fruitng body 26 – 50 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ leaf disk

3 มีปริมาณ fruitng body 51 – 75 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ leaf disk

4 มีปริมาณ fruitng body 76 – 100 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ leaf disk



ภาพที่ 2 ระดับการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนใบมะม่วงโดยการปลูกราसाเหตุโรคด้วยวิธี detached leaf แบบไม่ทำแผล

0 ไม่เกิดจุดแผล

1 เกิดจุดแผลขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางน้อยกว่า 1 มิลลิเมตร

2 เกิดจุดแผลขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1- 2 มิลลิเมตร

3 เกิดจุดแผลขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 - 10 มิลลิเมตร

4 เกิดจุดแผลขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่า 10 มิลลิเมตร

2.2 การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่แยกได้โดยใช้อาหาร GYPB

2.2.1 ความสามารถในการยับยั้งการงอกของสปอร์รา *C. gloeosporioides*

เตรียมสปอร์แขวนลอยของรา *C. gloeosporioides* เช่นเดียวกับข้อ 2.1.2

เตรียมเซลล์แขวนลอยของ จุลินทรีย์ทดสอบ โดยเลี้ยงจุลินทรีย์บนอาหาร GYPB บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง 48 ชั่วโมง แล้วย้ายมาเลี้ยงในอาหาร GYPB บนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อชั่วโมง ในสภาพอุณหภูมิห้องนาน 15 - 20 ชั่วโมง ปรับค่าความขุ่นให้ได้ 0.2 OD ด้วยเครื่อง spectrophotometer ซึ่งจะได้ความหนาแน่นของเซลล์ประมาณ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

การทดสอบการยับยั้งการงอกของสปอร์รา นำสปอร์แขวนลอยของราและเซลล์แขวนลอยของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบผสมให้เข้ากันในอัตรา 1:1 แล้วหยดสารแขวนลอยดังกล่าว ปริมาตร 0.02 มิลลิลิตร ลงบนกระจกสไลด์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นำไปบ่มในงานเลี้ยงเชื้อที่รองด้วยกระดาษกรองขึ้น บ่มเชื้อในสภาพอุณหภูมิห้อง ได้แสง near UV สลับมืด 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบการงอกของสปอร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ และประเมินระดับความสามารถของลินทรีย์ในการยับยั้งการงอกของสปอร์ราด้วยสายตา ดังนี้

- 0 ความงอกและความยาว germ tube เท่ากับกรรมวิธีควบคุม
- 1 ความงอกเท่ากับหรือน้อยกว่ากรรมวิธีควบคุม และ germ tube ยาวมากกว่า 3 เท่าของความยาวสปอร์ (3.73×12.13 ไมครอน)
- 2 ความงอกน้อยกว่ากรรมวิธีควบคุม และ germ tube ยาวไม่เกิน 3 เท่าของความยาวสปอร์ (3.73×12.13 ไมครอน)
- 3 ไม่มีการงอกของสปอร์

คัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีที่สามารถการยับยั้งการงอกของสปอร์ราในระดับ 2 และ 3 เพื่อทำการทดสอบความสามารถในการเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในขั้นตอนต่อไป

2.2.2 ความสามารถในการยับยั้งการสร้าง fruiting body ของรา *C. gloeosporioides*

ทำการทดลองและตรวจบันทึกผลเช่นเดียวกับข้อ 2.1.2

2.2.3 ประสิทธิภาพการควบคุมโรคแอนแทรคโนสบนผลชมพู

จุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบเป็นจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพยับยั้งการสร้าง fruiting body ของราจากวิธี leaf disk assay ในข้อ 2.2.2 โดยเป็นแบคทีเรีย 1 ไอโซเลตคือ D2835 และยีสต์ 2 ไอโซเลต คือ A3723 และ D4113

นำผลชมพูที่มีอายุหลังเก็บเกี่ยวประมาณ 24 ชั่วโมง นำมาล้างทำความสะอาด ผึ่งให้แห้ง นำเชื้อบริเวณผิวภายนอกด้วย 70% ethyl alcohol หยดสปอร์ราหรือเซลล์แขวนลอยของ จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ปริมาตร 0.02 มิลลิลิตร บนผิวผลชมพูโดยไม่ทำแผล ตามกรรมวิธีทดสอบเช่นเดียวกับข้อ 2.1.3 โดยทำกรรมวิธีละ 20 ซ้ำ ใช้ 1 ผลต่อ 1 ซ้ำ เก็บผลชมพูไว้ในสภาพชื้นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน ตรวจและบันทึกผลการทดลองโดยวัดขนาดแผล

3. การทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่คัดเลือกได้ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วง

3.1 การควบคุมโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วงน้ำดอกไม้

จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ใช้ทดสอบ 4 ไอโซเลต คือ 3103 3107 3503 ที่คัดเลือกได้จากการทดลองในข้อ 2.1 และยีสต์ D4113 ที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.2

ใช้ผลมะม่วงน้ำดอกไม้ที่มีอายุ 90-110 วัน อายุหลังเก็บเกี่ยวไม่เกิน 24 ชั่วโมง นำมาล้างทำความสะอาดและตัดขั้วผลให้เหลือความยาว 1 เซนติเมตร ผึ่งให้แห้ง นำเชื้อที่บริเวณผิวด้วย 70% ethyl alcohol หยดสปอร์เชื้อราหรือเซลล์แขวนลอยของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ปริมาตร 0.02 มิลลิลิตรบนผิวผลมะม่วง กรรมวิธีละ 20 ซ้ำ ใช้ 1 ผลต่อ 1 ซ้ำ เก็บผลมะม่วงในสภาพชื้นที่อุณหภูมิห้อง โดยมีกรรมวิธีทดสอบสำหรับจุลินทรีย์ปฏิปักษ์แต่ละไอโซเลตเช่นเดียวกับข้อ 2.13

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์โดยจัดทรีทเมนต์แบบแฟกทอเรียล (Factorial Experiments in CRD) เพื่อศึกษาอิทธิพลของ 2 ปัจจัย คือ ลำดับการใช้ จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ และชนิดของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์

ปัจจัยที่ 1 ลำดับการควบคุม มี 4 กรรมวิธี ได้แก่ กรรมวิธีที่ 1 ปลูกรา *C. gloeosporioides* เพียงอย่างเดียวเพื่อเป็นกรรมวิธีควบคุม (Control) กรรมวิธีที่ 2 หยดเซลล์แขวนลอยของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ก่อนการปลูกรา *C. gloeosporioides* เป็นเวลา 12 ชั่วโมง กรรมวิธีที่ 3 หยดเซลล์แขวนลอยของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์พร้อมกับการปลูกรา *C. gloeosporioides* และกรรมวิธีที่ 4 หยดเซลล์แขวนลอยของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์หลังการปลูกรา *C. gloeosporioides* เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

ปัจจัยที่สอง กรรมวิธีควบคุม โดยมีจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มี 4 ไอโซเลต ได้แก่ แบคทีเรีย ไอโซเลต 3103 3107 3503 และยีสต์ ไอโซเลต D4113 ตามลำดับ

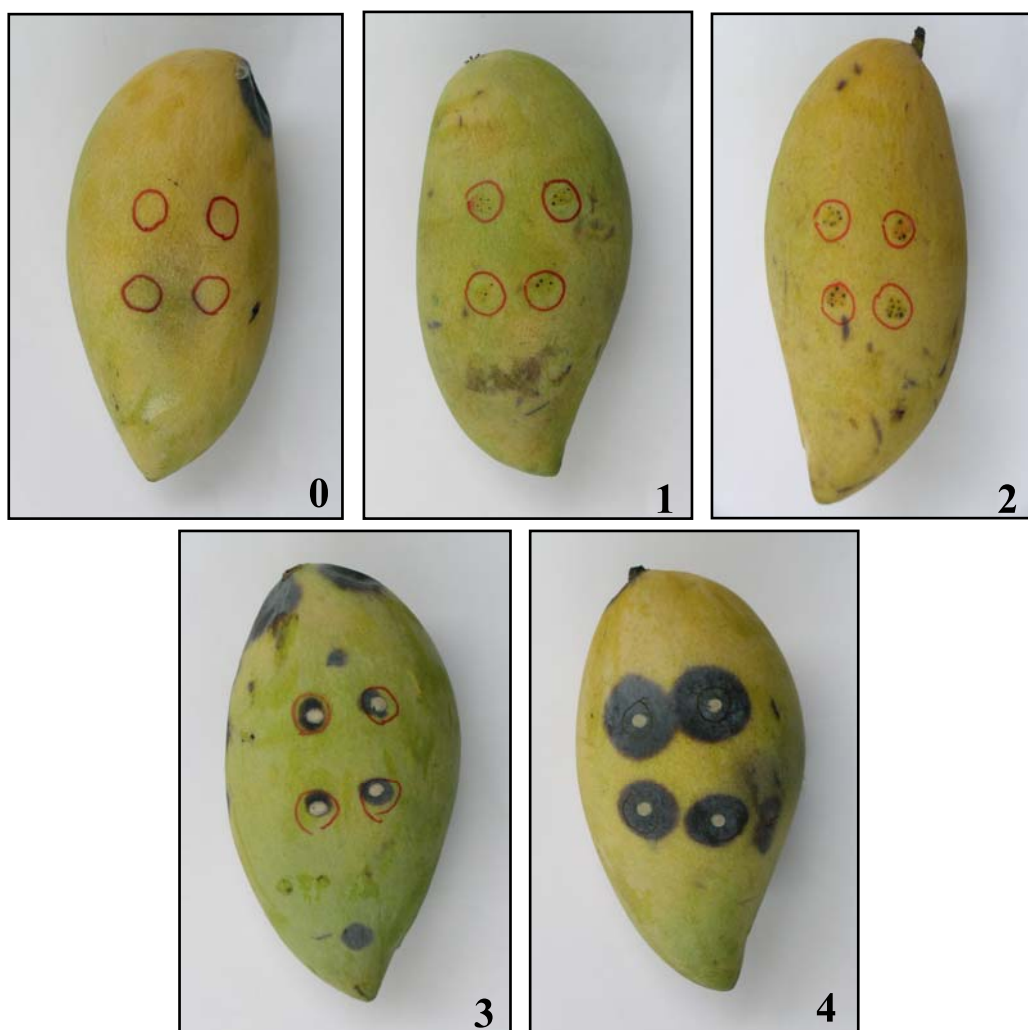
เมื่อทำการทดลองครบเวลา 7 วัน ตรวจและบันทึกผลการทดลองโดยการวัดขนาดแผล และบันทึกการเกิดโรคตามลักษณะการเกิดแผลเช่นเดียวกับข้อ 2.1.3 (ภาพที่ 3)

3.2 การควบคุมโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วงโชคอนันต์

จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ใช้ทดสอบ 3 ไอโซเลตคือ แบคทีเรีย 3103 3107 และยีสต์ D4113 เปรียบเทียบกับการใช้สารเคมี azoxystrobin ความเข้มข้น 500 ppm (ชื่อการค้า Amista®)

เตรียมมะม่วงโชคอนันต์ระยะแก่จัดมาผ่านขั้นตอนเตรียมการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 3.1

เมื่อทำการทดลองครบเวลา 7 วัน ตรวจและบันทึกผลการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 3.1



ภาพที่ 3 ระดับการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วงโดยการปลูกราसाเหตุโรคแบบไม่ทำแผล

- 0 ไม่เกิดจุดแผล
- 1 เกิดจุดแผลขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางน้อยกว่า 1 มิลลิเมตร
- 2 เกิดจุดแผลขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1- 2 มิลลิเมตร
- 3 เกิดจุดแผลขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3- 10 มิลลิเมตร
- 4 เกิดจุดแผลขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่า 10 มิลลิเมตร

4. คุณลักษณะการเป็นศัตรูธรรมชาติที่คัดเลือกได้ต่อความหลากหลายของรา *C. gloeosporioides*

นำแบคทีเรียปฏิปักษ์ 3 ไอโซเลต ได้แก่ 3103 3107 และ 3503 มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเส้นใยของรา *C. gloeosporioides* ที่แยกได้จากแหล่งต่างๆ จำนวน 10 ไอโซเลต ดังนี้ ไอโซเลต ไอโซเลต 351-02 และไอโซเลต 353-02 แยกได้จากผลเงาะที่มาจาก จ. จันทบุรี และมี 8 ไอโซเลต ที่แยกได้จากผลมะม่วง คือ 3 ไอโซเลต 68-17 มาจาก จ.กาญจนบุรี ไอโซเลต 370-05 มาจาก จ. ฉะเชิงเทรา ไอโซเลต 379-06 มาจาก จ. ปราจีนบุรี ไอโซเลต 381-10 มาจาก จ. ราชบุรี ไอโซเลต 386-04 มาจากชลบุรี ไอโซเลต 394-19 มาจาก อ. บ้านแพ้ว จ. สมุทรสาคร ไอโซเลต 404-20 มาจาก จ. ลำพูน และไอโซเลต 411-21 มาจาก จ. อุบลราชธานี ทำการศึกษาตามขั้นตอน 2.1.1 เพื่อศึกษาแนวโน้มของประสิทธิภาพการควบคุมการเข้าทำลายของรา *C. gloeosporioides* ในสภาพแปลง

5. กลไกของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการยับยั้งรา *C. gloeosporioides*

5.1 การยับยั้งการงอกของสปอร์ของรา *C. gloeosporioides*

นำสปอร์แขวนลอยของรา (10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร) และเซลล์แขวนลอยของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ผสมให้เข้ากันในอัตรา 1:1 แล้วหยดสารแขวนลอยดังกล่าว ปริมาตร 0.02 มิลลิลิตร ลงบนกระจกสไลด์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นำไปบ่มในจานเลี้ยงเชื้อที่รองด้วยกระดาษกรองขึ้น บ่มเชื้อในสภาพอุณหภูมิห้องใต้แสง near UV สลับมืด 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง บันทึกผลการการงอกของสปอร์รา

5.2 การยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา *C. gloeosporioides*

หยดสปอร์ราบนกระจกสไลด์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วนำมาบ่มในจานเลี้ยงเชื้อที่รองด้วยกระดาษกรองขึ้นบ่มเชื้อใต้แสง near UV สลับมืด เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วหยดเซลล์แขวนลอยของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ผสมให้เข้ากัน บ่มเชื้อต่อไปจนครบ 12 ชั่วโมง นำมาตรวจดูลักษณะการเจริญเส้นใยรา

6. การจำแนกชนิดจุลินทรีย์ปฏิบัติ

นำแบคทีเรียไอโซเลต 3103 3107 และ 3503 ที่ผ่านการคัดเลือกมาศึกษาคุณสมบัติของเซลล์โดยตรวจการติดสีแกรม (gram stain) รูปร่างลักษณะเซลล์ (cell morphology) การสร้างเอนโดสปอร์ (endospore formation) ด้วยกล้องจุลทรรศน์ และทำการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการ (Sneath, 1986) แล้วส่งไปจำแนกชื่อวิทยาศาสตร์ด้วยวิธีทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีอีกครั้งจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

สำหรับยีสต์ D4113 จำแนกชื่อวิทยาศาสตร์ด้วยการใช้ Biolog Microlog System โดยสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

7. สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการและเรือนปลูกพืชทดลองภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

8. ระยะเวลาทำการทดลอง

เริ่มตั้งแต่กุมภาพันธ์ 2547 ถึง กุมภาพันธ์ 2549

ผลการทดลอง

1. การแยกและการเก็บรวบรวมจุลินทรีย์จากทรงพุ่มพีช

1.1 การแยกจุลินทรีย์โดยใช้อาหาร Nutrient Glucose Agar (NGA)

ระยะเวลาดังแต่เดือนกุมภาพันธ์ถึงเดือนพฤษภาคม 2547 ได้ทำการเก็บตัวอย่างช่อดอก และผลอ่อนจากสวนผลไม้เขตร้อนได้แก่ มะม่วง ลำไย น้อยหน่า เงาะ และองุ่น ได้ทั้งหมด 43 ตัวอย่างจากพื้นที่ อ. ดำเนินสะดวก อ. บ้านโป่ง จ. ราชบุรี อ. ศรีประจันต์ อ. เมือง อ. ดอนเจดีย์ อ. อุทอง อ. สองพี่น้อง จ. สุพรรณบุรี อ. พนมทวน จ. กาญจนบุรี และ อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมา รวม 37 สวน สามารถแยกจุลินทรีย์ผิวพีชได้ 117 ไอโซเลต ทั้งหมดเป็นแบคทีเรียในจำนวนนี้เป็น จุลินทรีย์ที่แยกได้จากดอก 33 ไอโซเลต ยอด 69 ไอโซเลต และจากผลอ่อน 15 ไอโซเลต (ตารางที่ 1)

1.2 การแยกจุลินทรีย์โดยใช้อาหาร Glucose Yeast Peptone Agar (GYPA) (Beech et al., 1971)

ระยะเวลาดังแต่เดือนกุมภาพันธ์ ถึงเดือนพฤศจิกายน ได้ทำการเก็บตัวอย่างช่อดอก และผลอ่อนจากสวนผลไม้เขตร้อนในเขตภาคกลาง ได้แก่ จ. นครปฐม จ. สมุทรสาคร จ. ราชบุรี จ. สุพรรณบุรี และ จ. กาญจนบุรี เขตภาคเหนือ ได้แก่ จ. ตาก และ จ. อุทัยธานี เขตภาคใต้ ได้แก่ จ. พังงา และ จ. นครศรีธรรมราช รวม 54 สวน นำมาแยกจุลินทรีย์จากผิวพีช ด้วยวิธี dilution plate method บนผิวหน้าอาหารแข็ง GYPA สามารถแยกจุลินทรีย์ได้จากดอก 138 ไอโซเลต ยอด 67 ไอโซเลต และผลอ่อน 25 ไอโซเลตรวมทั้งหมด 230 ไอโซเลต โดยการตรวจดูใต้กล้องจุลทรรศน์ (compound microscope) ทำให้สามารถจำแนกจุลินทรีย์ดังกล่าวได้เป็น 2 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มจุลินทรีย์ที่เซลล์มีขนาดเล็กจนไม่สามารถมองเห็นได้ชัดเจนภายใต้กำลังขยาย 400 เท่า จึงจำแนกเป็นแบคทีเรียจำนวน 54 ไอโซเลต และกลุ่มจุลินทรีย์ที่เซลล์มีขนาดใหญ่และสามารถมองเห็นการแตกหน่อได้ชัดเจนภายใต้กำลังขยาย 400 เท่า ได้รับการจำแนกเป็นยีสต์จำนวน 176 ไอโซเลต (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 1 จุลินทรีย์ผิวพืชที่แยกได้จากทรงพุ่มไม้ผลเขตร้อนบนผิวน้ำอาหาร NGA

แหล่ง	ชนิดพืช	จำนวน สวน	จำนวนจุลินทรีย์ (ไอโซเลต)		
			ดอก	ยอด	ผลอ่อน
อ. ดำเนินสะดวก จ.ราชบุรี	ลำไย	1	2	—	—
	มะม่วง	6	3	6	1
อ. พนมทวน จ. กาญจนบุรี	องุ่น	2	—	—	7
	มะม่วง	1	3	—	3
อ. ศรีประจันต์ จ. สุพรรณบุรี	มะม่วง	4	5	4	—
อ. เมือง จ. สุพรรณบุรี	มะม่วง	3	7	—	—
อ. คอนเด้ย จ. สุพรรณบุรี	มะม่วง	4	6	3	—
อ. อุทอง จ. สุพรรณบุรี	มะม่วง	1	2	—	—
อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมา	เงาะ	1	—	—	4
	น้อยหน่า	1	—	4	—
	มะม่วง	13	5	52	—
รวม		37	33	69	15

ตารางที่ 2 จุลินทรีย์ผิวพืชที่แยกได้จากทรงพุ่มไม้ผลเขตร้อนบนผิวน้ำอาหาร GYPA

แหล่ง	ชนิดพืช	จำนวน สวน	จำนวนจุลินทรีย์ (ไอโซเลต)		
			ดอก	ยอด	ผลอ่อน
อ. กำแพงแสน จ. นครปฐม	มะม่วง	1	2	—	—
อ. บ้านแพ้ว จ.สมุทรสาคร	มะม่วง	4	11	—	—
อ. ปากท่อ จ. ราชบุรี	มะม่วง	6	26	—	—
อ. ดำเนินสะดวก จ.ราชบุรี	ลำไย	1	3	—	—
	มะม่วง	6	13	13	—
อ. เมือง จ. ราชบุรี	มะม่วง	2	—	12	—
อ. บ้านโป่ง จ. ราชบุรี	กระเทียม	4	34	—	9
อ. ท่ามะกา จ. กาญจนบุรี	ชมพู	2	6	—	—
อ. พนมทวน จ. กาญจนบุรี	องุ่น	1	—	—	6
อ. ศรีประจันต์ จ. สุพรรณบุรี	มะม่วง	5	13	12	—
อ. เมือง จ. สุพรรณบุรี	มะม่วง	4	16	—	4
อ. คอนเด้ย จ. สุพรรณบุรี	มะม่วง	2	4	2	—
อ. อุททอง จ. สุพรรณบุรี	องุ่น	1	—	—	6
อ. พบพระ จ. ตาก	มะม่วง	1	1	—	—
อ. ลานสัก จ. อุทัยธานี	มะม่วง	1	1	—	—
อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมา	เงาะ	1	—	—	1
	น้อยหน่า	1	2	—	—
	มะม่วง	8	—	28	—
อ. ลานสกา จ. นครศรีธรรมราช	เงาะ	2	6	—	—
อ. ตะกั่วทุ่ง จ. พังงา	เงาะ	1	1	—	—
รวม		54	138	67	25

2. การคัดเลือกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วง

2.1 การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่แยกได้โดยใช้อาหาร NGA

2.1.1 ความสามารถในการยับยั้งการเจริญเส้นใยของรา *C. gloeosporioides*

จากการทดสอบความสามารถของจุลินทรีย์ 117 ไอโซเลต ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา *C. gloeosporioides* บนอาหาร PDA พบว่าจุลินทรีย์ 82 ไอโซเลต สามารถยับยั้งการเจริญของโคโลนีราได้ทำให้มีขนาดเล็กกว่ากรรมวิธีควบคุมโดยพบรูปแบบการยับยั้งที่แตกต่างกัน 2 รูปแบบคือ การเกิดบริเวณใสที่เรียกว่า inhibition zone หรือ clear zone ซึ่งพบได้มากกว่ารูปแบบที่จุลินทรีย์มีการเจริญอย่างรวดเร็วจนสามารถจำกัดบริเวณการเจริญของโคโลนีของรา (ตารางที่ 3 และภาพที่ 4) โดยในกลุ่มที่แสดงการยับยั้งการเจริญของราได้นี้เป็นจุลินทรีย์ที่แยกได้จากส่วนต่างๆ ของทรงพุ่มไม้ผลได้แก่ ดอก 24 ไอโซเลต ยอด 33 ไอโซเลตและผลอ่อน 3 ไอโซเลต ตามลำดับ

2.1.2 ความสามารถในการยับยั้งการสร้าง fruiting body ของรา *C. gloeosporioides* โดยวิธี leaf disk assay (Farrungsang *et al.*, 1997; Coates *et al.*, 1999)

จากผลการทดลองตารางที่ 2 คัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราบนอาหาร PDA จำนวน 30 ไอโซเลตมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการพัฒนาคโครงสร้างของรา *C. gloeosporioides* ด้วยวิธี leaf disk assay พบว่า มีจุลินทรีย์ 12 ไอโซเลต ได้แก่ 0303 2703 2803 3005 3102 3103 3107 3201 3503 3506 4101 และ 4102 ทำให้ราไม่สามารถสร้าง fruiting body (ระดับการสร้าง fruiting body เท่ากับ 0) (ตารางที่ 4) เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่หยดสปอร์แขวนลอยของรา *C. gloeosporioides* เพียงอย่างเดียวซึ่งมีปริมาณ fruiting body 100 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ leaf disk (ระดับการสร้าง fruiting body เท่ากับ 4.0)

2.1.3 ความสามารถในการยับยั้งการเข้าทำลายของรา *C. gloeosporioides* บนใบพืช

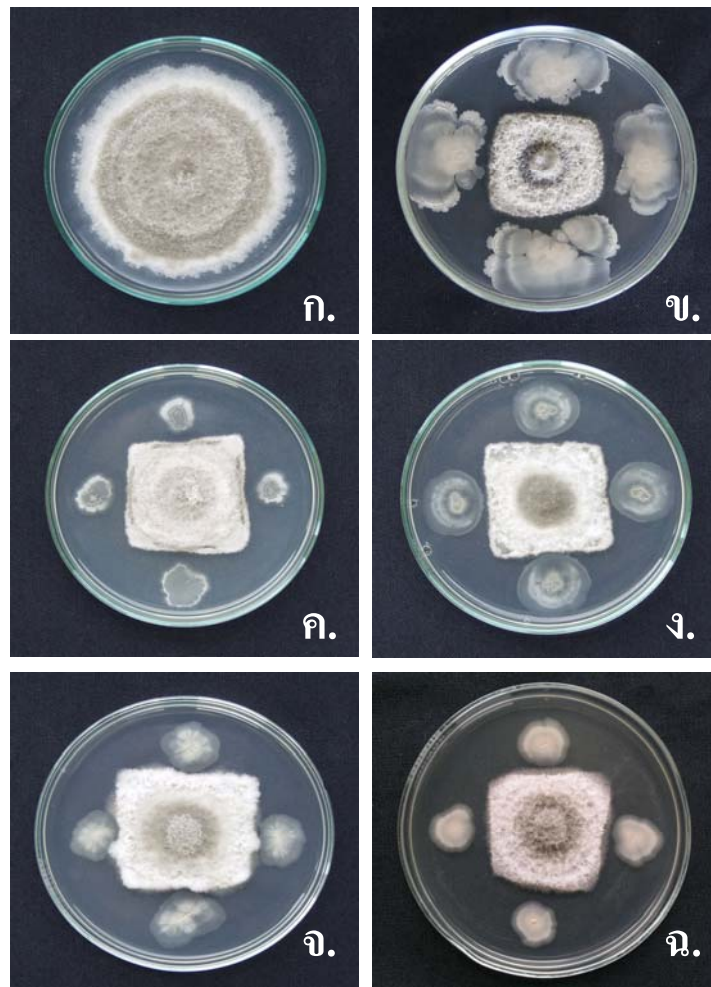
ทดสอบความสามารถในการควบคุมโรคด้วยวิธี detached leaf technique พบว่าการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทุกไอโซเลตก่อนการปลูกเป็นเวลา 12 ชั่วโมง สามารถลดการเกิดโรคบนใบพืชได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม และพบว่าเมื่อใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์พร้อมกับการปลูกสาเหตุโรคเกือบทุกไอโซเลตสามารถลดความรุนแรงของโรคได้เช่นกัน แต่การใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์หลังการปลูกเป็นเวลา 12 ชั่วโมง พบการเกิดโรคในระดับใกล้เคียงกับกรรมวิธีควบคุม จุลินทรีย์ 2 ไอโซเลตได้แก่ 3503 และ 3201 โดยการใช้ก่อน พร้อม และหลังปลูกมีระดับการเกิดโรคต่ำกว่ากรรมวิธีควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ โดยไอโซเลต 3503 มีระดับการเกิดโรคเท่ากับ 0.4 0.0 และ 1.0 และไอโซเลตมีระดับการเกิดโรค 0.67 0.25 และ 1.17 ตามลำดับ (ตารางที่ 5 และ ภาพที่ 2)

ตารางที่ 3 ประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่แยกได้จากทรงพุ่มไม้ผลเขตร้อนในยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา *C. gloeosporioides* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

ไอโซเลต	เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี (cm)	การยับยั้ง(%)	ไอโซเลต	เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี (cm)	การยับยั้ง(%)
Control	9.00	0.00	1403	8.69	3.44
0102	4.65	47.67	1601	7.51	16.56
0208	6.93	23.00	1603	6.21	21.79
0302	8.19	9.00	1703	8.75	2.78
0303	4.10	54.44	1801	6.40	19.40
0505	8.25	8.33	1803	8.85	1.67
0704	8.63	4.11	1804	5.73	27.83
0801	7.85	12.78	1901	6.35	20.03
1003	6.74	25.11	1902	7.05	11.21
1201	8.26	8.22	2101	7.39	6.93
1204	7.24	19.55	2102	6.93	12.72
1301	7.73	14.11	2201	4.25	46.47
1302	8.56	4.89	2202	6.91	12.97
1303	7.36	18.22	2401	5.74	27.71
1402	8.81	2.11	2403	3.41	57.05

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ไอโซเลต	เส้นผ่าศูนย์กลาง โคโลนี (cm)	การยับยั้ง(%)	ไอโซเลต	เส้นผ่าศูนย์กลาง โคโลนี (cm)	การยับยั้ง(%)
2601	8.23	8.56	3303	7.68	9.96
2602	7.13	20.78	3401	7.05	21.67
2604	7.74	14.00	3405	4.25	52.77
2703	4.35	51.66	3406	4.63	48.55
2704	4.48	50.22	3503	4.35	51.67
2803	5.03	44.11	3507	4.63	45.72
2804	5.03	44.11	3601	8.15	9.44
2902	7.58	15.78	3603	7.68	14.67
2904	7.59	15.66	3803	8.00	11.11
3003	8.41	6.56	3804	8.33	7.45
3005	4.94	45.11	3805	7.15	20.56
3006	4.31	52.11	3901	8.75	27.78
3102	3.95	53.69	3902	4.10	54.44
3103	4.04	52.64	3904	4.78	46.88
3104	8.23	3.52	4103	4.28	53.44
3105	8.39	1.64	4202	7.25	19.44
3107	3.95	53.69	4203	4.31	52.11
3201	4.45	47.83	4204	4.28	52.44
3204	8.05	5.63	4301	4.30	52.22
3205	8.30	2.70	4302	4.45	50.55
3207	7.90	7.39	4303	4.14	54.00
3208	7.63	10.55	4304	7.30	18.89
3209	7.25	15.01	4305	4.41	51.00
3210	7.15	16.18	4306	4.60	48.00
3301	7.78	2.93			



ภาพที่ 4 การยับยั้งการเจริญของโคโลนีรา *C. gloeosporioides* ในสภาพ dual culture บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยจุลินทรีย์ผิวพืชที่แยกได้จากอาหาร NGA
 ก. Control, ข., ค., ง., จ. และฉ. คือ จุลินทรีย์ไอโซเลต 2403 ,3103,3107, 3201 และ 3503 ตามลำดับ

ตารางที่ 4 ประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ที่ปลูกใช้ในการยับยั้งการสร้าง fruiting body ของรา
C. gloeosporioides ด้วยวิธี leaf disk assay

ไอโซเลต	การยับยั้ง fruiting body ^{1/}	ไอโซเลต	การยับยั้ง fruiting body ^{1/}
Control	4.0	2803	0.0
0102	3.0	2804	0.4
0303	0.0	3005	0.0
2403	0.6	3006	0.6
2703	0.0	3102	0.0
2704	0.4	3103	0.0
3107	0.0	4102	0.4
3201	0.0	4103	0.2
3503	0.2	4203	0.6
3504	0.0	4204	0.0
3506	0.0	4301	2.0
3507	0.2	4302	0.2
3902	0.2	4303	0.6
3903	0.2	4305	0.6
3904	0.2	4306	2.6
4101	0.0		

^{1/} 0 ไม่พบ fruiting body

- 1 มีปริมาณ fruitng body 1 – 25 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ leaf disk
- 2 มีปริมาณ fruitng body 26 – 50 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ leaf disk
- 3 มีปริมาณ fruitng body 51 – 75 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ leaf disk
- 4 มีปริมาณ fruitng body 76 – 100 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ leaf disk

ตารางที่ 5 ประสิทธิภาพการควบคุมโรคแอนแทรกโนสบนใบมะม่วงของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์โดยการ
ปลูกกราสาเหตุโรคด้วยวิธี detached leaf แบบไม่ทำแผล

ไอโซเลต	ระดับการเกิดโรค ^{2/}		
	ปลูกแบคทีเรียปฏิปักษ์	ปลูกแบคทีเรียปฏิปักษ์	ปลูกแบคทีเรียปฏิปักษ์
	ก่อนรา 12 ช.ม.	พร้อมรา	หลังรา 12ช.ม.
Control	1.50 a ^{1/}	1.33 a	1.83 a
0303	0.08 b	0.33 bc	1.33 abc
2703	0.50 b	0.42 bc	1.33 abc
2803	0.17 b	0.33 bc	1.33 abc
3005	0.50 b	0.33 bc	1.42 abc
3102	0.50 b	0.33 bc	1.66 ab
3103	0.00 b	0.83 ab	1.25 abc
3107	0.17 b	0.17 bc	1.25 abc
3201	0.67 b	0.25 bc	1.17 bc
3503	0.42 b	0.00 c	1.00 c
3506	0.17 b	0.67 bc	1.25 abc
4101	0.25 b	0.25 bc	1.25 abc
4102	0.50 b	0.17 bc	1.25 abc

^{1/} ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ตามวิธี
Duncan's multiple range test

- ^{2/} 0 ไม่เกิดจุดแผล
- เกิดจุดแผลขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางน้อยกว่า 1 มิลลิเมตร
 - เกิดจุดแผลขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1- 2 มิลลิเมตร
 - เกิดจุดแผลขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3- 10 มิลลิเมตร
 - เกิดจุดแผลขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่า 10 มิลลิเมตร



ภาพที่ 5 ประสิทธิภาพการป้องกันใบพืชของแบคทีเรียปฏิชีวนะจากการเข้าทำลายโดยรา

C. gloeosporioides

ก. หยดเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียปฏิชีวนะก่อนสปอร์แขวนลอยเป็นเวลา 12 ชั่วโมง

ข. หยดเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียปฏิชีวนะพร้อมสปอร์แขวนลอย

ค. หยดเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียปฏิชีวนะหลังสปอร์แขวนลอยเป็นเวลา 12 ชั่วโมง

2.2 การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่แยกได้โดยใช้อาหาร GYP A

2.2.1 ความสามารถในการยับยั้งการงอกของสปอร์รา *C. gloeosporioides*

เมื่อนำจุลินทรีย์ที่แยกได้จากทรงพุ่มพืชจำนวน 230 ไอโซเลต มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการงอกของสปอร์รา *C. gloeosporioides* พบว่าแบคทีเรีย 33 ไอโซเลตมีแนวโน้มเป็นจุลินทรีย์ที่ปฏิบัติโดยยับยั้งการงอกของสปอร์ราได้โดยแบ่งออกเป็น 3 ระดับ ดังนี้ 13 ไอโซเลตสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ (ระดับการยับยั้งเท่ากับ 3) 11 และ 19 ไอโซเลตที่สามารถลดอัตราการงอกและความยาว germ tube ของสปอร์ได้ในระดับดี (ระดับการยับยั้งเท่ากับ 2) และพอใช้ (ระดับการยับยั้งเท่ากับ 1) ตามลำดับ (ตารางที่ 6) ในกลุ่มยีสต์พบว่ามีจำนวน 161 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ราได้โดยแบ่งออกเป็น 3 ระดับ ดังนี้ 4 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งการงอกได้ 100 เปอร์เซ็นต์ (ระดับการยับยั้งเท่ากับ 3) 26 ไอโซเลตสามารถลดอัตราการงอกและความยาว germ tube ของสปอร์ได้ดี (ระดับการสร้างเท่ากับ 2) และมี 131 ไอโซเลต ที่ลดอัตราการงอกของสปอร์และความยาว germ tube ได้ในระดับพอใช้ (ระดับการยับยั้งเท่ากับ 1) (ตารางที่ 6 และภาพที่ 6)

2.2.2 ความสามารถในการยับยั้งการสร้าง fruiting body ของรา *C. gloeosporioides*

นำจุลินทรีย์ที่ผ่านการคัดเลือกจากข้อ 2.2.1 มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการพัฒนาโครงสร้าง fruiting body ของราบน leaf disk พบว่าจากแบคทีเรียทั้งหมด 24 ไอโซเลตเกือบทุกไอโซเลตมีความสามารถยับยั้งการสร้าง fruiting body ของราได้ โดยมี 8 ไอโซเลต ที่มีประสิทธิภาพทำให้ราไม่สามารถสร้าง fruiting body (ระดับการสร้าง fruiting body เท่ากับ 0.0) ได้แก่ ไอโซเลต D2835 B6622 A7613 A7834 A8034 B8041 A8054 และ A8112 เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่มีปริมาณ fruiting body 100 เปอร์เซ็นต์ (ระดับการสร้าง fruiting body เท่ากับ 4.0) (ตารางที่ 7) ในขณะที่การทดสอบยีสต์ทั้งหมด 30 ไอโซเลต มี 19 ไอโซเลตที่แสดงความสามารถในการยับยั้งการสร้าง fruiting body โดยมี 3 ไอโซเลต ที่แสดงประสิทธิภาพดีในการยับยั้ง fruiting body คือ ไอโซเลต A3723 D4113 และ A4133 โดยมีระดับการสร้าง fruiting body เท่ากับ 0.4 0.6 และ 0.6 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่มีระดับ fruiting body เท่ากับ 4.0 (ตารางที่ 8 และภาพที่ 7)

ตารางที่ 6 การยับยั้งการงอกของสปอร์รา *C. gloeosporioides* โดยจุลินทรีย์ผิวพืชที่แยกได้จากอาหาร GYP A

ระดับการยับยั้ง spore germination ^{1/}	จำนวนจุลินทรีย์ (isolate)	
	แบคทีเรีย	ยีสต์
0	11	15
1	19	131
2	11	26
3	13	4
รวม	54	176

^{1/} 0 ความงอกอกและความยาว germ tube เท่ากับกรรมวิธีควบคุม

1 ความงอกอกเท่ากับหรือน้อยกว่ากรรมวิธีควบคุม และ germ tube ยาวมากกว่า 3 เท่าของความยาวสปอร์ (3.73 x 12.13 ไมครอน)

2 ความงอกน้อยกว่ากรรมวิธีควบคุม และ germ tube ยาวไม่เกิน 3 เท่าของความยาวสปอร์ (3.73 x 12.13 ไมครอน)

3 ไม่มีการงอกของสปอร์

ภาพที่ 6 การยับยั้งการงอกของสปอร์รา *C. gloeosporioides* โดยจุลินทรีย์ผิวพืชที่แยกได้โดยใช้
อาหาร GYP A

ก., ข. ระดับการยับยั้งเท่ากับ 0 ความงอกและความยาว germ tube เท่ากับกรรมวิธี

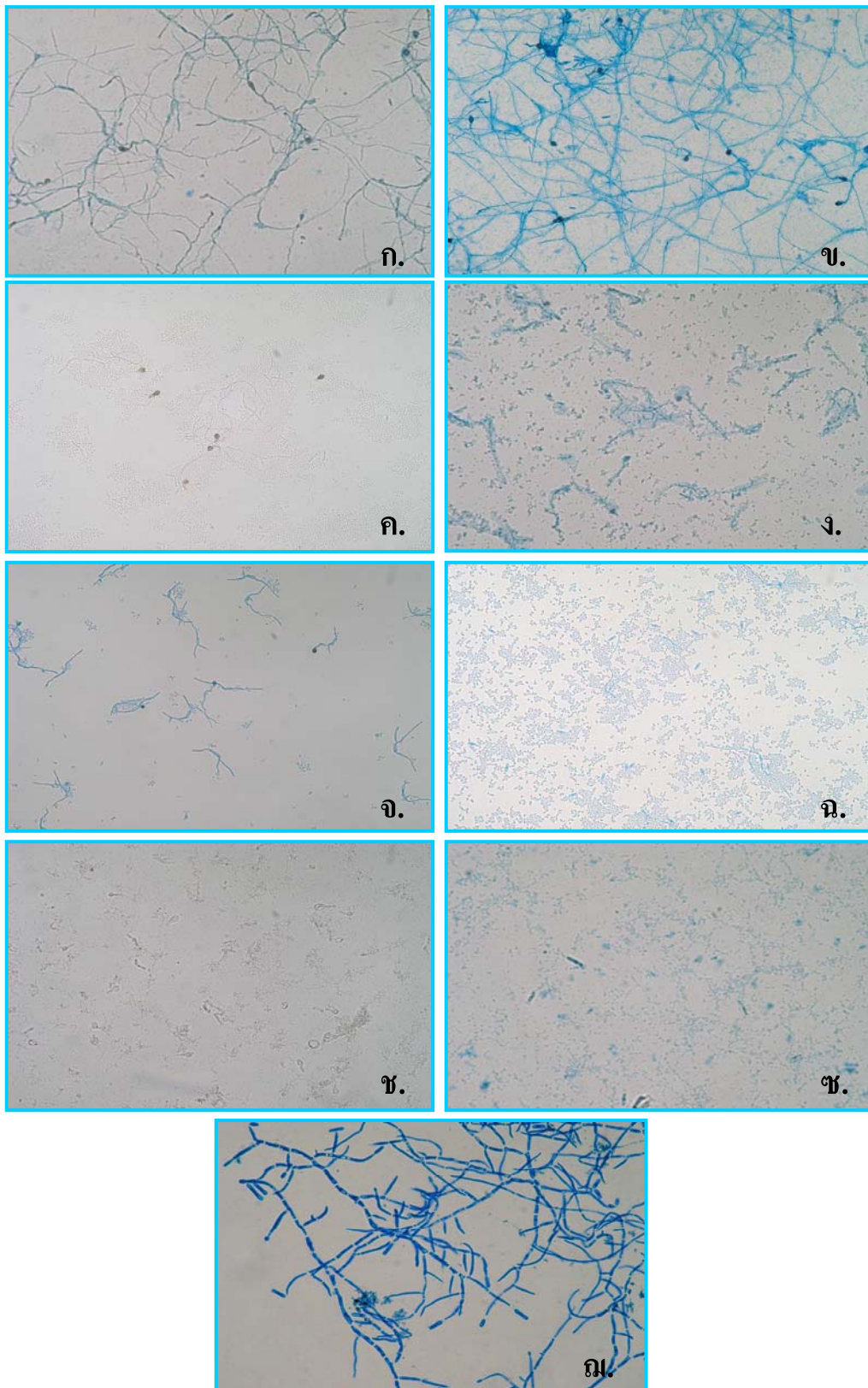
ควบคุม

ค., ง. ระดับการยับยั้งเท่ากับ 1 ความงอกเท่ากับหรือน้อยกว่ากรรมวิธีควบคุม และ germ
tube ยาวมากกว่า 3 เท่าของความยาวสปอร์ (3.73×12.13 ไมครอน)

จ., ฉ. ระดับการยับยั้งเท่ากับ 2 ความงอกน้อยกว่ากรรมวิธีควบคุม และ germ tube ยาว
ไม่เกิน 3 เท่าของความยาวสปอร์ (3.73×12.13 ไมครอน)

ซ., ซ. ระดับการยับยั้งเท่ากับ 3 ไม่มีการงอกของสปอร์

ณ. กรรมวิธีควบคุม



ตารางที่ 7 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งการสร้าง fruiting body ของรา
C. gloeosporioides ด้วยวิธี leaf disk assay

ไอโซเลต	การยับยั้ง fruiting body ^{1/}	ไอโซเลต	การยับยั้ง fruiting body ^{1/}
Control	4.0	C4434	2.0
SKA081	3.2	B6622	0.0
C2814	4.0	A7613	0.0
A2835	4.0	A7834	0.0
D2835	0.0	A7954	0.6
A2914	1.0	B7954	0.6
D3104	1.0	B7994	0.2
B3723	4.0	C7994	1.0
C4314	1.0	A8034	0.0
A8041	1.0	A8054	0.0
B8041	0.0	A8112	0.0
A8044	0.4	B8112	1.4
B8044	0.2		

^{1/} 0 ไม่พบ fruiting body

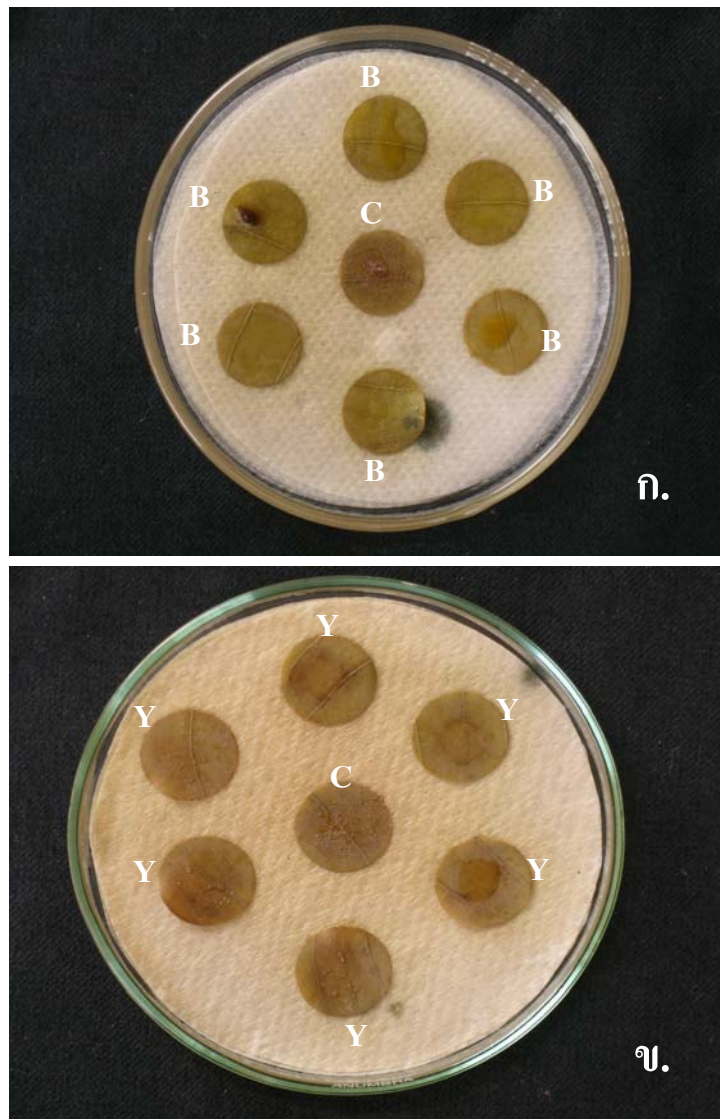
- 1 มีปริมาณ fruitng body 1 – 25 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ leaf disk
- 2 มีปริมาณ fruitng body 26 – 50 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ leaf disk
- 3 มีปริมาณ fruitng body 51 – 75 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ leaf disk
- 4 มีปริมาณ fruitng body 76 – 100 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ leaf disk

ตารางที่ 8 ประสิทธิภาพของยีสต์ปฏิบัติในการยับยั้งการสร้าง fruiting body ของรา
C. gloeosporoides ด้วยวิธี leaf disk assay

ไอโซเลต	การยับยั้ง fruiting body ^{1/}	ไอโซเลต	การยับยั้ง fruiting body ^{1/}
Control	4.0	D4133	1.0
D2414	4.0	E4133	3.8
A2423	4.0	D4324	2.6
B2423	4.0	A4433	1.0
C2423	4.0	E4914	1.0
D2933	2.8	A4923	1.6
A3634	4.0	B4934	1.0
A3712	4.0	E6722	2.0
A3723	0.4	A7513	1.6
A3823	4.0	A7713	2.0
B3823	4.0	A7714	1.4
A3922	4.0	B7714	1.6
D4113	0.6	A7962	1.0
A4133	0.6	A7973	1.0
B4133	4.0	A8031	2.2
C4133	4.0		

^{1/} 0 ไม่พบ fruiting body

- 1 มีปริมาณ fruitng body 1 – 25 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ leaf disk
- 2 มีปริมาณ fruitng body 26 – 50 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ leaf disk
- 3 มีปริมาณ fruitng body 51 – 75 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ leaf disk
- 4 มีปริมาณ fruitng body 76 – 100 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ leaf disk



ภาพที่ 7 การยับยั้งการสร้าง fruiting body ของรา *Colletotrichum gloeosporioides* โดย จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ด้วยเทคนิค leaf disk assay หลังการบ่มเชื้อ 7 วัน
 ก. แบคทีเรียปฏิปักษ์ D2835, ข. ยีสต์ปฏิปักษ์ D4113
 C. กรรมวิธีควบคุมโดยการปลูกรา *C. gloeosporioides* เพียงอย่างเดียว
 B. กรรมวิธีทดสอบ (แบคทีเรียปฏิปักษ์)
 Y. กรรมวิธีทดสอบ (ยีสต์ปฏิปักษ์)

2.2.3 ประสิทธิภาพการควบคุมโรคแอนแทรคโนสบนผลชมพู

การทดสอบการควบคุมโรคแอนแทรคโนสบนผลชมพู พบว่า แบคทีเรีย D2835 และยีสต์ D4113 สามารถยับยั้งการเกิดโรคได้ โดยการใช้จุลินทรีย์ก่อนการปลูกรเป็นเวลา 12 ชั่วโมง แบคทีเรีย D2835 มีประสิทธิภาพในการลดขนาดแผลได้ดีกว่าการใช้ยีสต์ D4113 และเมื่อมีการใช้จุลินทรีย์พร้อมและหลังการปลูกรเป็นเวลา 12 ชั่วโมง จุลินทรีย์ทั้งสองไอโซเลตมีประสิทธิภาพควบคุมโรคเท่าเทียมกัน โดยแบคทีเรีย D2835 มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางแผล 5.00 6.90 และ 11.30 มิลลิเมตร ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่ปลูกร *C. gloeosporioides* เพียงอย่างเดียวซึ่งมีขนาดแผล 13.10 มิลลิเมตร ในขณะที่ยีสต์ D4113 มีขนาดแผล 2.70 1.90 และ 6.70 มิลลิเมตร ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุมซึ่งมีขนาดแผล 9.30 มิลลิเมตร (ตารางที่ 9 และ ภาพที่ 8)

ตารางที่ 9 ประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ประยุกต์ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสบนผลชมพูที่เกิดจากการปลูกร *C. gloeosporioides* แบบไม่ทำแผล หลังบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 7 วัน

ไอโซเลต	ขนาดแผล (มิลลิเมตร)			
	Control ^{a/}	ก่อน 12 ช.ม. ^{b/}	0 ช.ม. ^{c/}	หลัง 12 ช.ม. ^{d/}
D2835	13.10 a ^{1/}	5.00 d	6.90 c	11.3 b
A3723	9.70 a	8.90 a	9.30 a	9.40 a
D4113	9.30 a	2.70 c	1.90 c	6.70 b

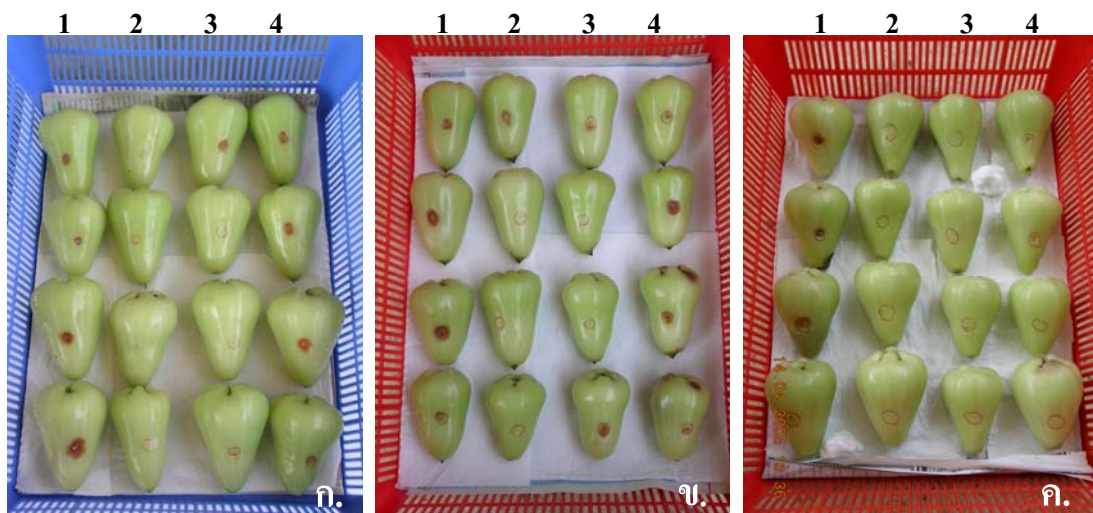
^{1/} ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวนอนไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ตามวิธี Duncan's multiple range test

^{a/} หยดสปอร์รา *C. gloeosporioides* เพียงอย่างเดียว

^{b/} หยดเซลล์แขวนลอยของจุลินทรีย์ประยุกต์ก่อนหยดสปอร์รา *C. gloeosporioides* 12 ชั่วโมง

^{c/} หยดเซลล์แขวนลอยของจุลินทรีย์ประยุกต์พร้อมกับสปอร์รา *C. gloeosporioides*

^{d/} หยดเซลล์แขวนลอยของจุลินทรีย์ประยุกต์หลังหยดสปอร์รา *C. gloeosporioides* 12 ชั่วโมง



ภาพที่ 8 การควบคุมการเกิดโรคแอนแทรกโนสบนผลชมพูโดยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ไอโซเลตต่างๆ หลังการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 7 วัน
ก., ข. และ ค. คือ แบคทีเรีย D2835, ยีสต์ A3723 และยีสต์ D4113 ตามลำดับ
เรียงลำดับกรรมวิธีทดลองตามแถวในแนวตั้งของชมพูโดยเริ่มจากจากซ้ายมือไปขวามือ
ดังนี้

- 1 กรรมวิธีควบคุมโดยการปลูกรา *C. gloeosporioides* เพียงอย่างเดียว
- 2 การใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ก่อนการปลูกรา 12 ชั่วโมง
- 3 การใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์พร้อมกับการปลูกรา
- 4 การใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์หลังการปลูกรา 12 ชั่วโมง

3. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่คัดเลือกได้ในการควบคุมโรคแอนแทรก โนสบนผลมะม่วง

3.1 การควบคุมโรคแอนแทรกโนสบนผลมะม่วงน้ำดอกไม้

เมื่อนำผลที่ได้จากการทดลองมาวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test พบว่าปัจจัยที่ 1 ลำดับการควบคุมโรค และปัจจัยที่ 2 กรรมวิธีควบคุมโรคไม่มีอิทธิพลร่วมกัน

ยีสต์ไอโซเลต D4113 แบคทีเรีย 3107 และ 3103 สามารถควบคุมโรคแอนแทรกโนสได้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งจากกรรมวิธีควบคุม เมื่อทำการควบคุมพร้อมและก่อนการปลูกราเป็นเวลา 12 ชั่วโมง สามารถควบคุมโรคได้ดีกว่าการควบคุมภายหลังการปลูกรา โดยการหยดเซลล์แขวนลอยของยีสต์ D4113 พร้อมและก่อนการปลูกราสาเหตุโรคเป็นเวลา 12 ชั่วโมงมีประสิทธิภาพควบคุมโรคดีที่สุด โดยมีขนาดแผล 1.2 และ 1.3 มิลลิเมตร ตามลำดับเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมโดยการปลูกราสาเหตุโรคเพียงอย่างเดียวที่มีขนาดแผล 5.4 มิลลิเมตร รองลงมาคือแบคทีเรีย 3107 ที่มีขนาดแผล 1.6 มิลลิเมตร เท่ากันทั้งการใช้พร้อมและก่อนกับการปลูกราสาเหตุโรค ในขณะที่กรรมวิธีควบคุมมีขนาดแผล 5.3 มิลลิเมตร เมื่อใช้จุลินทรีย์หลังการปลูกราเป็นเวลา 12 ชั่วโมง พบว่าการใช้แบคทีเรีย 3107 มีแนวโน้มการควบคุมโรคได้ดีกว่าการใช้ยีสต์ D4113 โดยมีขนาดแผล 2.5 และ 3.9 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 10) เมื่อเปรียบเทียบระดับการเกิดโรคพบว่ากรรมวิธีการใช้ยีสต์ D4113 และแบคทีเรีย 3107 พร้อมและก่อนการปลูกราสาเหตุโรคเป็นเวลา 12 ชั่วโมงมีระดับการเกิดโรคต่ำกว่ากรรมวิธีอื่นๆ (ตารางที่ 11 และภาพที่ 9-11)

3.2 การควบคุมโรคแอนแทรกโนสบนผลมะม่วงโชคอนันต์

เมื่อนำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาวิเคราะห์ค่าทางสถิติและเปรียบเทียบเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test พบว่าปัจจัยที่ 1 ลำดับการควบคุมโรค และปัจจัยที่ 2 กรรมวิธีควบคุมโรคไม่มีอิทธิพลร่วมกัน

การใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์หรือการใช้สารเคมี azoxystrobin ความเข้มข้น 500 ppm ก่อนการปลูกราเป็นเวลา 12 ชั่วโมงและพร้อมกับการปลูกรา สามารถลดการเกิดโรคได้มากกว่าการใช้หลัง

การปลูกรากเป็นเวลา 12 ชั่วโมง โดยการใช้สารเคมี azoxystrobin ความเข้มข้น 500 ppm สามารถลดการเกิดโรคได้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (ตารางที่ 12 และ 13) โดยการใช้สารเคมี azoxystrobin มีระดับการเกิดโรคเท่ากับ 0.34 0.92 และ 0.43 เมื่อใช้ก่อนการปลูกรากเป็นเวลา 12 ชั่วโมงพร้อมกับการปลูกราก และหลังการปลูกรากเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ตามลำดับ เปรียบเทียบกับระดับการเกิดโรคในกรรมวิธีควบคุม 2.87 รองลงมาคือยีสต์ D4113 มีระดับการเกิดโรค 0.98 0.75 และ 1.20 เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม 2.73 ในขณะที่แบคทีเรีย 3103 และ 3107 ให้ผลไม่แตกต่างกัน (ภาพที่ 12-14)

ตารางที่ 10 อิทธิพลของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อขนาดแผลของโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วงน้ำดอกไม้ โดยการปลูกรากสาเหตุโรคแบบไม่ทำแผล หลังบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 7 วัน

กรรมวิธีควบคุม	ขนาดแผล (มิลลิเมตร)				ค่าเฉลี่ยอิทธิพลของกรรมวิธีควบคุม
	Control ^{a/}	ก่อน 12 ช.ม. ^{b/}	0 ช.ม. ^{c/}	หลัง 12 ช.ม. ^{d/}	
3103	5.0	1.8	1.4	4.0	3.04 b ^{1/}
3107	5.3	1.6	1.6	2.5	2.73 b
3503	5.9	2.5	2.2	6.2	4.18 a
D4113	5.4	1.3	1.2	3.9	2.93 b
ค่าเฉลี่ยอิทธิพลของลำดับการควบคุม	5.36 a ^{2/}	1.76 c	1.59 c	4.17 b	

^{1/2/} ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวนอนและแนวตั้งตามลำดับไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ตามวิธี Duncan's multiple range test

^{a/} หยดสปอร์รา *C. gloeosporioides* เพียงอย่างเดียว

^{b/} หยดเซลล์แขวนลอยของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ก่อนหยดสปอร์รา *C. gloeosporioides* 12 ชั่วโมง

^{c/} หยดเซลล์แขวนลอยของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์พร้อมกับสปอร์รา *C. gloeosporioides*

^{d/} หยดเซลล์แขวนลอยของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์หลังหยดสปอร์รา *C. gloeosporioides* 12 ชั่วโมง

ตารางที่ 11 อิทธิพลของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อระดับการเกิดโรคแอนแทรกโนสบนผลมะม่วง
น้ำดอกไม้ไร้โดยการปลูกกราสาเหตุโรคแบบไม่ทำแผลหลังบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็น
ระยะเวลา 7 วัน

กรรมวิธีควบคุม	ระดับการเกิดโรค				ค่าเฉลี่ยอิทธิพลของ กรรมวิธีควบคุม
	Control ^{a/}	ก่อน 12 ช.ม. ^{b/}	0 ช.ม. ^{c/}	หลัง 12 ช.ม. ^{d/}	
3103	2.81	1.2	1.06	2.15	1.80 b ^{1/}
3107	2.80	1.07	0.98	1.45	1.58 c
3503	2.95	1.50	1.30	2.68	2.10 a
D4113	2.91	0.89	0.80	1.94	1.63 c
ค่าเฉลี่ยอิทธิพลของ ลำดับการควบคุม	2.87 a ^{2/}	1.16 c	1.03 c	2.05 b	

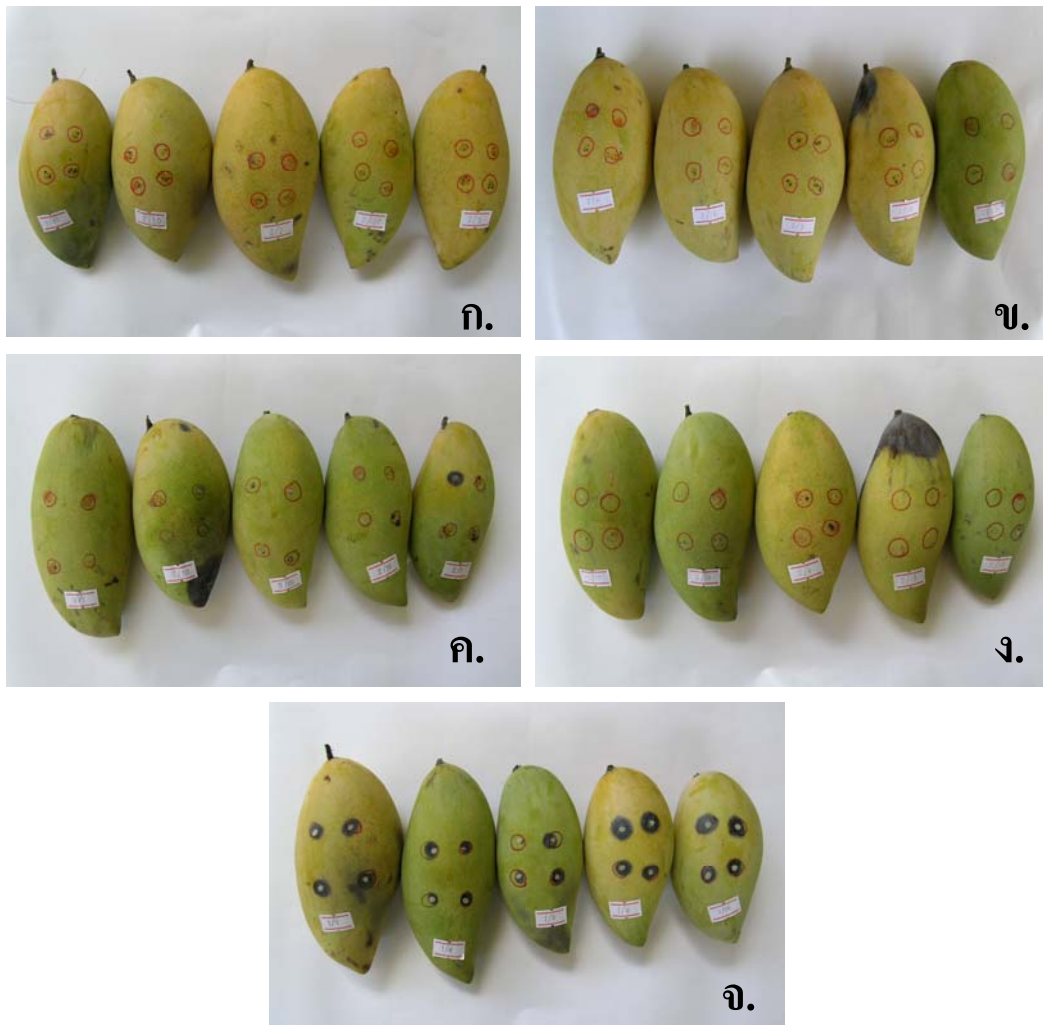
^{1/2/} ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวดิ่งและนอนตามลำดับไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น
95 เปอร์เซนต์ตามวิธี Duncan's multiple range test

^{a/} หยดสปอร์รา *C. gloeosporioides* เพียงอย่างเดียว

^{b/} หยดเซลล์แขวนลอยของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ก่อนหยดสปอร์รา *C. gloeosporioides* 12 ชั่วโมง

^{c/} หยดเซลล์แขวนลอยของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์พร้อมกับสปอร์รา *C. gloeosporioides*

^{d/} หยดเซลล์แขวนลอยของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์หลังหยดสปอร์รา *C. gloeosporioides* 12 ชั่วโมง



ภาพที่ 9 อาการโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วงน้ำดอกไม้ เมื่อหยดเซลล์แขวนลอยของจุลินทรีย์
 ปฏิบัติก่อนปลูกรา *Colletotrichum gloeosporioides* เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และบ่มเชื้อที่
 อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 7 วัน

ก. แบคทีเรีย 3103

ข. แบคทีเรีย 3107

ค. แบคทีเรีย 3503

ง. ยีสต์ D4113

จ. กรรมวิธีควบคุมโดยการปลูกรา *C. gloeosporioides* เพียงอย่างเดียว



ภาพที่ 10 อาการโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วงน้ำดอกไม้เมื่อหยดเซลล์แขวนลอยของจุลินทรีย์
 ปฏิปักษ์พร้อมปลูกรา *Colletotrichum gloeosporioides* และบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็น
 ระยะเวลา 7 วัน
 ก. แบคทีเรีย 3103
 ข. แบคทีเรีย 3107
 ค. แบคทีเรีย 3503
 ง. ยีสต์ D4113
 จ. กรรมวิธีควบคุมโดยการปลูกรา *C. gloeosporioides* เพียงอย่างเดียว



ภาพที่ 11 อาการโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วงน้ำดอกไม้ เมื่อหยดเซลล์แขวนลอยของจุลินทรีย์
 ปฏิปักษ์หลังปลูกรา *Colletotrichum gloeosporioides* เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และบ่มเชื้อที่
 อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 7 วัน

ก. แบคทีเรีย 3103

ข. แบคทีเรีย 3107

ค. แบคทีเรีย 3503

ง. ซีสต์ D4113

จ. กรรมวิธีควบคุมโดยการปลูกรา *C. gloeosporioides* เพียงอย่างเดียว

ตารางที่ 12 อิทธิพลของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อขนาดแผลของโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วง
โศกอนันต์โดยการปลูกราสาเหตุโรคแบบไม่ทำแผลหลังบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็น
ระยะเวลา 7 วัน

กรรมวิธีควบคุม	ขนาดแผล (มิลลิเมตร)				ค่าเฉลี่ยอิทธิพลของ กรรมวิธีควบคุม
	Control ^{a/}	ก่อน 12 ช.ม. ^{b/}	0 ช.ม. ^{c/}	หลัง 12 ช.ม. ^{d/}	
3103	4.25	1.21	1.03	1.92	2.08 a ^{1/}
3107	4.71	1.13	1.29	1.57	2.20 a
D4113	4.56	1.16	1.42	1.60	2.18 a
Fungicide ^{3/}	4.43	0.32	0.88	0.38	1.53 b
ค่าเฉลี่ยอิทธิพลของ ลำดับการควบคุม	4.49 a ^{2/}	0.96 c	1.15 bc	1.36 b	

^{1/2/} ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวดิ่งและแนวนอนตามลำดับไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความ
เชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ตามวิธี Duncan's multiple range test

^{3/} สารเคมี azoxystrobin ความเข้มข้น 500 ppm

^{a/} หยดสปอร์รา *C. gloeosporioides* เพียงอย่างเดียว

^{b/} หยดเซลล์แขวนลอยของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ก่อนหยดสปอร์รา *C. gloeosporioides* 12 ชั่วโมง

^{c/} หยดเซลล์แขวนลอยของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์พร้อมกับสปอร์รา *C. gloeosporioides*

^{d/} หยดเซลล์แขวนลอยของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์หลังหยดสปอร์รา *C. gloeosporioides* 12 ชั่วโมง

ตารางที่ 13 อิทธิพลของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อระดับการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วง
โศกอนันต์โดยการปลูกราสาเหตุโรคแบบไม่ทำแผลหลังบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็น
ระยะเวลา 7 วัน

กรรมวิธีควบคุม	ระดับการเกิดโรค				ค่าเฉลี่ยอิทธิพลของ กรรมวิธีควบคุม
	Control ^{a/}	ก่อน 12 ช.ม. ^{b/}	0 ช.ม. ^{c/}	หลัง 12 ช.ม. ^{d/}	
3103	2.61	1.25	1.03	1.73	1.64 a ^{1/}
3107	3.00	1.11	1.18	1.38	1.68 a
D4113	2.73	0.98	0.75	1.20	1.41 b
Fungicide ^{3/}	2.87	0.34	0.92	0.43	1.15 c
ค่าเฉลี่ยอิทธิพลของ ลำดับการควบคุม	2.81 a ^{2/}	0.92 c	0.97 c	1.18 b	

^{1/2/} ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวดิ่งและแนวนอนตามลำดับไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความ
เชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ตามวิธี Duncan's multiple range test

^{3/} สารเคมี azoxystrobin ความเข้มข้น 500 ppm

^{a/} หยดสปอร์รา *C. gloeosporioides* เพียงอย่างเดียว

^{b/} หยดเซลล์แขวนลอยของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ก่อนหยดสปอร์รา *C. gloeosporioides* 12 ชั่วโมง

^{c/} หยดเซลล์แขวนลอยของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์พร้อมกับสปอร์รา *C. gloeosporioides*

^{d/} หยดเซลล์แขวนลอยของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์หลังหยดสปอร์รา *C. gloeosporioides* 12 ชั่วโมง



ภาพที่ 12 อาการ โรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วงโชคอนันต์ เมื่อหยดเซลล์แขวนลอยของ จุลินทรีย์ปลูกก่อนปลูกรา *Colletotrichum gloeosporioides* เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 7 วัน

ก. แบคทีเรีย 3103

ข. แบคทีเรีย 3107

ค. ยีสต์ D4113

ง. สารเคมี azoxystrobin ความเข้มข้น 500 ppm

จ. กรรมวิธีควบคุมโดยการปลูกรา *C. gloeosporioides* เพียงอย่างเดียว



ภาพที่ 13 อาการโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วงโชคอนันต์ เมื่อหยดเซลล์แขวนลอยของ จุลินทรีย์ปฏิปักษ์พร้อมกับปลูกรา *Colletotrichum gloeosporioides* และบ่มเชื้อที่ อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 7 วัน

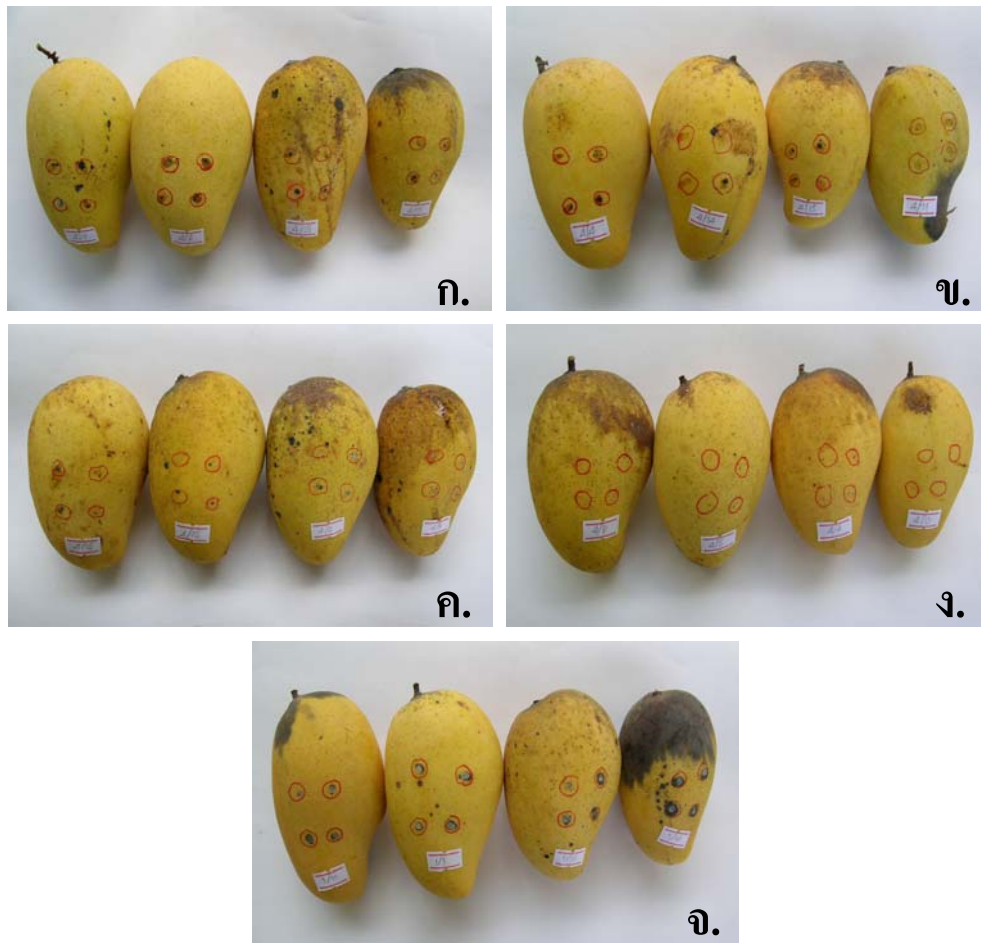
ก. แบคทีเรีย 3103

ข. แบคทีเรีย 3107

ค. ยีสต์ D4113

ง. สารเคมี azoxystrobin ความเข้มข้น 500 ppm

จ. กรรมวิธีควบคุมโดยการปลูกรา *C. gloeosporioides* เพียงอย่างเดียว



ภาพที่ 14 อาการโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วงโชคอนันต์ เมื่อหยดเซลล์แขวนลอยของ จุลินทรีย์ปฏิปักษ์หลังปลูก *Colletotrichum gloeosporioides* เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 7 วัน

ก. แบคทีเรีย 3103

ข. แบคทีเรีย 3107

ค. ยีสต์ D4113

ง. สารเคมี azoxystrobin ความเข้มข้น 500 ppm

จ. กรรมวิธีควบคุมโดยการปลูก *C. gloeosporioides* เพียงอย่างเดียว

4. คุณลักษณะการเป็นศัตรูธรรมชาติที่คัดเลือกได้ต่อความหลากหลายของรา *C. gloeosporioides*

แบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 3 ไอโซเลต สามารถยับยั้งการเจริญของโคโลนีรา *C. gloeosporioides* ทั้ง 10 ไอโซเลตที่มีความหลากหลายของแหล่งที่มาได้ โดยทำให้เกิดบริเวณ inhibition zone บนอาหารเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกับผลการทดลองในราไอโซเลต CG-395 และพบว่า แบคทีเรีย 3107 สามารถยับยั้งการเจริญของโคโลนีราได้ดีที่สุดโดยมีค่าเฉลี่ยการยับยั้งเท่ากับ 53.48 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ 3103 และ 3503 มีค่าเฉลี่ยการยับยั้งได้ 46.93 และ 40.18 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 14)

ตารางที่ 14 ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา *C. gloeosporioides* ไอโซเลตต่างๆ โดยแบคทีเรียปฏิปักษ์

ไอโซเลต	Control		3103		3107		3503	
	ขนาดโคโลนี (cm)	% ยับยั้ง	ขนาดโคโลนี (cm)	% ยับยั้ง	ขนาดโคโลนี (cm)	% ยับยั้ง	ขนาดโคโลนี (cm)	% ยับยั้ง
351	5.70 a ^{1/}	0	3.75 b	34.21	3.55 b	37.72	4.02 b	29.47
353	9.00 a	0	4.52 b	49.78	3.28 c	63.56	4.08 b	54.67
368	9.00 a	0	4.85 b	46.11	4.00 c	55.56	5.85 b	35.0
370	9.00 a	0	3.97 b	55.89	3.15 c	65.0	4.23 b	53.0
379	9.00 a	0	5.50 b	38.89	4.20 c	53.33	5.77 b	35.89
381	9.00 a	0	4.21 b	53.22	3.31 c	63.22	4.48 b	50.22
386	4.63 a	0	2.60 b	43.84	2.60 b	43.84	3.00 b	35.21
394	6.67 a	0	3.62 bc	45.73	3.05 c	54.27	4.32 b	35.24
404	5.07 a	0	3.00 b	40.83	3.13 b	38.26	3.73 b	26.43
411	9.00 a	0	3.53 b	60.78	3.60 b	60.0	4.80 b	46.67
ค่าเฉลี่ย	7.61	0	3.96	46.93	3.39	53.48	4.42	40.18

^{1/} ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวนอนไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ตามวิธี Duncan's multiple range test

5. กลไกของจุลินทรีย์ปฏิบัติในการยับยั้งรา *C. gloeosporioides*

5.1 การยับยั้งการงอกของสปอร์ของรา *C. gloeosporioides*

หลังการบ่มเชื้อ 24 ชั่วโมง พบว่าการใช้เซลล์แขวนลอยของจุลินทรีย์ปฏิบัติทุกไอโซเลต สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ได้ โดยแบคทีเรีย 3103 และ 3503 สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ได้ดีกว่ากรรมวิธีอื่นๆ โดยมีการงอกของสปอร์ 17.00 และ 5.33 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่กรรมวิธีควบคุม โดยการหดยดสปอร์แขวนลอยเพียงอย่างเดียวมีการงอก 94.67 เปอร์เซ็นต์ การใช้เซลล์แขวนลอยของจุลินทรีย์ปฏิบัติสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์และความยาวของ germ tube ได้ดีกว่าการใช้ culture filtrate แต่พบว่าการใช้ culture filtrate ของยีสต์ D4113 ไม่สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์และความยาวของ germ tube ได้ (ตารางที่ 15) การพัฒนา germ tube ของรา *C. gloeosporioides* ที่งอกมีลักษณะอ้วนเป็นข้อปล้องและโป่งพองในการใช้ culture filtrate และเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรีย (ภาพที่ 15)

5.2 การยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา *C. gloeosporioides*

การใช้เซลล์แขวนลอยและ culture filtrate ของแบคทีเรีย 3103 3107 และ 3503 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา *C. gloeosporioides* โดยทำให้เส้นใยเกิดการโป่งพองเป็นข้อปล้องและแตกแขนงน้อยกว่าปกติเมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุม การใช้เซลล์แขวนลอยของยีสต์ D4113 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยได้เช่นกัน แต่ไม่พบการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเมื่อใช้ culture filtrate ของยีสต์ (ตารางที่ 16 และภาพที่ 16)

ตารางที่ 15 อิทธิพลของเซลล์แขวนลอยและ culture filtrate ของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อการงอกของสปอร์รา *C. gloeosporioides* หลังการทดสอบและบ่มเชื้อไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

กรรมวิธี	การงอกของสปอร์ (%)	ความยาว germ tube (µm)
Control	94.67 a ¹	78.50 a
cell suspension 3103	17.00 ef	21.75 c
cell suspension 3107	34.33 de	27.50 bc
cell suspension 3503	5.33 f	24.25 c
cell suspension D4113	55.33 c	26.50 c
culture filtrate 3103	24.33 de	22.75 c
culture filtrate 3107	75.00 b	36.00 b
culture filtrate 3503	36.67 d	35.75 b
culture filtrate D4113	98.00 a	75.75 a

^{1/} ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ตามวิธี Duncan's multiple range test

ภาพที่ 15 กลไกการยับยั้งการงอกและความยาวของ germ tube จากสปอร์รา *Colletotrichum gloeosporioides* โดยการหยดเซลล์แขวนลอยหรือ culture filtrate ของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์บนแผ่นสไลด์พร้อมสปอร์แขวนลอยของรา บ่มในสภาพชื้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่กำลังขยาย 400 เท่า (a : สปอร์งอกปกติ; b: germ tube โป่งพอง; c: germ tube โป่งพอง เล็กน้อยและเป็นข้อปล้อง)

ก. เซลล์แขวนลอยของ 3103

ข. เซลล์แขวนลอยของ 3107

ค. เซลล์แขวนลอยของ 3503

ง. เซลล์แขวนลอยของ D4113

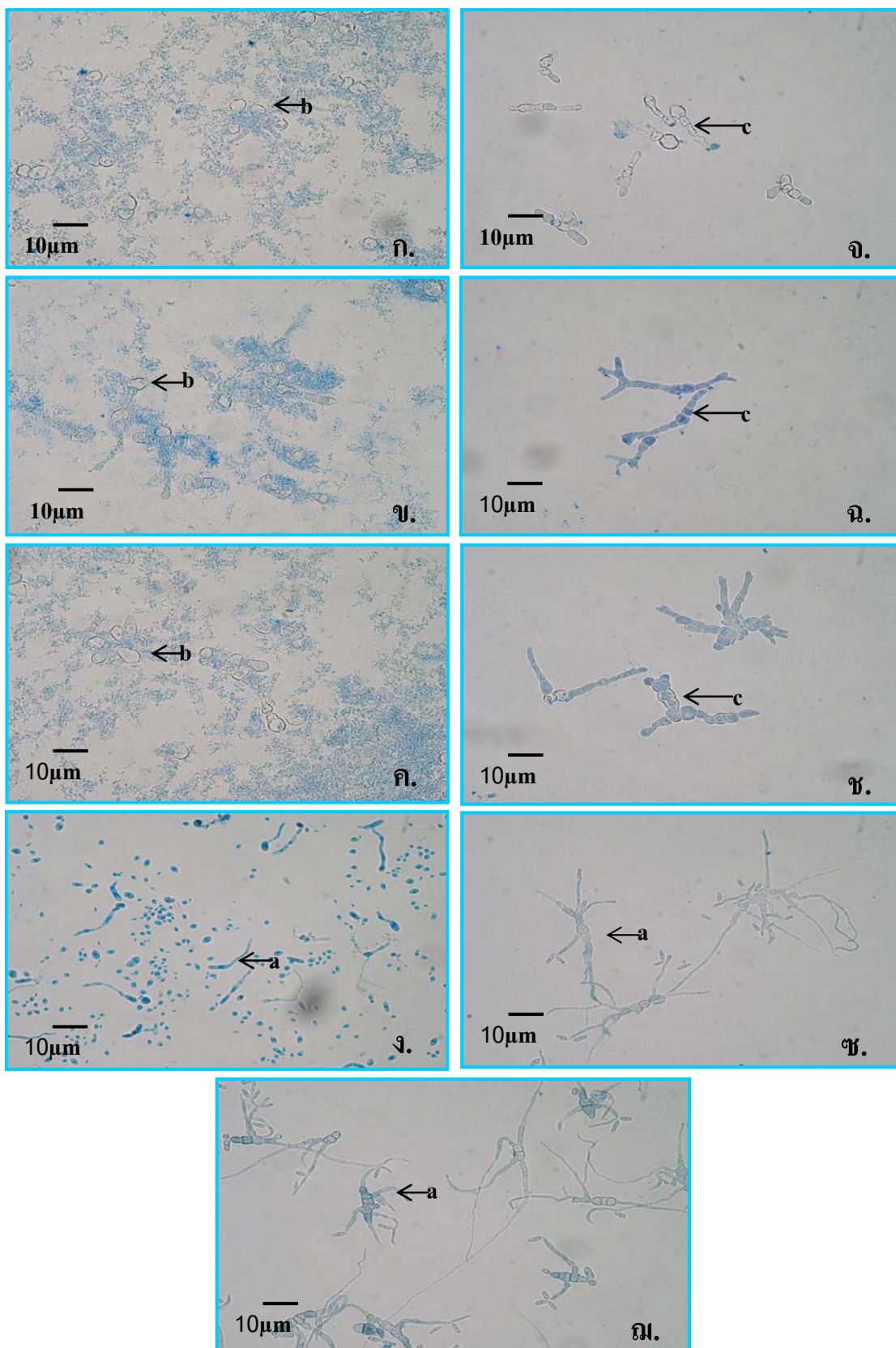
จ. culture filtrate 3103

ฉ. culture filtrate 3107

ช. culture filtrate 3503

ซ. culture filtrate D4113

ณ. สปอร์แขวนลอย *C. gloeosporioides*

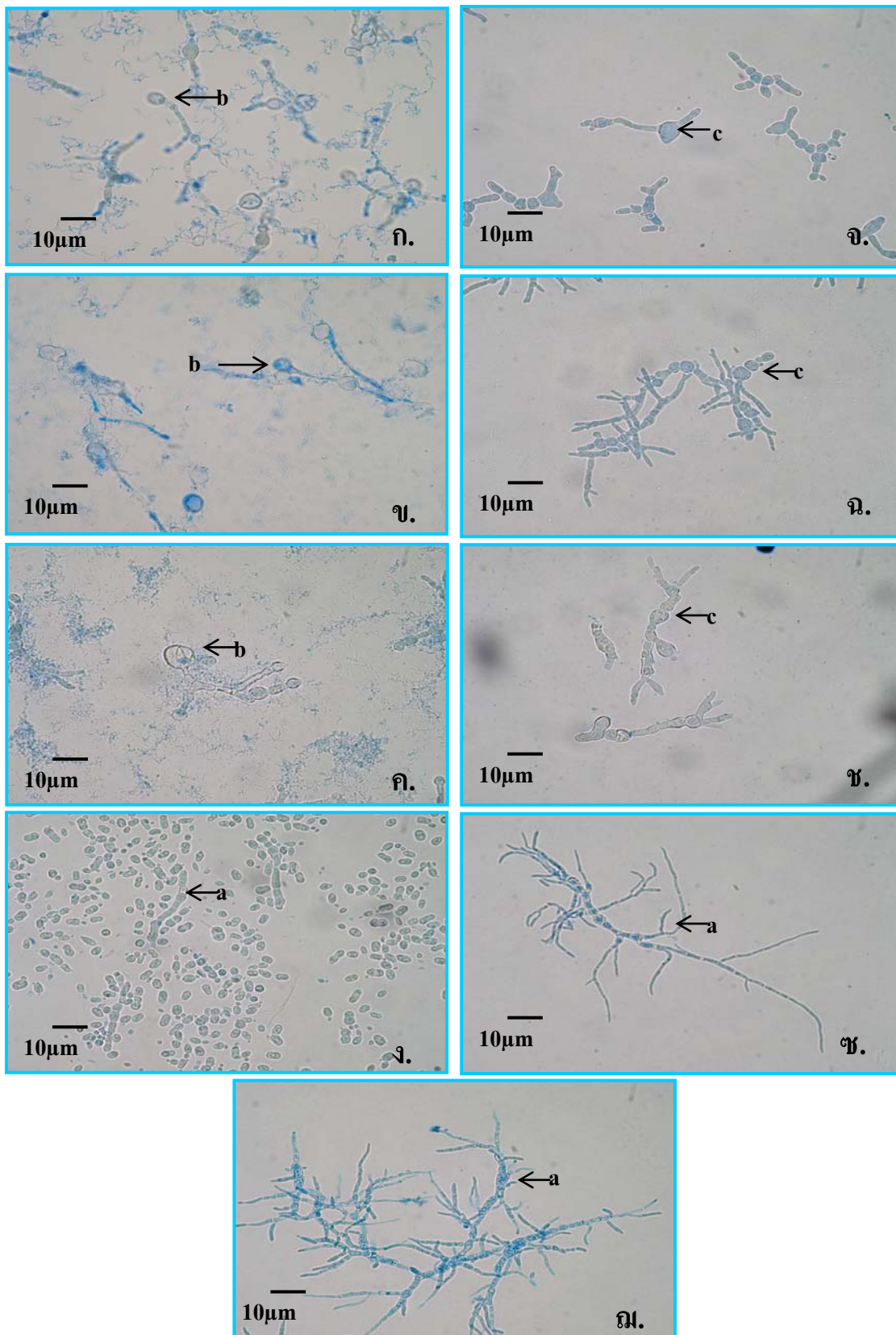


ตารางที่ 16 อิทธิพลของเซลล์แขวนลอยและ culture filtrate ของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อการเจริญของ
เส้นใยรา *C. gloeosporioides*

กรรมวิธี	ความยาวเส้นใย (μm)	ลักษณะเส้นใย
Control	113.25 a ^{1/}	เส้นใยแตกแขนงปกติ
cell suspension 3103	29.00 c	เส้นใยโป่งพอง แตกแขนงน้อย
cell suspension 3107	30.25 c	เส้นใยโป่งพองเล็กน้อย
cell suspension 3503	34.25 c	เส้นใยโป่งพอง เป็นข้อปล้อง
cell suspension D4113	52.25 b	เส้นใยปกติ แตกแขนงน้อย
culture filtrate 3103	29.00 c	เส้นใยอ้วนเป็นข้อปล้อง
culture filtrate 3107	52.75 b	เส้นใยอ้วนเป็นข้อปล้อง
culture filtrate 3503	39.25 c	เส้นใยอ้วนเป็นข้อปล้อง
culture filtrate D4113	108.25a	เส้นใยแตกแขนงปกติ

^{1/} ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ตามวิธี
Duncan's multiple range test

- ภาพที่ 16 กลไกการยับยั้งการพัฒนาของเส้นใยของรา *Colletotrichum gloeosporioides* โดยการหยด เซลล์แขวนลอยหรือ culture filtrate ของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์บนแผ่นสไลด์หลังหยดสปอร์ รา 12 ชั่วโมง บ่มในสภาพชื้นจนครบเวลา 36 ชั่วโมง ที่กำลังขยาย 400 เท่า (a : เส้นใย เจริญปกติ; b: germ tube โป่งพอง; c: germ tube โป่งพองเล็กน้อยและเป็นข้อปล้อง)
- ก. เซลล์แขวนลอยของ 3103
 - ข. เซลล์แขวนลอยของ 3107
 - ค. เซลล์แขวนลอยของ 3503
 - ง. เซลล์แขวนลอยของ D4113
 - จ. culture filtrate 3103
 - ฉ. culture filtrate 3107
 - ช. culture filtrate 3503
 - ซ. culture filtrate D4113
 - ณ. สปอร์แขวนลอย *C. gloeosporioides*



6. การจำแนกชนิดจุลินทรีย์ปฏิบัติ

เลี้ยงแบคทีเรียปฏิบัติ 3103 3107 และ 3503 ที่เจริญอยู่บนผิวหนังอาหารแข็ง NGA และเมื่ออายุ 48 ชั่วโมง นำมาทดสอบ Gram's strain reaction พบว่าแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลต ติดสีม่วงของ crystal violet (gram positive) เมื่อนำมาทดสอบปฏิกิริยาอีกครั้งอีกครั้งกับ 3% KOH ปรากฏว่าให้ผลเป็น positive จึงยืนยันได้ว่าทุกไอโซเลตเป็นแกรมบวก

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์จุลินทรีย์ปฏิบัติภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า D4113 มีลักษณะโคโลนีสีครีม ผิวหน้าโคโลนีนุ่ม เป็นมัน ขอบเรียบ รูปร่างกลม เมื่ออายุมากขึ้นจะเปลี่ยนเป็นสีชมพูอ่อน และมีการเจริญของ pseudo hypha ออกมาจากโคโรรอบขอบโคโลนี และมีขนาดเซลล์ประมาณ $5-10 \times 2-3$ ไมครอน รูปร่างรี หัว-ท้ายแหลม มีการแตกหน่อจากตรงปลาย เซลล์ไม่เป็นหูกะต่าย สำหรับ 3103 3107 และ 3503 ทั้ง 3 ไอโซเลตมีลักษณะโคโลนีสีขาว ผิวหน้าเรียบ ด้านรูปร่างโคโลนีไม่แน่นอน ลักษณะของเซลล์ค่อนข้างเหมือนกันเป็นสาย สร้างเอนโดสปอร์ รูปร่างรีบริเวณกลางเซลล์ โดยมีขนาดเซลล์ประมาณ $0.4-0.5 \times 2-2.5$, $0.5-0.7 \times 2-2.5$ และ $0.5-0.8 \times 2-2.5$ ไมครอน ตามลำดับ (ภาพที่ 14-15) ผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการของจุลินทรีย์ปฏิบัติทั้ง 3 ไอโซเลต พบว่าทุกไอโซเลตเป็นพวกใช้ออกซิเจน (aerobe) สร้างเอนไซม์ catalase สามารถย่อยแป้งและเจลาติน เจริญได้ในอาหารที่มีเกลือ 5, 7 และ 10 เปอร์เซ็นต์ จัดอยู่ในสกุล *Bacillus* ตามกระบวนการจัดจำแนกชนิดแบคทีเรียของ The Burgey's Manual of Systematic Bacteriology Vol.2 (Sneath *et al.*, 1980) (ตารางที่ 17)

ผลการจำแนกชื่อวิทยาศาสตร์ด้วยการใช้ Biolog Microlog System โดยสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย พบว่าไอโซเลต D4113 ได้ทำการจำแนกชื่อวิทยาศาสตร์ด้วย พบว่าเป็นยีสต์ *Cryptococcus humicola* และสำหรับไอโซเลต 3103 3107 และ 3503 ทำการจำแนกชื่อวิทยาศาสตร์วิธีทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ยืนยันว่าจุลินทรีย์ทั้ง 3 ไอโซเลตคือแบคทีเรีย *Bacillus megaterium*

ตารางที่ 17 ผลการทดสอบทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีเบื้องต้นของแบคทีเรียไอโซเลต 3103 3107 และ 3503 เปรียบเทียบกับแบคทีเรีย *Bacillus* spp.

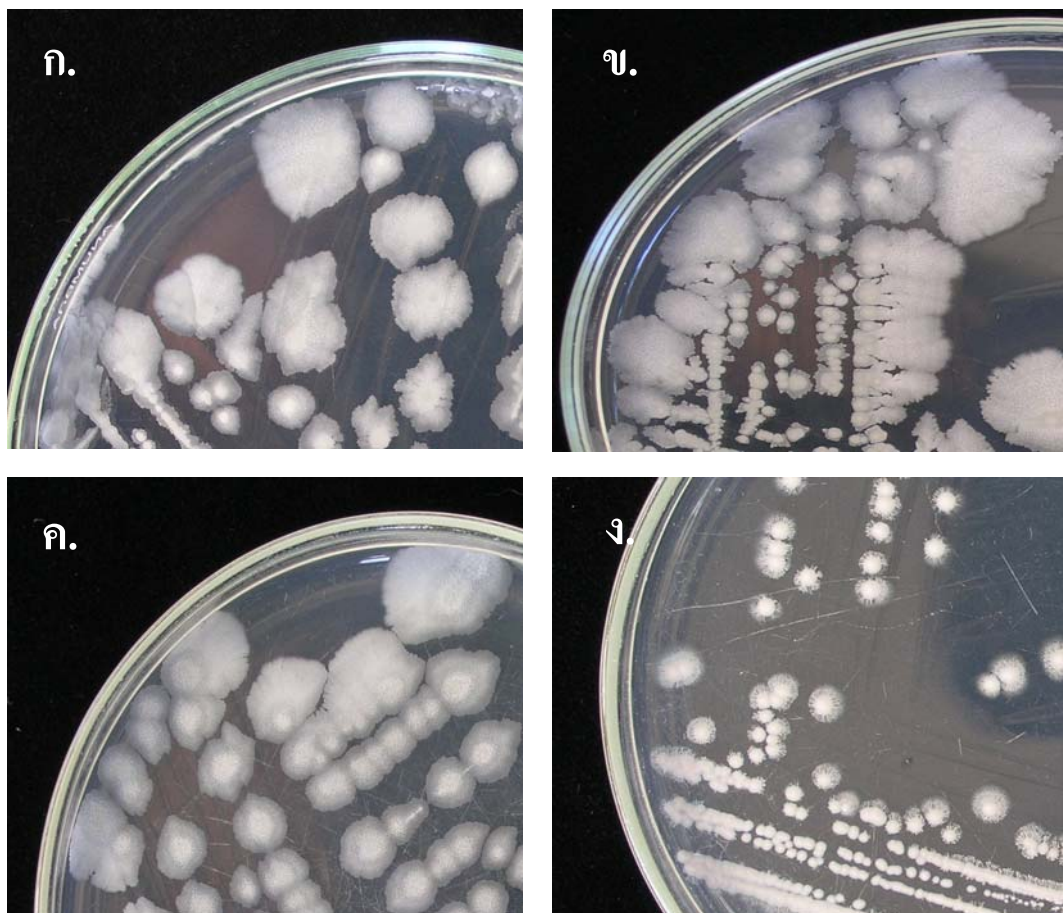
การทดสอบ	ปฏิกิริยา			
	<i>Bacillus</i>	3103	3107	3503
รูปร่างเซลล์	ท่อนสั้น	ท่อนสั้น	ท่อนสั้น	ท่อนสั้น
การติดสีแกรม	+ ^{1/}	+	+	+
3% KOH	- ^{2/}	-	-	-
การสร้างเอนโดสปอร์	C ^{3/}	C	C	C
การเคลื่อนที่ของเชื้อ	+	+	+	+
การใช้ออกซิเจน	+	+	+	+
การสร้างเอนไซม์ catalase	+	+	+	+
การย่อยแป้ง	+	+	+	+
การย่อยเจลาติน	+	+	+	+
การเจริญในอาหารที่มีเกลือ 5%	+	+	+	+
การเจริญในอาหารที่มีเกลือ 7%	+	+	+	+
การเจริญในอาหารที่มีเกลือ 10%	+	+	+	+
การเกิด levan	ND ^{4/}	-	-	-

^{1/} + 90-100% ให้ผลเป็นบวก

^{2/} - 90-100% ให้ผลเป็นลบ

^{3/} C เอนโดสปอร์อยู่บริเวณกลางเซลล์

^{4/} ND ไม่ได้ทดสอบ



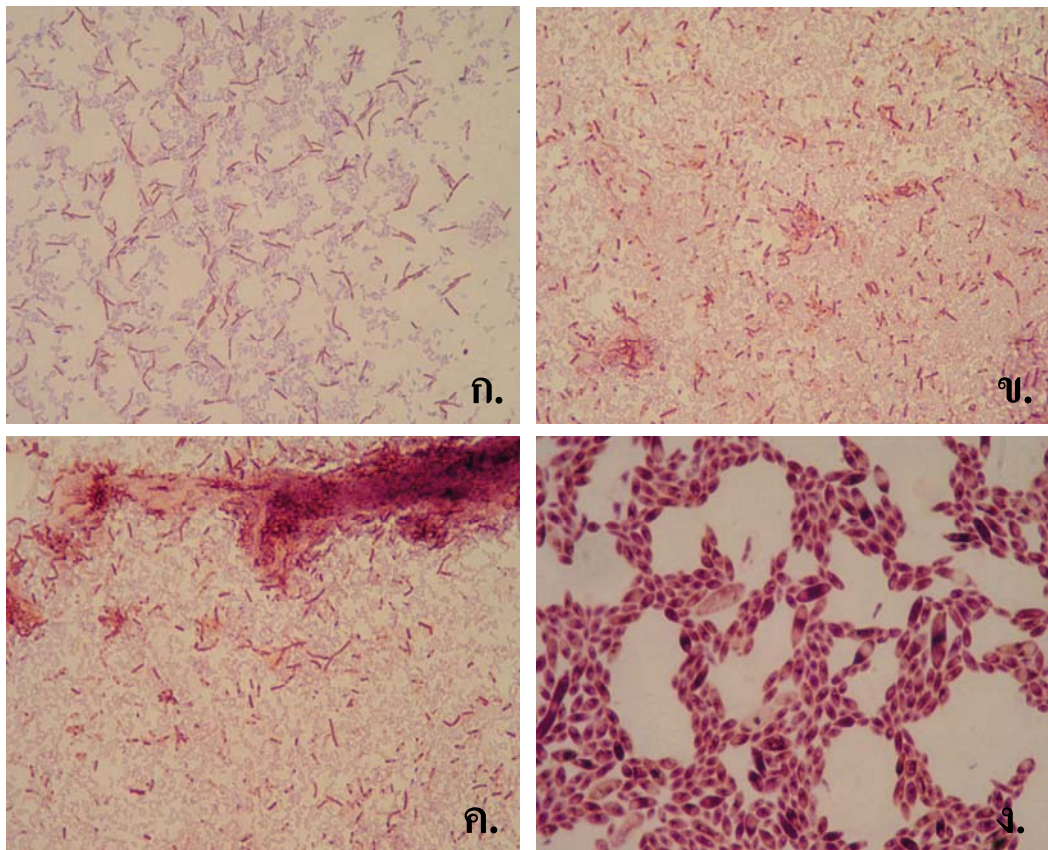
ภาพที่ 17 ลักษณะโคโลนีของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์บนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ

ก. แบคทีเรียไอโซเลต 3103 บนผิวหน้าอาหาร NGA

ข. แบคทีเรียไอโซเลต 3107 บนผิวหน้าอาหาร NGA

ค. แบคทีเรียไอโซเลต 3503 บนผิวหน้าอาหาร NGA

ง. ยีสต์ไอโซเลต D4113 บนผิวหน้าอาหาร GYPA



ภาพที่ 18 ลักษณะรูปร่างเซลล์ของจุลินทรีย์ปฏิกิริยาที่กำลังขยาย 1,000 เท่า

ก. แบคทีเรียไอโซเลต 3103

ข. แบคทีเรียไอโซเลต 3107

ค. แบคทีเรียไอโซเลต 3503

ง. ยีสต์ไอโซเลต D4113

วิจารณ์

โรคแอนแทรคโนสของมะม่วงซึ่งมีสาเหตุจากรา *C. gloeosporioides* พบทำความเสียหายมากในระยะที่มะม่วงออกช่อดอก ดอก ยอด และติดผลอ่อน จนถึงผลมะม่วงหลังการเก็บเกี่ยว โดยทั่วไปการควบคุมโรคนี้นิยมใช้สารเคมีเป็นหลักมาเป็นระยะเวลานาน ก่อให้เกิดมลพิษทางสิ่งแวดล้อม ปัญหาสุขภาพของเกษตรกรและผู้บริโภค รวมทั้งปัญหาการต้านทานต่อสารเคมีของเชื้อรา การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีจึงเป็นแนวทางที่น่าสนใจและมีแนวโน้มประสบความสำเร็จในการใช้ควบคุมโรคทดแทนสารเคมี

การแยกจุลินทรีย์ผิวพืชจากส่วนของช่อดอก ยอด และผลอ่อนเพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วง เนื่องจากจุลินทรีย์ที่มีแหล่งกำเนิดอยู่บริเวณผิวพืชสามารถครอบครองพื้นที่และใช้แร่ธาตุอาหารจากบริเวณผิวพืชได้ดีจึงมีอิทธิพลต่อเชื้อสาเหตุโรคที่อยู่บริเวณดังกล่าวทำให้มีประสิทธิภาพที่ดีในการควบคุมโรคบริเวณผิวพืช (Andrews, 1992) การเก็บตัวอย่างจากแหล่งปลูกผลไม้ในเขตภาคกลางจำนวน 37 สวน สามารถรวบรวมแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีหลากหลายได้ 117 ไอโซเลต จากอาหารผิวหน้า NGA ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทั่วไป และจากการใช้ขั้นตอน enrichment technique โดยใช้อาหารเหลว GYPB ที่มีสภาพเป็นกรดเพื่อเพิ่มปริมาณยีสต์ที่มีปริมาณน้อยกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่นในสภาพธรรมชาติ และความเป็นกรดของอาหารเหลวมีอิทธิพลยับยั้งการเพิ่มปริมาณของแบคทีเรียบนผิวหน้าอาหาร GYPB จากการเก็บตัวอย่างจากแหล่งปลูกผลไม้จำนวน 54 สวน สามารถประสบความสำเร็จในการแยกยีสต์ที่มีลักษณะโคโลนีต่างๆ ได้จำนวนมากถึง 176 ไอโซเลต จากทั้งหมด 230 ไอโซเลต คิดเป็น 76.52 เปอร์เซ็นต์ โดยมีแบคทีเรียที่สามารถทนความเป็นกรดได้เจริญบนอาหารได้บ้าง ปริมาณจุลินทรีย์ที่แยกได้จากส่วนต่างๆ ของพืชคือ ช่อดอก ยอด และผลอ่อน ขึ้นอยู่กับจำนวนตัวอย่างส่วนของพืชที่เก็บ โดยเป็นที่สังเกตว่าปริมาณจุลินทรีย์ที่แยกได้จากช่อดอกมีมากกว่าที่แยกได้จากยอด และผลอ่อนในจำนวนตัวอย่างที่เท่ากันเนื่องจากสภาพบนดอกมีอาหารสะสมประเภทน้ำตาลน้อยอยู่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์

การทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ผิวพืชที่แยกได้จากผิวหน้าอาหาร NGA ในการยับยั้งการเจริญของรา *C. gloeosporioides* บนอาหาร PDA พบมีการยับยั้งการเจริญของราแตกต่างกัน 2 รูปแบบ คือการที่จุลินทรีย์มีประสิทธิภาพสูงในการใช้อาหารที่มีอยู่และผลิตสาร secondary metabolite หรือปฏิชีวนสาร (ศิริลักษณ์, 2545; สุพจน์, 2545) ทำให้เกิดบริเวณยับยั้ง (inhibition

zone) ระหว่างโคโลนีของราสาเหตุโรคและจุลินทรีย์ทดสอบซึ่งพบได้มากกว่าการที่จุลินทรีย์เจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วจนสามารถขยายขนาดโคโลนีได้กว้างจำกัดการเจริญของโคโลนีของราสาเหตุโรค

การปลูกรา *C. gloeosporioides* โดยไม่มีการทำแผลบนผิวพืชทดสอบในการทดลองครั้งนี้เป็นการเลียนแบบการเกิดโรคแอนแทรคโนสตามสภาพธรรมชาติเนื่องจากการตรวจเอกสารที่ผ่านมาทำให้ทราบว่ารา *C. gloeosporioides* มีการพัฒนาโครงสร้างสำหรับเข้าทำลายพืชได้โดยตรงเมื่อมีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมและเข้าพักตัวอยู่ในผิวพืชเมื่อผลไม่เกิดการสุกแก่จึงเข้าทำลายเซลล์พืชทำความเสียหายโดยไม่ต้องอาศัยแผลที่เกิดขึ้นบนผิวพืชเป็นช่องทางการเข้าทำลาย (Jeffries *et al.*, 1990) ในการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเข้าทำลายเนื้อเยื่อพืชที่เกิดจากรา *C. gloeosporioides* โดยใช้ใบมะม่วงเป็นพืชทดสอบ เป็นวิธีเบื้องต้นเพื่อคัดเลือกลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนพืช เนื่องจากสภาพแวดล้อมบนผิวพืชมีความแตกต่างจากบนอาหารเลี้ยงเชื้อในปัจจัยต่างๆ เช่น อุณหภูมิ ชนิดและปริมาณสารอาหาร และปฏิกิริยาของพืชต่อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์และราสาเหตุโรคที่มีอิทธิพลต่อการเจริญเพิ่มปริมาณและดำเนินกิจกรรมของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (วรารักษ์, 2545)

นำจุลินทรีย์ที่แยกได้จากอาหาร GYPA ร่วมกับ enrichment technique จำนวน 230 ไอโซเลต ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการงอกของสปอร์รา เพื่อเปิดโอกาสสำหรับจุลินทรีย์ที่มีกลไกการยับยั้งแตกต่างจากการสร้าง secondary metabolite หรือปฏิชีวนสารซึ่งพบในจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ส่วนใหญ่ที่คัดเลือกโดยวิธี dual culture หลังจากนั้นจึงนำจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้มาทดสอบเพื่อคัดเลือกลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพการยับยั้งการเข้าทำลายโดยรา *C. gloeosporioides* โดยใช้การสร้าง fruiting body ของราเป็นดัชนี เช่นเดียวกับจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้จากอาหาร NGA โดยกลไกการควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยวที่น่าสนใจและสามารถประสบความสำเร็จได้ คือการเจริญครอบครองพื้นที่ผิวพืชและสามารถแข่งขันใช้สารอาหารได้รวดเร็ว โดยมีหลายรายงานที่ประสบความสำเร็จในการควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยวโดยกล่าวถึงการใช้อยู่ส่ที่สามารถเพิ่มปริมาณและแข่งขันใช้สารอาหารบนผิวผลไม้ ตลอดจนการเข้าเป็นปรสิตกับราสาเหตุโรคโดยตรง (Jeffries and Kooman, 1992; Arras *et al.*, 1998; Ipolito *et al.*, 2000; Saligarias *et al.*, 2002) จากการศึกษาประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเข้าทำลายเนื้อเยื่อพืชโดยใช้ผลชมพูเป็นพืชทดสอบ ด้วยวิธีการปลูกราสาเหตุโรคแบบไม่ทำแผล พบว่าไอโซเลตที่ยับยั้งการสร้าง fruiting body บน leaf disk ได้ดีที่สุดไม่สามารถควบคุมการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนผลชมพูได้ อาจเนื่องจาก

ไม่สามารถปรับตัวดำรงชีวิตหรือดำเนินกิจกรรมการเป็นปฏิปักษ์ต่อราสาเหตุโรคในสภาพแวดล้อมบนผิวพืชได้

การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรีย 3 ไอโซเลต ที่คัดเลือกได้ คือ 3103 3107 และ 3503 และยีสต์ 1 ไอโซเลต คือ D4113 ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วงน้ำดอกไม้ที่เกิดจาก artificial inoculation โดยการหยดสปอร์แขวนลอยของรา *C. gloeosporioides* และเซลล์แขวนลอยของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ลงบนผิวมะม่วงโดยไม่ได้ทำแผล ในการทดลองได้ลำดับการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ก่อน หลัง และพร้อมกับการเข้าถึงเนื้อเยื่อพืชของราสาเหตุโรคเพื่อศึกษาประสิทธิภาพการป้องกัน และควบคุมการระบาดของโรค ผลการทดลองพบว่า ยีสต์ D4113 และแบคทีเรีย 3107 สามารถลดการเกิดโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพเมื่อทำการควบคุมก่อนหรือพร้อมกับการปลูกgra ในขณะที่ใช้แบคทีเรีย 3503 พบการเกิดโรคสูงที่สุดทั้งที่เป็นแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการยับยั้งการการเข้าทำลายใบมะม่วงโดยรา (ตารางที่ 5)

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลต 3103 3107 และยีสต์ปฏิปักษ์ D4113 กับการใช้สารเคมี azoxystrobin ความเข้มข้น 500 ppm ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วงโชคอนันต์ พบว่าสารเคมี azoxystrobin แสดงประสิทธิภาพต่อต้านการเข้าทำลายพืชของรา *C. gloeosporioides* ได้ดี แต่มีข้อควรระวังในการใช้เนื่องจากเป็นสารเคมีประเภทดูดซึม (systemic fungicide) จึงมีโอกาสสูงที่จะเกิดกลายพันธุ์ด้านทานต่อสารเคมีได้ เช่นเดียวกับที่พบในสารเคมีกลุ่ม thiabendazole (Farungsang and Farungsang, 1992) และพบว่า ยีสต์ D4113 มีประสิทธิภาพควบคุมโรคบนผลไม้ได้ดีกว่าแบคทีเรีย 3103 และ 3107 อาจเนื่องมาจากคุณสมบัติในการปรับตัวครอบครองพื้นที่และใช้สารอาหารที่มีอยู่จำกัดบริเวณผิวพืชที่แตกต่างกันของจุลินทรีย์แต่ละชนิดรวมถึงปัจจัยด้านต่างๆ เช่น ช่วงอายุที่เหมาะสมต่อการแสดงประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ อุณหภูมิ และสภาพบรรยากาศ เป็นต้น (ทศวรรณ, 2547)

ผลการทดลองที่สอดคล้องกันในการทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วงน้ำดอกไม้และโชคอนันต์ แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพในการต่อต้านการเข้าทำลายผลไม้ของยีสต์ที่สูงกว่าแบคทีเรีย แม้ว่าบางครั้งจะมีประสิทธิภาพต่ำกว่าในขั้นตอนการคัดเลือกที่นิยมใช้กันในปัจจุบัน (นววรรณ และคณะ, 2537) และแนวทางในการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ให้ได้ประสิทธิภาพสูงที่สุดคือการใช้ป้องกันก่อนที่จะมีการเข้าทำลายพืชของราสาเหตุโรค โดยการที่จุลินทรีย์ปฏิปักษ์สามารถครอบครองพื้นที่ผิวพืชได้ก่อนที่สปอร์ราจะ

เข้าถึงผิวพืชและงอก germ tube ทำให้จุลินทรีย์ปฏิบัติมีโอกาสนำสารอาหารที่มีอยู่บริเวณผิวพืชและเจริญเติบโตเพิ่มปริมาณหรือสร้างสารพิษตามลักษณะกลไกการออกฤทธิ์จนสามารถยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคจนไม่สามารถเข้าทำลายพืชได้ (Wisniewski *et al.*, 1991; Fan and Tian, 2001)

ศึกษากลไกการยับยั้งรา *C. gloeosporioides* ของจุลินทรีย์ปฏิบัติ การใช้เซลล์แขวนลอยของแบคทีเรีย 3103 3107 และ 3503 สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์และการพัฒนาของเส้นใยของราได้ดีกว่าการใช้ culture filtrate อาจเป็นเพราะแบคทีเรียสามารถเพิ่มปริมาณได้อย่างต่อเนื่องในเซลล์แขวนลอยและยังมีกระบวนการเมตาบอลิซึม (metabolism) เกิดขึ้นทำให้มีการผลิตสาร secondary metabolites หรือปฏิชีวนสารได้เข้มข้นกว่า culture filtrate หรือเซลล์แบคทีเรียมีปฏิกิริยายับยั้งโดยตรงต่อราสาเหตุโรค สำหรับการใช้เซลล์แขวนลอยของยีสต์ D4113 สามารถลดอัตราการงอกและการพัฒนาของเส้นใยของราได้โดยไม่ทำให้เกิดอาการผิดปกติ และการใช้ culture filtrate ไม่สามารถยับยั้งการงอกและการพัฒนาเส้นใยของราได้ กลไกการยับยั้งราสาเหตุโรคของยีสต์ D4113 จึงน่าจะเป็นไปโดยการแข่งขันใช้สารอาหารและครอบครองพื้นที่ผิวพืช

ถึงแม้ว่าจากการทดลองสามารถแยกจุลินทรีย์จากช่อดอกได้จำนวนมากซึ่งมาจากความอุดมสมบูรณ์ของสารอาหารจากช่อดอก (Wisniewski *et al.*, 1991) แต่จุลินทรีย์ปฏิบัติที่คัดเลือกได้ทั้ง 4 ไอโซเลต มีแหล่งที่มาจากส่วนยอดอ่อนของมะม่วง จากส่วนมะม่วง อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมา (ไอโซเลต 3103 3107 และ 3503) และ อ. เมือง จ. ราชบุรี (ไอโซเลต D4113) โดยทั้ง 2 แห่ง เป็นสภาพสวนธรรมชาติที่ไม่มีการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืช จึงยังคงมีความหลากหลายของชนิดจุลินทรีย์ และนับเป็นแหล่งเก็บตัวอย่างสำหรับการคัดเลือกจุลินทรีย์ปฏิบัติที่ดี

การจำแนกชนิดของแบคทีเรียเบื้องต้น พบว่าทั้ง 3 ไอโซเลต คือ 3103 3107 และ 3503 เป็นแบคทีเรียแกรมบวกโดยติดสีม่วงของ crystal violet เมื่อทำการจำแนกชนิดของไอโซเลต 3103 3107 และ 3503 ด้วยการศึกษาคูณสมบัติทางชีวเคมี พบว่าทุกไอโซเลตคือแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* สำหรับไอโซเลต D4113 จำแนกด้วยระบบ Biolog Microlog System พบว่าเป็นยีสต์ *Cryptococcus humicolus*

รายงานจำนวนมากกล่าวถึง *Bacillus* spp. การควบคุมโรคโดยชีววิธีโดยส่วนใหญ่มีกลไกการยับยั้งโรคโดยการผลิตปฏิชีวนสารซึ่งส่วนใหญ่เป็นสารประกอบโพลีเปปไทด์ สามารถต่อต้านแบคทีเรียและรา โดยผลิตจาก *B. subtilis* และแบคทีเรียในสกุลใกล้เคียง (Pusey, 1989) รายงานการใช้ *Bacillus* ควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยวโดย Korsten และคณะ (1993) ถึงการใช้ *B. stearatermorphilus*, *B. megaterium* และ *B. lichenformis* ยับยั้งราสาเหตุโรคผลเน่าในผลไม้หลายชนิด ได้แก่ *Phomopsis* sp., *Pestalotia* sp., *Alternaria alternata* และ *Penicillium* sp.

รายงานการใช้ยีสต์ *Cryptococcus* spp. ควบคุมโรคพืชหลังการเก็บเกี่ยวโดย Roberts (1990) ถึงการใช้เซลล์แขวนลอยของ *C. laurentii* ในการควบคุมโรคผลเน่าที่เกิดจากรา *Botrytis cinera* บนผลแอปเปิล โดยพบว่าการใช้ culture filtrate ของยีสต์ ไม่สามารถยับยั้งการเกิดโรคได้ Fan and Tian (2001) รายงานการใช้ *Cryptococcus albidus* ป้องกันโรคผลเน่าที่เกิดจากรา *B. cinera* และ *Penicillium expansum* บนผลแอปเปิลได้อย่างมีประสิทธิภาพ

จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่คัดเลือกได้จากการทดลองครั้งนี้สามารถนำมาศึกษาเพิ่มเติมเพื่อเป็นแนวทางในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสอย่างมีประสิทธิภาพ โดยยีสต์ *C. humicolus* ซึ่งแสดงประสิทธิภาพควบคุมการเกิดโรคบนผลมะม่วงได้ดี ควรศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้ร่วมกับการควบคุมปัจจัยทางกายภาพ ในการมีชีวิตรอดของยีสต์ภายใต้สภาพอุณหภูมิต่ำ การลดปริมาณออกซิเจนและเพิ่มคาร์บอนไดออกไซด์ในระหว่างการเก็บรักษาผลไม้ก่อนการจำหน่าย และสำหรับแบคทีเรีย *B. megaterium* ซึ่งแสดงประสิทธิภาพยับยั้งการเข้าทำลายของราบนใบมะม่วงได้ดีควรศึกษาประสิทธิภาพการใช้ ในสภาพแปลงปลูกเพื่อลดปริมาณการเข้าทำลายแผ่ของรา *C. gloeosporioides* ในผลผลิตที่อยู่ในแปลง

สรุป

รวบรวมจุลินทรีย์ผิวพืชจากส่วนช่อดอก ยอด และผลอ่อน จากแหล่งปลูกผลไม้เขตร้อนในเขตภาคกลางและ จ. นครราชสีมา ได้แก่ มะม่วง ลำไย ชมพู กระท้อน เงาะ และองุ่น ได้ทั้งหมด 347 ไอโซเลต แบ่งเป็นแยกได้จากอาหาร NGA จำนวน 117 ไอโซเลตเป็นแบคทีเรียทั้งหมด และแยกได้โดยใช้ enrichment technique ร่วมกับอาหาร GYPA จำนวน 230 ไอโซเลต เป็นยีสต์ 176 ไอโซเลต และเป็นแบคทีเรีย 54 ไอโซเลต

การคัดเลือกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ในสภาพห้องปฏิบัติการพบว่า จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่แยกได้จากอาหาร NGA จำนวน 85 ไอโซเลต สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใย เมื่อนำมาทดสอบการยับยั้งการสร้าง fruiting body ของราพบว่ามีแบคทีเรีย 12 ไอโซเลต ทำให้ราไม่สามารถสร้าง fruiting body ได้ และในจำนวนนี้มี 3 ไอโซเลต คือ 3103 3107 และ 3503 ที่สามารถยับยั้งการเข้าทำลายของเนื้อเยื่อพืชของราโดยใช้ใบมะม่วงเป็นพืชทดสอบ ขณะที่การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่แยกได้จากอาหาร GYPA พบว่ามีจำนวน 54 ไอโซเลต สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ราได้ดี โดยแบ่งเป็นแบคทีเรีย 25 ไอโซเลตและยีสต์ 30 ไอโซเลต เมื่อนำมาทดสอบการยับยั้งการสร้าง fruiting body และทดสอบการค้ำกันเนื้อเยื่อพืชโดยใช้ผลชมพูเป็นพืชทดสอบสามารถคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการเป็นปฏิปักษ์ต่อรา *C. gloeosporioides* ได้ 1 ไอโซเลตคือยีสต์ D4113

การทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ 4 ไอโซเลต ได้แก่ 3103 307 3503 และ D4113 ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วงน้ำดอกไม้ โดยวิธีการปลูกเชื้อสาเหตุโรคแบบไม่ทำแผลพบว่ายีสต์ D4113 และแบคทีเรีย 3107 สามารถควบคุมโรคได้ดี เมื่อใช้จุลินทรีย์ก่อนและพร้อมการปลูกราสาเหตุโรคจะมีประสิทธิภาพควบคุมโรคดีกว่าการใช้จุลินทรีย์หลังการปลูกรา จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ 3 ไอโซเลต ได้แก่ 3103 3107 และ D4113 แสดงประสิทธิภาพการควบคุมโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วงโชคอนันต์แต่ไม่เทียบเท่ากับการใช้สารเคมี azoxystrobin ความเข้มข้น 500 ppm โดยยีสต์ D4113 สามารถยับยั้งการเกิดโรคได้ดีกว่าแบคทีเรีย การควบคุมโรคจะมีประสิทธิภาพดีเมื่อทำการควบคุมก่อนและพร้อมการปลูกราสาเหตุโรคและประสิทธิภาพจะลดลงหากทำการควบคุมภายหลังจากการปลูกรา

แบคทีเรียปฏิชีวนะไอโซเลต 3103 3107 และ 3503 มีกลไกการยับยั้งอัตราการงอกและการพัฒนาของเส้นใยของรา *C. gloeosporioides* โดยการผลิต secondary metabolite หรือปฏิชีวนะทำให้ germ tube และเส้นใยของราโป่งพองและเจริญผิดปกติ และพบว่าการใช้เซลล์แขวนลอยมีประสิทธิภาพมากกว่าการใช้ culture filtrate สำหรับยีสต์ปฏิชีวนะไอโซเลต D4113 สามารถยับยั้งการงอกและลดความยาวของเส้นใยของราโดยไม่ทำให้เส้นใยเจริญผิดปกติ และการใช้ culture filtrate ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของราได้

การจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ปฏิชีวนะไอโซเลต 3103 3107 และ 3503 ด้วยการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข พบว่าทุกไอโซเลตคือแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* สำหรับไอโซเลต D4113 จำแนกด้วยระบบ Biolog Microlog System จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย พบว่าเป็นยีสต์ *Cryptococcus humicolus*

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- จริงแท้ ศิริพานิช. 2546. สรีรวิทยาและเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยวผักและผลไม้. พิมพ์ครั้งที่ 5. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 396 น.
- เฉลิมชัย แก้ววรชาติ. 2539. การปลูกมะม่วง. อักษรสยามการพิมพ์, กรุงเทพฯ. 88 น.
- นิพนธ์ สารทนนท์. 2542. โรคมะม่วง. เอกสารเผยแพร่ทางวิชาการหลักสูตร “หมอฟืช-ไม้ผล” ฉบับที่ 6. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 44 น.
- นิพนธ์ วิสารทนนท์, สกลวัฒน์ โอศิริ และระจิตร์ จุฑากรณ์. 2538. ผลของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* และความรุนแรงของโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วงน้ำดอกไม้, น. 44-51. ใน เอกสารประชุมวิชาการ ครั้งที่ 34. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- ทศพร ทองเที่ยง. 2537. โรคผลเน่าหลังการเก็บเกี่ยวของกล้วยหอมที่เกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum musae* (Berk & Curt) Arx. และการควบคุมโรคเพื่อการส่งออก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- ทัศวรรณ ศรีวะอุไร. 2547. การคัดเลือกจุลินทรีย์ผิวพืชเพื่อการควบคุมรา *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) สาเหตุโรคผลเน่าหลังการเก็บเกี่ยวของเงาะพันธุ์โรงเรียน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- นวลวรรณ ฟารุ่งแสง, อุดม ฟารุ่งแสง, สมศิริ แสงโชติ, จริงแท้ ศิริพานิช และ กนิษฐา สังคะหะ. 2537. การคัดเลือกจุลินทรีย์แอนตาโกนิสต์เพื่อการควบคุมโรคผลเน่าของเงาะโดยชีววิธี. รายงานผลการวิจัยประจำปี 2537. สถาบันพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- สุสดี พันธุ์ประสิทธิ์. 2529. โรคข้าวผลเน่าของผลมะม่วงภายหลังการเก็บเกี่ยวที่เกิดจากเชื้อรา *Dothiorella dominicana* Pet. Et. Cif. และการควบคุม. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

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

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

วัลภา ชีรภาวะ และดารา พวงสุวรรณ. 2523. โรคภายหลังการเก็บเกี่ยวของมะม่วง, น. 67-72.
ใน รวมเรื่องเกี่ยวกับมะม่วง. ชมรมผู้พัฒนามะม่วงแห่งประเทศไทย, กรุงเทพฯ.

วิจิตร วังใน. 2523. การปฏิบัติต่อผลมะม่วงหลังการเก็บเกี่ยว, น. 77. ใน รวมเรื่องเกี่ยวกับ
มะม่วง. ชมรมผู้พัฒนามะม่วงแห่งประเทศไทย, กรุงเทพฯ.

ศิริลักษณ์ เลียงประยูร. การควบคุมชีวภาพของโรคส้มหลังการเก็บเกี่ยว. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท.
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สุพจน์ กาเข้ม. 2545. การจำแนกชนิดและคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะที่แยกได้จากผิวใบ
และดินบริเวณรากกล้วยเหลืองที่สามารถควบคุมใบจุดของกล้วยเหลือง. วิทยานิพนธ์ปริญญา
โท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2543. ข้อมูลด้านการผลิตและการตลาดสินค้าเกษตรที่สำคัญ.
กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

อรุณี พวงมี. 2533. การควบคุมโรคผลเน่าของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ก่อนและหลังเก็บเกี่ยว.
วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อังสุมา ชยสมบัติ. 2530. โรคหลังการเก็บเกี่ยวของมะม่วงที่เกิดจากเชื้อรา *Colletotrichm*
gloeosporioides. (Penz.) Sacc. และการควบคุม. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท.
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

- Andrews, J. H. 1992. Biological control in the phyllosphere. **Annual Review of Phytopathology** 30: 603-635.
- Arras, G., P. Sanna, V. Astone and S. Arru. 1998. Effect of CaCl_2 on the inhibitory activity of *Rhodotorula glutinis* against *Penicillium italicum* on orange fruits, pp. 67-70. In Atti del workshop nazionale "Post raccolta or to floro frutticoli ", 1-2 ottobre 1998. Ascea Marina, Salerno, Italy. **Italus Hortus** No. 5.
- Bailey, J. A., J. R. O' Connell, R. J. Pring and C. Nash. 1992. Infection strategies of *Colletotrichum* Species, pp. 88-120. In Bailey, J. A. and M. J. Jeger, eds. **Colletotrichum: Biology, Pathology and Control**. CAB international, Wallingford.
- Baker, K. F. and R. J. Cook. 1974. **Biological control of plant pathogens**. Freeman, San Francisco. 433 p.
- Barkil-Gilan, R. 2001. **Postharvest Disease of Fruits and Vegetables: Development and Control**. Elsevier science B.V., Amsterdam. 418 p.
- Barnett, J. L. and B. B. Hunter. 1987. **Illustrated Genera of Imperfect Fungi**. 4th ed. Macmillan Publishing Co., New York. 218 p.
- Beech, F. W. and R. R. Devenport. 1971. Isolation, purification and maintenance of yeasts. pp. 153-182. In Booth, C. Ed. **Methods in Microbiology**. Academic Press, London.
- Blakeman, J. P., Fokkema, N. J. 1982. Potential for biological control of plant diseases on the phylloplane. **Annual Review of Phytopathology** 20: 167-92.
- Brown, G. E. and D. J. Dezman. 1990. Uptake of imazalil by citrus fruit after postharvest application and the effect of residue distribution on sporulation of *Penicillium digitatum*. **Plant Disease** 67: 954-957.

- Coates, L. M., R. D. Davis, A. W. Cooke., K. T. Cannon and J. R. Dean. 1999. Biological control of anthracnose in tropical Fruit. *In* Proceedings of an International Workshop on Disease Control and Storage life Extension in Fruit, 22-23 May 1997. Chiang Mai, Thailand. **ACIAR Proceedings**. No 81: 101-107.
- Cook, D. W. M. 2002. Effect of formulated yeast in suppressing the liberation of *Botrytis cinerea* conidia. **Plant Disease** 86: 1265-1270.
- Cooksey, D. A. and L. W. Moore. 1982. Biological control of crown gall with agrocin mutant of *Agrobacterium radiater*. **Phytopathology** 8: 267.
- Dodd, J. C., A. Estrada and M. J. Jeger. 1992. Epidemiology of *Colletotrichum gloeosporioides* in the Tropics. pp. 308-325. *In* Bailey, J. A. and M. J. Jeger eds. **Colletotrichum: Biology, Pathology and Control**. CAB international, Wallingford.
- Dodd, J. C., Jeffries P. and M. J. Jeger. 1989. Management strategies to control latent infection in tropical fruit. **Aspects of Applied Biology** 20: 49-56.
- El-Ghaouth, A., C. L. Wilson and M. Wisniewski. 1998. Ultrastructural and cytochemical aspects of the biological control of *Botrytis cinerea* by *Candida saitoana* in apple fruit. **Phytopathology** 88: 282-291.
- El-Ghaouth, A., J. Smilanick, C. L. Wilson and M. Wisniewski. 2000. Improve control of apple and citrus fruit decay with a combination of *Candida saitoana* with 2-deoxy-D-glucose. **Plant Disease** 84: 249-253.
- Fan, Q. and S. Tian. 2001. Postharvest biological control of gray mold and blue mold on apple by *Cryptococcus albidus* (Saito) Skinner. **Postharvest Biological Technology** 21: 341-350.

- Farr, D., G. F. Bills, G. P. Chamuris and A. Y. Rossman. 1989. **Fungi on Plants and Plant Products in the United States**. The American Phytopathology Society, St. Paul, Minnesota. 1252 p.
- Farungsang, N., U. Farungsang and S. Sangchote. 1999. Biological control of postharvest rot (*Greeneria* sp.) in rambutan with phylloplane yeasts, pp. 113-119. *In* Proceedings of an International Workshop on Disease Control and Storage life Extension in Fruit, 22-23 May 1997. Chiang Mai, Thailand. **ACIAR Proceedings** No 81.
- Farungsang, N., U. Farungsang, S. Sangchote. and F. Chantaniyom. 1997. Leaf disk assay for effective screening of antagonistic yeast against *Greeneria* fruit rot of rambutan, pp. 345-350. *In* **Proceeding of the 35th Kasetsart University Annual Conference**. Bangkok.
- Farungsang, U. and N. Farungsang. 1992. Resistance to benomyl of *Colletotrichum* spp. causing anthracnose of rambutan and mango. **Acta Horticulturae** 321: 891- 897.
- Guetsky, R., D. Shtienberg, Y. Elad, E. Fischer and A. Dinoor. 2002. Improving biological control by combination biocontrol agents each with several mechanisms of disease suppression. **Phytopathology** 92: 976-985.
- Ippolito, A., A. El Ghaouth, C. L. Wilson and M. Wisniewski. 2000. Control of postharvest decay of apple fruit by *Aureobasidium pullulans* and induction of defense responses. **Postharvest Biological Technology** 19: 265-272.
- Janisiewicz, W. J. 1996. Ecological diversity, niche overlap, and coexistence of antagonists used in developing mixtures for biological control of postharvest disease of apples. **Phytopathology** 86: 473-479.
- Janisiewicz, W. J. and L. Korsten. 2002. Biological control of postharvest disease of fruits. **Annual Review of Phytopathology** 40: 411-441.

- Jeffries, P., J. C. Dodd, M. J. Jeger and R. A. Plumbley. 1990. The Biology and control of *Colletotrichum* species on tropical fruit crops. **Plant Pathology** 39:343-366.
- Jeffries, P. and I. Kooman, 1992. Strategies and prospects for biological control of diseases caused by *Colletotrichum*. pp. 337-357. In Bailey, J. A. and M. J. Jeger eds. **Colletotrichum: Biology, Pathology and Control**. CAB international, Wallingford.
- Kuo, K. C. 1999. Germination and appressorium formation in *Colletotrichum gloeosporioides*. **Proc. Natl. Sci. ROC(B)**. 23: 126-132.
- Mendoza, D. B., Er. B. Pantastico and F. B. Javier. 1973. Physio-chemical changes during growth and maturation of “Carabao” mangoes. **Anim. Husb. Agric. J.** 11: 33-36.
- Miller, W. R., Spalding, D. H. and Hale P.W. 1986. Film wrapping mangoes at advancing stage of postharvest ripening. **Tropical Science** 26:9-17.
- Nadel, M. S., H. Michaely, G. Zaeburman and I. Chet. 1985. Physiological change occurring in picked climacteric fruits infected with different pathogenic fungi. **Phytopathology** 75: 271-284.
- Nicholson, R. L., L.G. Butler and T. N. Asquith. 1986. Glycoproteins from *Colletotrichum graminicola* that bind phenol: implication for survival and virulence of phytopathogenic fungi. **Phytopathology** 76: 1315-1318.
- Perfect, S. E., H. B Hughes, O’ Connell and J. R. Green. 1999. *Colletotrichum*: a model genus for studies on pathology and plant-fungal interaction. **Fungal Genetics and Biology** 27: 186-198.

- Prior, C. , F. Elango and A. Whitwell. 1992. Chemical control of *Colletotrichum* infection in Mangoes. pp. 326-336. In Bailey, J. A. and M. J. Jeger eds. ***Colletotrichum: Biology, Pathology and Control***. CAB international, Wallingford.
- Pusey, P. L. and C. L. Wilson. 1984. Postharvest biological control of stone fruit brown rot by *Bacillus subtilis*. **Plant Disease** 68: 753-756.
- Roberts, R. G. 1990. Postharvest biological control of gray mold of apple by *Cryptococcus lauentii*. **Phytopathology** 80: 526-530.
- Saligkarias, I. D., F. T. Gravanis and H. A. S. Epton. 2002. Biological control of *Botrytis cinerea* on tomato plants by the use of epiphytic yeasts *Candida guilliermondii* strain 101 and US 7 and *Candida oleophila* strain I-182: I. in vivo studies. **Biological control** 25: 143-150.
- Sneath, P. H. A. 1986. Endospore-forming gram-positive rods and cocci. pp. 1104-1131. In P. H. A. Sneath. (ed). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 2**.
- Son-Quang, D. 2002. **Post-harvest Loss of Mango due to Anthracnose and Its Infection Biology and Resistance of Mango to the Disease**. M.S. Thesis, Kasetsart University.
- Spalding, D. H. 1982. Resistance of mango pathogens to fungicides used to control post-harvest disease. **Plant Disease** 66:1185-1186.
- Sutton, B. C. 1980. **The Coelomycetes Imperfecti with Pycnidia Acervuli and Stromata**. Commonwealth Mycological Institute, Kew. 696 p.
- Tandon, J. W. and B.B. Singh. 1968. Control of mango anthracnose (*C. gloeosporioides*) by fungicides. **Indian Phytopathology** 21: 212-216.

- Tian, S. P., Q. Fan, Y. Xu and A. I. Jiang. 2002. Effects of calcium on biocontrol activity of yeast antagonists against the postharvest fungal pathogen *Rhizopus stolonifer*. **Plant Pathology** 51: 352-358.
- Uhm, K. H., I. P. Ahn, S. Kim and Y. H. Lee. 2003. Calcium/calmodulin-dependent signaling for penetration development in *Colletotrichum gloeosporioides*. **Phytopathology** 93: 82-87.
- Waller, J. M. 1992. *Colletotrichum* disease of perennial and cash crop. pp. 167-185. Bailey, J. A. and M. J. Jeger eds. *In Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. CAB international, Wallingford.
- Wilson, C. L. and M. E. Wisniewski. 1989. Biological control of postharvest disease of fruits and vegetables: an emerging technology. **Annual Review of Phytopathology** 27: 425-441.
- Wilson, C. L. and P. L. Pusey. 1985. Potential for biological control of postharvest plant disease. **Plant Disease** 69: 375-378.
- Wisniewski, M., C. Biles, S. Droby, R. McLaughlin, C. Wilson and E. Chalutz. 1991. Mode of action of the postharvest biocontrol yeast, *Pichia guilliermondii*. I. Characterization of attachment to *Botrytis cinerea*. **Physiological Molecular and Plant Pathology** 99: 245-258.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

สูตรอาหารเหล่านี้ผสมกับน้ำกลั่น 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1. Potato Dextrose Agar (PDA)

มันฝรั่ง	200	กรัม
Dextrose	20	กรัม
วุ้น	12	กรัม

2. Potato Carrot Agar (PCA)

มันฝรั่ง	20	กรัม
แครอท	20	กรัม
วุ้น	12	กรัม

3. Glucose Yeast Extract Peptone Broth (GYPB) (Beech *et al.*, 1971)

Glucose	10	กรัม
Yeast extract	0.5	กรัม
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0.5	กรัม
KH ₂ PO ₄	0.5	กรัม
Peptone	2.0	กรัม

4. Glucose Yeast Extract Peptone Agar (GYPA) (Beech *et al.*, 1971)

Glucose Yeast Extract Peptone Broth (GYPB)	1,000	มิลลิลิตร
วุ้น	12	กรัม

5. Nutrient Glucose Broth (NGB)

Beef extract	3.0	กรัม
Bacto peptone	5.0	กรัม
Glucose	2.5	กรัม

6. Nutrient Glucose Agar (NGA)

Nutrient Glucose Broth	1,000	มิลลิลิตร
วุ้น	12	กรัม

7. Nutrient Broth (NB)

Beef extract	3	กรัม
Bacto-peptone	5	กรัม

8. Nutrient Agar (NA)

Nutrient Broth	1,000	มิลลิลิตร
วุ้น	12	กรัม

9. 1% Peptone

Peptone	10	กรัม
---------	----	------

10. Motility Test Medium

Bacto-tryptone	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
วุ้น	5	กรัม

เป็นอาหารสำหรับตรวจการเคลื่อนที่ของแบคทีเรียโดยการ stab เชื้อลงในอาหาร บ่มเชื้อเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง สังเกตว่าเชื้อแบคทีเรียสามารถเจริญออกนอกบริเวณปลูกเชื้อแสดงว่าสามารถเคลื่อนที่ได้

11. Starch Agar (Starch Hydrolysis)

Bacto-tryptone	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Soluble starch	10	กรัม
วุ้น	12	กรัม

ทดสอบโดยการstreak แบคทีเรียบนผิวหน้าอาหารบ่มเชื้อ 3-5 วัน หยดน้ำยาไอโอดีนให้ทั่วจานเลี้ยงเชื้อ ถ้าเกิดบริเวณใสรอบๆ โคโลนี แสดงว่าแบคทีเรานั้นสามารถสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งได้

12. สูตรอาหารสำหรับทดสอบ Oxygen Relationship

เตรียมอาหาร NGA ในหลอดทดสอบปริมาตรหลอดละ 5 มิลลิลิตร หนึ่งมาเชื้อที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ปล่อยให้อาหารเย็นโดยไม่ต้องเอียง จากนั้น stab แบคทีเรียที่อายุ 24 ชั่วโมงในอาหารสังเกตการเจริญและตำแหน่งการเจริญของแบคทีเรีย

13. การศึกษาการผลิตเอนไซม์ Catalase

เลี้ยงแบคทีเรียบนอาหาร NGA บ่มเชื้อ 48 ชั่วโมงหยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ (3% H_2O_2) ลงบนโคโลนี ถ้าเกิดฟองอากาศแสดงว่าแบคทีเรียสามารถสร้างเอนไซม์ Catalase ได้

14. Hydrolysis of Gelatin (Gelatin Liquefaction)

Beef extract	10	กรัม
Bacto-peptone	5	กรัม
Glucose	2.5	กรัม
Gelatin	12	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำอุ่น แบ่งใส่หลอดละ 10 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารดังกล่าวเป็นเวลา 48 ชั่วโมงในสภาพอุณหภูมิห้อง แล้วย้ายหลอดเลี้ยงเชื้อมาแช่ในตู้เย็น อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส สังเกตการแข็งตัวของเจลาติน ถ้าแบคทีเรียสามารถผลิตเอนไซม์ gelatinase ได้ อาหารทดสอบจะไม่แข็งตัว

15. Levan Formation

เตรียมอาหาร Nutrient Agar (NA) แล้วเติมน้ำตาล sucrose ในอัตราส่วน 5 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ แล้วเทใส่จานเลี้ยงเชื้อ ทิ้งให้ผิวหน้าอาหารแห้ง cross streak แบคทีเรียให้ได้โคโลนีเดี่ยว บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องนาน 3-5 วัน สังเกตลักษณะโคโลนี ถ้ามีลักษณะนูนเยิ้มมากกว่าปกติแสดงว่าผลการทดสอบเป็นบวก

16. Salt tolerance Medium Test

เตรียมอาหาร NB ผสม NaCl ในอัตราส่วนต่างๆ ให้ได้ความเข้มข้นตามที่ต้องการ (5 7 และ 10 เปอร์เซ็นต์) แบ่งใส่หลอดทดสอบหลอดละ 5 มิลลิลิตร นิ่งมาเชื้อ แล้วนำมาทดสอบความสามารถในการเจริญของแบคทีเรีย

ภาคผนวก ข

วิธีการและการเตรียมสารเคมีสำหรับการย้อมสี

1. วิธีการและการเตรียมสารเคมีสำหรับการย้อมสีแกรม

1.1 การเตรียมสารเคมีสำหรับการย้อมสีแกรม

1.1.1 Ammonium oxalate crystal violet

Crystal violet	2	กรัม
95% ethanol	20	มิลลิลิตร

ละลาย crystal violet ใน 95% ethanol ปริมาตร 20 มิลลิลิตร แล้วเจือจางใน 1% ammonium oxalate ปริมาตร 80 มิลลิลิตร

1.1.2 Gram's iodine

Crystal iodine	1	กรัม
Potassium iodine	2	กรัม
น้ำกลั่น	300	มิลลิลิตร

ละลาย crystal iodine ในสารละลาย potassium iodine ปริมาตร 300 มิลลิลิตร จนเป็นเนื้อเดียวกัน จะได้สารละลายสีน้ำตาลเข้ม เก็บไว้ในขวดสีชาเพื่อป้องกันแสง หากสารละลายเก่าจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองไม่ควรนำมาใช้ทดสอบ

1.1.3 Safranin water solution

Safranin	2.5	กรัม
95% ethanol	100	มิลลิลิตร

น้ำกลั่น

100

มิลลิลิตร

ละลาย safranin ใน 95% ethanol ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วเจือจางในน้ำกลั่น ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

1.2 วิธีการย้อมสีแกรม

smear แบคทีเรียที่มีอายุ 24-48 ชั่วโมง บนกระจกสไลด์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปล่อยให้แห้ง ตรึงเซลล์แบคทีเรียโดยการลนผ่านเปลวไฟไปมา 2-3 ครั้ง หยด crystal violet ให้ทั่วรอย smear นาน 1 นาที ล้างด้วยน้ำ หยดแกรมไอโอดีนให้ทั่วรอยนาน 1 นาที ล้างด้วย 95% ethanol นาน 15 วินาที ล้างน้ำตามทันที ซับให้แห้ง ย้อมทับด้วย safranin-O นาน 1 นาที ล้างด้วยน้ำแล้วซับให้แห้ง นำไปตรวจดูลักษณะเซลล์และการติดสีแกรมด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า

2. วิธีการและการเตรียมสารเคมีสำหรับการย้อมเอนโดสปอร์

2.1 การเตรียมสารเคมีสำหรับการย้อมเอนโดสปอร์

2.1.1 Malachite green solution

Malachite green	5	กรัม
น้ำกลั่น	95	มิลลิลิตร

ละลาย malachite green ในน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร จนเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับ ปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่เหลือ นำสารละลายที่ผ่านกระดาษกรอง (whatman No. 1) ไปใช้

2.2 วิธีการย้อมเอนโดสปอร์

smear แบคทีเรียที่มีอายุ 24-48 ชั่วโมง บนกระจกสไลด์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปล่อยให้แห้ง ตรึงเซลล์แบคทีเรียโดยการลนผ่านเปลวไฟไปมา 2-3 ครั้ง หยด malachite green ให้ทั่วรอย smear อังสไลด์บนไอน้ำเดือดหรือเปลวไฟ สลับกับปล่อยให้เย็น และคอยเติมสีย้อมให้แห้ง เป็น

เวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำ แล้วย้อมทับด้วย safranin-O นาน 15 วินาที ล้างด้วยน้ำซับให้แห้ง นำไป
ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า เซลล์แบคทีเรียจะติดสีแดงของ safranin-O และ
สปอร์จะติดสีเขียวของ malachite green

ภาคผนวก ก

การจำแนกชนิดจุลินทรีย์ปฏิบัติ

1. การจำแนกชนิดแบคทีเรียโดยการทดสอบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีบางประการ

แบคทีเรียไอโซเลต 3103 3107 และ 3503 ได้รับการจำแนกชนิดโดยการทดสอบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีบางประการ จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ดังรายละเอียดในตารางผนวกที่ 1

ตารางผนวกที่ 1 คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีของแบคทีเรียไอโซเลต 3103 3107 และ 3503 เปรียบเทียบกับ *Bacillus megaterium* และ *B. subtilis*

ปฏิกิริยา	แบคทีเรีย				
	3103	3107	3503	BM ^{6/}	BS ^{7/}
ลักษณะเซลล์	ท่อนสั้น	ท่อนสั้น	ท่อนสั้น	ท่อนสั้น	ท่อนสั้น
การติดสีแกรม	+ ^{1/}	+	+	+	+
รูปร่างเอนโดสปอร์	รี	รี	รี	รี	รี
ตำแหน่งเอนโดสปอร์	C ^{2/}	C	C	C	C
การเคลื่อนที่ของเซลล์	+	+	+	+	+
การใช้ออกซิเจน	+	+	+	+	+
การสร้างเอนไซม์ catalase	+	+	+	+	+
การสร้างเอนไซม์ urease	+	+	+	d ^{4/}	ND ^{5/}
การย่อยแป้ง	+	+	+	+	+
การย่อยเจลาติน	+	+	+	+	+
การทดสอบอินโดล	- ^{3/}	-	-	-	-
การรีดิวซ์ไนเตรท	+/-	+/-	+/-	-	+
การทดสอบ Voges-Proskauer	-	-	-	-	ND
Egg-yolk lecithinase	-	-	-	-	ND
การเจริญในอาหารที่มีเกลือ 5%	+	+	+	+	+

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

ปฏิกิริยา	แบคทีเรีย ^{2/}				
	3103	3107	3503	BM ^{6/}	BS ^{7/}
การเจริญในอาหารที่มีเกลือ 7%	+	+	+	+	+
การเจริญในอาหารที่มีเกลือ 10%	+	+	+	+	+
การทดสอบการใช้คาร์บอนจากแหล่งต่างๆ					
การใช้ Citrate	+	+	+	+	+
การใช้ Propionate	+	+	+	+	+
การใช้น้ำตาล Glucose	+/-	+/-	+/-	+	+
การใช้น้ำตาล Manital	+	+	+	+	+
การใช้น้ำตาล D-xylose	+	+	+	+	+
การใช้น้ำตาล L-arabinose	-	+	+	+	ND

^{1/} + 90-100% ให้ผลเป็นบวก

^{2/} C เอนโคสปอร์อยู่บริเวณกลางเซลล์

^{3/} - 90-100% ให้ผลเป็นลบ

^{4/} d 11-89% ให้ผลเป็นบวก

^{5/} ND ไม่ได้ทดสอบ

^{6/} BM *Bacillus megaterium*

^{7/} BS *B. subtilis*

2. การจำแนกชนิดยีสต์โดยการตรวจวิเคราะห์ด้วยระบบ **Biolog Microlog System**

การจำแนกชนิดของยีสต์ไอโซเลต D4113 โดยการตรวจวิเคราะห์คุณลักษณะ ด้วยระบบ Biolog Microlog System จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ดังรายละเอียดในตารางผนวกที่ 2

ตารางผนวกที่ 2 รายละเอียดคุณลักษณะของยีสต์ไอโซเลต D4113

Characteristic	Reaction
Assimilation of	
-galactose	+ ^{1/}
-actidione	—
-N-acetyl- D- glucosamine	+
-DL-lactose	+
-L-arabinose	+
-cellobiose	+
-raffinose	+
-maltose	+
-trehalose	+
-2-keto-D-glucose	+
-β- methyl-D-glucose	+
-sorbitol	+
-D-xylose	+
-ribose	+
-glyceral	+
-rhamnose	+
-palatinose	+
-erythritol	+
-melibiose	+
-glucuronate	+
-melezitose	+
-gluconate	+

ตารางผนวกที่ 2 (ต่อ)

Characteristic	Reaction
-levulinate	+
-mannitol	+
-lactose	+
-inositol	+
-glucose	+
-sorbose	+
-glucosamine	+

^{1/} + ผลการทดสอบเป็นบวก

^{2/} – ผลการทดสอบเป็นลบ