รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การคัดเลือกจุลินทรีย์เพื่อใช้ควบคุมโรคแอนแทรกโนสในมะม่วง
Screening of Antagonistic Microbes for Anthracnose Disease in Mangoes

ณัฐวุฒิ รุ่งจินดามัย
กันสุดา แก้วโก
วนัสวีช์ ศิริภักตร์
ภาณุพงศ์ ประสพบุญ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินรายได้คณะ ประจำปีงบประมาณ 2560
คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การคัดเลือกจุลินทรีย์เพื่อใช้ควบคุมโรคแอนแทรกโนสในมะม่วง

Screening of Antagonistic Microbes for Anthracnose Disease in Mangoes

ณัฐวุฒิ รุ่งจินดามัย
กันสุดา แก้วโก
วนัสวีช์ ศิริภักตร์
ภาณุพงศ์ ประสพบุญ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินรายได้คณะ ประจำปีงบประมาณ 2560
คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เลขหมู่.....149355
เลขทะเบียน.....
วัน, เดือน, ปี 13 ก.ค. 2561

.b.....00265926.....
.i.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ การคัดเลือกจุลินทรีย์เพื่อใช้ควบคุมโรคแอนแทรกโนสในมะม่วง
แหล่งเงิน เงินรายได้คณะ
ประจำปีงบประมาณ 2560 จำนวนเงินที่ได้รับสนับสนุน 50,000 บาท
ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ ตุลาคม 2559 – กันยายน 2560
หัวหน้าโครงการ ณัฐวุฒิ รุ่งจินดามัย
ผู้ร่วมโครงการ กันสุดา แก้วโก
วนัสวีช์ ศิริภักตร์
ภาณุพงศ์ ประสพบุญ

บทคัดย่อ

คัดแยกเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรกโนสจากผลมะม่วงที่เป็นโรค และคัดแยกจุลินทรีย์ Epiphyte จากใบและผิวของผลมะม่วงพบว่าสามารถแยกเชื้อจุลินทรีย์ได้ทั้งหมด 112 ไอโซเลต แบ่งเป็นเชื้อที่แยกได้จากผิวของผลมะม่วง 62 ไอโซเลต และแยกได้จากใบ 50 ไอโซเลต ซึ่งประกอบด้วยแบคทีเรีย 93 ไอโซเลต และยีสต์ 19 ไอโซเลต เมื่อนำจุลินทรีย์ที่ได้ 112 ไอโซเลต ไปทดสอบ *in vitro* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar เพื่อวัดประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* พบว่ามีเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งเชื้อรา C. *gloeosporioides* ได้จำนวน 8 ไอโซเลต ที่มีเปอร์เซ็นการยับยั้ง 60.12-71.63% ต่อมานำไปทดสอบ *in vivo* บนมะม่วงพบว่าแบคทีเรียรหัส MB61 และ LB72 มีความสามารถยับยั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้สูง ซึ่งเมื่อนำเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวไปจัดจำแนกชนิดโดยลักษณะทางฟีโนไทป์ได้เป็นแบคทีเรีย *Bacillus* spp. จำนวน 2 ไอโซเลต

คำสำคัญ : เชื้อจุลินทรีย์ Epiphyte มะม่วง โรคแอนแทรกโนส เชื้อราก่อโรค การควบคุมทางชีววิธี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Project title Screening of Antagonistic Microbes for Anthracnose Disease in Mangoes
Researchers Nattawut Rungjindamai
Kansuda Kouwgo
Wanassawee Siriphak
Phanuphong Prasoboon

ABSTRACT

Isolation of *Colletotrichum gloeosporioides*, the cause of Anthracnose from diseased mango, and Epiphyte from leaves and surface of mango found the total microorganism 112 isolates. There are divided into 62 isolates from surface and 50 isolates from leaves. It consists of 93 isolates of bacteria and 19 isolates of yeast. When 112 isolates microorganism were taken to *in vitro* testing on Potato Dextrose Agar for evaluation their growth inhibition of *C. gloeosporioides*, it is found 8 isolates which have 60.12-71.63% high efficiency of *C. gloeosporioides* inhibition. Next, it is taken for *in vivo* testing on mango, it found MB61 and LB72 which are high capability of *C. gloeosporioides* inhibition. When these bacteria are classified of the phenotype, it is found 2 isolates *Bacillus* spp. bacteria.

Keywords : *C. gloeosporioides,* Anthracnose, Mango, Epiphyte, *Bacillus* spp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณการสนับสนุนด้านเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ ของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาสตร์ และขอขอบคุณสำหรับงบวิจัยในครั้งนี้ โดยการวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จากแหล่งทุนเงินรายได้คณะ ประจำปีงบประมาณ 2560

ณัฐวุฒิ รุ่งจินดามัย
กันสุดา แก้วโก
วนัสวีช์ ศิริภักตร์
ภาณุพงศ์ ประสพบุญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	VIII
สารบัญรูป	IX
คำย่อและสัญลักษณ์	X
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 เชื้อรา *C. gloeosporioides*	3
2.2 ลักษณะทั่วไปของเชื้อรา *C. gloeosporioides*	3
2.3 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของมะม่วง	3
2.4 โรคสำคัญที่เกิดกับมะม่วง	4
2.5 การควบคุมโรคด้วยสารเคมี	5
2.6 การควบคุมทางกายภาพ	6
2.7 การควบคุมด้วยชีววิธี	7
2.8 การควบคุมแบบผสมผสาน	8
2.9 ประโยชน์การควบคุมโดยชีววิธีต่อการเกษตร	8
2.10 การหลีกเลี่ยงปัญหาการดื้อยาของเชื้อโรคที่มีต่อสารเคมี	9
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	10
3.1 การเก็บตัวอย่าง	10
3.2 การแยกเชื้อราก่อโรค *C. gloeosporioides*	11
3.3 การพิสูจน์การก่อโรคของเชื้อราที่แยกได้จากมะม่วง	11
3.4 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ เชื้อ *C. gloeosporioides*	11
3.5 การแยกเชื้อจุลินทรีย์ Epiphyte	12
3.6 การทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรคบนอาหารเลี้ยงเชื้อ	12
3.7 การทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรคบนผลมะม่วง	13
3.8 การจัดจำแนกชนิดของจุลินทรีย์โดยลักษณะทางฟีโนไทป์ 38	
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล	14
4.1 ผลการแยกเชื้อราก่อโรค *C. gloeosporioides*	14
4.2 ผลการพิสูจน์เพื่อยืนยันเชื้อก่อโรค	14
4.3 ผลการแยกเชื้อจุลินทรีย์ Epiphyte	17

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรคบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 17
4.5 ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรคบนผลมะม่วง 24
4.6 ผลการจัดจำแนกชนิดของจุลินทรีย์โดยลักษณะทางฟีโนไทป์ 27
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 30
5.1 สรุปผลการวิจัย 30
5.2 ข้อเสนอแนะ 30
เอกสารอ้างอิง 31
ภาคผนวก 38

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1 แสดงเชื้อก่อโรคที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้	15
4.2 แสดงการพิสูจน์เพื่อยืนยันเชื้อก่อโรคที่แยกได้ทั้งหมด 9 ไอโซเลต	16
4.3 แสดงจำนวนของเชื้อจุลินทรีย์ Epiphyte ที่แยกได้จากสถานที่และตัวอย่าง	17
4.4 แสดงการคัดแยกจุลินทรีย์ Epiphyte โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อและยาปฏิชีวนะ	17
4.5 ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรคใน *in vitro* ของเชื้อจุลินทรีย์ Epiphyte ทั้งหมดจำนวน 112 ไอโซเลต	18
4.6 แสดงการแจกแจงความถี่ของช่วงเปอร์เซ็นการยับยั้งเป็นข้อมูลอันตรภาคชั้น	21
4.7 แสดงเปอร์เซ็นการยับยั้งของเชื้อ Epiphyte ที่คัดเลือกจากการทดสอบ *in vitro*	22
4.8 แสดงผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรคใน *in vivo*	25
4.9 แสดงการเปรียบเทียบการยับยั้งเชื้อก่อโรคกับตัวควบคุม	26
4.10 แสดงผลการตรวจดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีที่เจริญในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ	17
4.12 แสดงผลการทดสอบ Gram staining	28
4.11 สรุปผลการทดสอบที่ใช้จัดจำแนกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ Epiphyte โดยลักษณะทางฟีโนไทป์	28

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ

รูปภาพที่	หน้า
3.1 รูปภาพตัวอย่างจากต้นมะม่วงน้ำดอกไม้ เขตทุ่งครุ กรุงเทพมหานคร	10
3.2 รูปภาพตัวอย่างจากต้นมะม่วงน้ำดอกไม้ เขตลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร	10
3.3 แสดงผลของมะม่วงน้ำดอกไม้ที่เป็นโรค จากตลาดหัวตะเข้ เขตลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร	11
3.4 แสดงการทดสอบ *in vitro*	12
4.1 แผนภูมิแสดงเปอร์เซ็นการยับยั้งเชื้อก่อโรคในการทดสอบ *in vitro*	21

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

เกษตรกรรมมีบทบาทสำคัญต่อระบบเศรษฐกิจของประเทศไทย ทำรายได้ให้กับเกษตรกร และประชากรส่วนใหญ่ของประเทศยังมีอาชีพที่เกี่ยวกับการเกษตร เนื่องจากเกษตรกรรมมีบทบาทสำคัญแก่ประเทศและประชากรมีอัตราเพิ่มมากขึ้นทำให้มีความจำเป็นในการพัฒนาการเกษตรในรูปแบบใหม่เพื่อเพิ่มผลผลิตมากขึ้น เพื่อให้เพียงพอต่อการบริโภคในประเทศ และส่งออกไปจำหน่ายยังต่างประเทศ การใช้ปุ๋ยและสารเคมีเป็นวิธีการหนึ่งที่ช่วยเพิ่มผลผลิตให้กับเกษตรกรรมได้ และทำให้เกษตรกรมีรายได้เพิ่มมากขึ้น (สรพงศ์, 2553)

การใช้สารเคมีในการกำจัดศัตรูพืชนั้นช่วยลดการเกิดโรค มีประโยชน์ต่อการควบคุมการระบาดของโรคและแมลงศัตรูพืชได้ในระดับหนึ่ง และสามารถป้องกันควบคุมโรคได้ในเวลาอันรวดเร็ว แต่มีผลเสีย คือ สารเคมีตกค้างในผลิตผลทางการเกษตรซึ่งส่งผลต่อสุขภาพทำให้มีโอกาสเสี่ยงที่จะเป็นโรคมะเร็งได้ อาจก่อให้เกิดมลพิษทางสิ่งแวดล้อมรวมทั้งยังส่งผลต่อระบบนิเวศและผู้บริโภคอีกด้วย การใช้สารเคมีฆ่าเชื้อราเป็นเวลานานทำให้เชื้อก่อโรคหลังจากการเก็บเกี่ยวเกิดความต้านทานต่อสารเคมีที่ใช้ได้และการใช้สารเคมีอย่างต่อเนื่องเกินความจำเป็นก็ไม่เป็นที่อนุญาตอีกด้วย (Bautista-Rosales et al., 2014; Zheng et al., 2013; ธรรมศักดิ์, 2543)

มะม่วงเป็นผลไม้ที่นิยมปลูกทั่วไปในประเทศไทยเพราะเป็นผลไม้ที่นิยมทานได้ทั้งสุก ดิบ และแปรรูป (ปริญญา, 2552) ชนิดของมะม่วงที่นิยมปลูกกันมากในประเทศไทย คือ น้ำดอกไม้สีทอง อกร่อง มหาชนก ทองดำ โชคอนันต์ เขียวเสวย ฟ้าลั่น แรด เป็นต้น ประเทศไทยมีการผลิตมะม่วงส่งออกไปยังต่างประเทศ เช่น ญี่ปุ่น จีน เกาหลีใต้ สหรัฐอเมริกา สหภาพยุโรป และรัสเซีย ซึ่งเรียกได้ว่าเป็นตลาดขนาดใหญ่ในการส่งออกมะม่วงของประเทศไทย (นุชนาฏ และพีระศักดิ์, 2556)

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ ได้เลือกศึกษามะม่วงสายพันธุ์น้ำดอกไม้ เนื่องจากเป็นสายพันธุ์ ที่นิยมบริโภคอย่างแพร่หลาย และมีมูลค่าทางเศรษฐกิจสูง เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของเกษตรกรไทย แต่ยังพบปัญหาในระหว่างการเพาะปลูกและหลังเก็บเกี่ยวผลผลิตในเรื่องของโรคที่เกิดในมะม่วง อาทิ เช่น โรคราดำและช่อดอกดำ (Sooty mold) เกิดจากเชื้อรา *Meliola mangiferae Cladosporium* sp. และ *Capnodium* sp. เชื้อเหล่านี้ทำให้ใบ ช่อดอก ผล และกิ่งก้าน มีกลุ่มราสีดำปกคลุมบนผิว สามารถป้องกันโดยฉีดพ่นสารฆ่าแมลง Carbaryl โรคราแป้ง (Powdery mildew) เกิดจากเชื้อ *Oidium mangiferea* การป้องกันส่วนใหญ่จะใช้สารฆ่าราา เช่น Prochloraz Azoxystrobin และสารในกลุ่ม Tryasol เป็นต้น

จะเห็นได้ว่ามะม่วงได้รับผลกระทบจากโรคหลายชนิดทั้งที่มีสาเหตุจากจุลินทรีย์และแมลงศัตรูพืช ในการศึกษางานวิจัยครั้งนี้ได้เลือกศึกษาโรคแอนแทรกโนส ซึ่งมีสาเหตุจากเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่เกิดกับมะม่วงน้ำดอกไม้มาทำการวิจัย เพราะโรคนี้เป็นโรคที่ทำให้เกิดความเสียหายอย่างรวดเร็วในผลไม้เนื้ออ่อน และสามารถก่อโรคได้หลายระยะของการเพาะปลูก ดังนั้นจึงก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก *C. gloeosporioides* มีลักษณะเส้นใยที่มีการแตกกิ่งก้านได้ดี เส้นใยมีผนังกั้นลักษณะของโคโลนีที่เจริญบนอาหาร PDA มีสีขาวอมเทา เส้นใยฟูสร้างกลุ่ม Conidia สีส้ม ลักษณะเป็นวงทับซ้อนกัน (ปวีณา, 2552)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การควบคุมโรคหลังจากการเก็บเกี่ยวโดยชีววิธีโดยการใช้จุลินทรีย์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งต่อโรคเป็นทางเลือกหนึ่งเพื่อช่วยลดผลกระทบจากการใช้สารเคมีและสามารถใช้แทนสารเคมีได้ (Bautista-Rosales et al., 2014) ชีววิธี คือ การใช้สิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งมายับยั้งหรือควบคุมสิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่งเพื่อให้มีจำนวนลดลง และอยู่ในระดับที่ไม่สร้างความเสียหายอย่างรุนแรง ข้อดีประการสำคัญของการใช้ชีววิธี คือ มีแนวโน้มที่จะไม่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อระบบนิเวศน์และสิ่งแวดล้อม การควบคุมโรคพืชด้วยชีววิธีจึงได้รับความนิยมอย่างแพร่หลายขึ้นมาก เช่น ผักผลไม้ปลอดสารพิษ ที่สามารถขายได้ในราคาที่แพงกว่าผักผลไม้ทั่วไป (FAO, 2014) และยังได้รับการตอบรับที่ดีในหมู่ผู้บริโภคที่รับประทานอาหารชีวจิต

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานวิจัย

1. เพื่อคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ Epiphyte จากตัวอย่างใบและผลของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้
2. เพื่อคัดแยกและทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่เป็นสาเหตุของโรคแอนแทรคโนสในมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้
3. เพื่อทดสอบฤทธิ์ยังยั้งของเชื้อจุลินทรีย์ Epiphyte ที่มีต่อเชื้อรา *C. gloeosporioides*
4. ทำการจัดจำแนกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ Epiphyte ที่มีฤทธิ์ยับยั้งได้ดีที่สุดโดยลักษณะทางฟีโนไทป์

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1. นำตัวอย่างมะม่วงน้ำดอกไม้ที่มีลักษณะเป็นโรคแอนแทรคโนส มาแยกเชื้อราก่อโรค *C. gloeosporioides* และนำเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่แยกได้มาศึกษาลักษณะทาง สัณฐานวิทยา และยืนยันการก่อโรคบนผลมะม่วง
2. เก็บตัวอย่างจากใบและผิวผลมะม่วงน้ำดอกไม้ มาแยกเชื้อจุลินทรีย์ Epiphyte
3. นำเชื้อ Epiphyte ที่แยกได้ทั้งหมดมาทำการทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรค *C. gloeosporioides* ใน *in vitro, in vivo*
4. คัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ Epiphyte ที่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ดีที่สุดจากผลการทดสอบ *in vivo* (2 ไอโซเลต) จากเชื้อที่แยกได้ทั้งหมดมาจัดจำแนกชนิดโดยลักษณะทางฟีโนไทป์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้เชื้อจุลินทรีย์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพสามารถควบคุมเชื้อราก่อโรคแอนแทรกโนสในมะม่วงสายพันธุ์น้ำดอกไม้
2. คัดแยกได้เชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่ก่อให้เกิดโรคในมะม่วงเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในด้านอื่นๆต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เชื้อรา *C. gloeosporioides*

ชื่อของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ถูกเสนอให้ใช้ครั้งแรกโดย Penzig ในปี ค.ศ.1882 แทนที่ชื่อเดิม *Vermicularia gloeosporioides* ซึ่งเป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากตัวอย่างส้มในประเทศอิตาลี โดยในยุคสมัยแรกนั้นส่วนใหญ่จะใช้ชื่อ *V. gloeosporioides* นี้เมื่อกล่าวถึงเชื้อราที่ก่อโรคต่างๆในส้ม และเชื้อราสายพันธุ์อื่นๆที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาใกล้เคียงกันแต่อาจก่อโรคในเจ้าบ้านชนิดอื่น (Weir et al., 2012) เชื้อรา *C. gloeosporioides* โดยทั่วไปจะอยู่ในระยะ Anamorph (ระยะที่มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของเชื้อราก่อโรค) ซึ่งเป็นตัวการก่อให้เกิดโรคมากมาย รวมถึงโรคแอนแทรกโนสที่เกิดในผลไม้เขตร้อน เช่น กล้วย อโวกาโด มะละกอ กาแฟ เสาวรส มะม่วง เป็นต้น (Nelson, 2008)

2.2 ลักษณะทั่วไปของเชื้อรา *C. gloeosporioides*

เชื้อรา *C. gloeosporioides* เส้นใย (Mycelium) มีการแตกกิ่งก้านได้ดีและเส้นใยมีผนังกั้น สีของเส้นใยมีตั้งแต่ไม่มีสีถึงสีน้ำตาลเข้มสร้าง Fruiting body เพื่อให้กำเนิด Conidia เรียกว่า Acervulus ซึ่งมีสีอ่อนถึงสีน้ำตาล (วีระณีย์ และคณะ, 2537) Acervulus จะสร้างบนผิวพืชตรงชั้นของ Subcuticle Epidermal Subepidermal หรือ Peridermal ของพืช โดยอาจจะสร้างขึ้นเดี่ยวๆ หรือเป็นกลุ่มก้านชูสปอร์ (Conidiophore) ไม่มีสีถึงสีน้ำตาล มีผนังกั้น ผิวเรียบ Conidia เกิดโดยผนังชั้นในของ Conidiogenous cell ดันทะลุผนังชั้นนอกออกมาคล้ายลูกโป่ง จึงเรียกเซลล์นี้ว่า Enteroblastic conidiogenous cell โดย Conidiogenous cell ที่สร้างมีลักษณะใส ไม่มีสี ผนังเรียบ รูปทรงกระบอก Conidia เป็นเซลล์เดียว ขนาดประมาณ 7-20 x 2.5-5 ไมโครเมตร สปอร์ใส ไม่มีสี รูปทรงกระบอกหัวท้ายมน (Ploetz et al., 1994) ไม่มีผนังกั้น สปอร์จะงอก Germ tube ภายใน 6-8 ชม. และสร้าง Appressorium สีน้ำตาลเข้ม มีสีน้ำตาล ผิวเรียบ หรือขรุขระ อาจเกิดเดี่ยวๆ หรือสร้างหลายอันต่อกันภายใน 10-20 ชม. หลังจากนั้น Appressorium จะสร้าง Infection peg แทงเข้าไปในชั้น Cuticle เมื่อเวลาผ่านไป 48 ชม. Infection peg บางอันงอก Primary hypha สั้นๆ และจะหยุดการเจริญและแฝงตัวในระยะนี้โดยไม่มีการเจริญต่อจนกว่าสภาพแวดล้อมเหมาะสมจึงแสดงอาการของโรค (ดวงใจ, 2545) ลักษณะโคโลนีของเชื้อราที่เจริญบนอาหาร PDA มีสีขาวอมเทาถึงสีน้ำตาลสีดำ เส้นใยฟู สร้างกลุ่ม Conidia สีส้ม ลักษณะเป็นวงซ้อนๆกัน บางครั้งจะพบว่ามีการสร้าง Sclerotia น้ำตาลเข้มถึงสีดำ เป็นกลุ่มอยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อ (วีระณีย์, 2542)

2.3 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของมะม่วง (ธวัชชัย และคณะ, 2556)

ต้น ขนาดของลำต้นขึ้นอยู่กับสายพันธุ์และอายุ มีความสูงตั้งแต่ 10-40 เมตร ลำต้นจะตรงมีสีผิวเทาหรือเกือบดำ เปลือกจะแก่เป็นสีน้ำตาล มีผิวขรุขระและมีเกล็ดมาก เปลือกอ่อนจะมีสีเขียวและมีน้ำมันยาง เนื้อไม้เมื่ออายุน้อยจะมีสีเขียว เมื่อแก่มีอายุมากขึ้นจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแกมแดง มีกิ่งก้านขนาดใหญ่และแข็งแรง ลักษณะทรงพุ่มเป็นรูปครึ่งวงกลม รูปไข่ หรือรูปไข่ค่อนข้างยาว

ราก มีระบบรากเป็นรากแก้ว ความยาวของรากมีตั้งแต่ 6-8 เมตรหรือมากกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใบ เป็นใบเดี่ยวเรียงแบบสลับ มีเส้นใบเล็กและห่างกัน ขอบใบไม่มีเส้นใบ ลักษณะรูปร่างของใบแตกต่างออกไปตามสายพันธุ์ เช่น ลักษณะใบเรียวแหลม ลักษณะปลายใบสอบเรียว และลักษณะฐานใบเรียวแหลม

ดอก เป็นช่อดอก ออกตามปลายกิ่งหรือตาดอกที่อยู่ปลายกิ่ง ช่อดอกมีความยาวประมาณ 10-30 ซม. ตามก้านช่อดอกมักมีสีเขียวออกแดงและมักมีขน ในแต่ละช่อดอกประกอบด้วยดอก 2 ประเภท คือ ดอกสมบูรณ์และดอกเพศผู้ ดอกสมบูรณ์เพศ คือ ดอกที่มีเกสรเพศผู้และเกสรเพศเมียอยู่ภายในดอกเดียวกันเมื่อได้รับการผสมเกสรสามารถเจริญเติบโตกลายเป็นผลได้ ช่อดอกย่อยเรียงตัวแบบกระจุก ดอกย่อยมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5-8 มล. ก้านดอกมีขนขนาดสั้น ดอกมีกลิ่นหอม ดอกจะมีหลายสีแตกต่างกัน เช่น สีแดง สีชมพู สีขาว กลีบเลี้ยงมี 4-5 กลีบมีลักษณะโค้งนูนมีสีเขียวอมเหลือง และมีขนแข็งขนาดยาวปกคลุม

ผล ผลมะม่วงมีความแตกต่างกันในเรื่องของขนาด รูปร่าง สีเปลือก สีเนื้อ มีเสี้ยน รสชาติและกลิ่น แต่จะมีผิวเรียบ ความยาวของผล มีตั้งแต่ 5-20 ซม. ความกว้าง 4-8 ซม. ผลดิบจะมีสีเขียว เมื่อสุกเนื้อเปลี่ยนเป็นสีเหลืองหรือส้ม รูปร่างของผลมีลักษณะกลมและรูปไข่ค่อนข้างยาว ผลมักจะแบนด้านข้าง สีเปลือกด้านนอกของผล ประกอบด้วยส่วนผสมของสีต่างๆ เช่น สีเขียว เหลือง และแดง ผลจะแก่ภายใน 3-4 เดือน ผลแบ่งออกเป็น 3 ชั้น คือ ผนังผลชั้นนอก (เปลือก) จะหนาและมีต่อมน้ำยางพบกระจายทั่วไปในเปลือก ผนังผลชั้นกลาง เป็นส่วนของเนื้อผล ผนังผลชั้นใน (กะลา) เป็นส่วนหุ้มเมล็ดมีลักษณะแข็ง มีผิวเป็นเส้นใยมีเมล็ดภายใน 1 เมล็ด ซึ่งเมล็ดจะอยู่ถัดจากผนังผลชั้นในมีขนาดแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ บางชนิดมีเมล็ดลีบในเมล็ดประกอบไปด้วย Endosperm และต้นอ่อน

2.4 โรคสำคัญที่เกิดกับมะม่วง

โรคแอนแทรกโนส

เชื้อรา *Colletotrichum* spp. เป็นสาเหตุของโรคแอนแทรกโนสมากที่สุด ซึ่งเชื้อราที่ก่อโรคในกล้วย คือ *C. musae* ก่อโรคในมะม่วง คือ *C. gloeosporioides* บ้างก็เป็น *C. acutatum* ส่วนเชื้อราตัวอื่น ได้แก่ *Diplocarpon* spp. (ก่อโรคในกุหลาบ) และ *Elsinoe* spp. (ก่อโรคในองุ่น) (DAF, 2012)

อาการของโรคแอนแทรกโนสในมะม่วงพบได้ทั้งใบ กิ่ง ก้านใบ ช่อดอก และผล ซึ่งในใบอ่อนจะปรากฏแผลเป็นจุดๆขนาดเล็กจำนวนมาก มีสีน้ำตาลไปจนถึงดำ โดยจุดเล็กๆสามารถขยายกว้างขึ้นลุกลามติดกันจนเป็นแผลขนาดใหญ่ที่อาจมีรูปร่างไม่แน่นอน ส่วนในช่อดอกจะพบจุดสีดำหรือน้ำตาลเข้ม ซึ่งเมื่อแผลลุกลามมารวมกันอาจทำให้ช่อดอกเสียหายหมดทั้งช่อก่อนที่จะติดผล จึงเป็นสาเหตุให้ผลผลิตลดลงอย่างรุนแรง ส่วนก้านใบ กิ่ง และลำต้นเป็นส่วนที่ไวต่อการติดเชื้อจึงเปลี่ยนเป็นสีดำ หากมีการระบาดรุนแรงกิ่งมะม่วงอาจแสดงอาการไหม้จากปลายยอดลงมา อาการในผลอ่อนจะพบแผลสีน้ำตาลเข้มขนาดเล็ก เมื่อผลเริ่มสุกแผลจะขยายใหญ่ขึ้น มีสีน้ำตาลเข้มจนถึงดำ ในช่วงแรกนี้เชื้อรายังเข้าทำลายแค่ผิว แต่เมื่อแผลลุกลามจนปกคลุมพื้นที่ของผิวเกือบทั้งหมด เชื้อราอาจเข้าทำลายลึกไปในเนื้อผลอีก 5 มล. และเมื่อผิวของผลเริ่มเน่าจะปรากฏกลุ่มสปอร์ของเชื้อราที่มีลักษณะเป็นของเหลวสีส้มหรือสีชมพู สปอร์สามารถแพร่กระจายไปในอากาศได้โดยลมหรือฝน ซึ่งเชื้อราอาจอยู่พักตัวในผลมะม่วงได้เป็นเดือนและแสดงอาการให้เห็นตอนผลสุกแก่ (Nelson, 2008; สวพ.1, 2556)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การป้องกันการเกิดโรคแอนแทรกโนสเบื้องต้นสามารถทำได้โดยตัดแต่งกิ่งและทรงพุ่มหลังการเก็บเกี่ยวเพื่อควบคุมทรงพุ่มให้มีขนาดเหมาะสมกับระยะปลูก และเป็นการลดความชื้นในทรงพุ่ม เพื่อช่วยให้แสงแดดสามารถผ่านมาถึงบริเวณโคนต้น อากาศถ่ายเทได้สะดวก เก็บทำลายกิ่งและเศษใบเป็นโรคที่ร่วงหล่นโดยการเผาหรือฝัง คอยตัดแต่งกิ่งน้ำค้างในพุ่มออกเสมอ กำจัดวัชพืชโดยรอบบริเวณแปลงพืชโดยเฉพาะในช่วงก่อนออกดอกและติดผล เพื่อลดความชื้นในบริเวณทรงพุ่ม ไม่กองวัสดุอบชื้นรอบบริเวณโคนต้น ควบคุมปริมาณธาตุอาหารให้เหมาะสม ลดปริมาณไนโตรเจนลงเมื่อพบว่าใบและยอดอ่อนสมบูรณ์เกินไปเพราะอาจทำให้อ่อนแอต่อการเกิดโรค ในช่วงการเจริญเติบโตซึ่งอาจอ่อนแอต่อการเข้าทำลายของเชื้อโรค ได้แก่ ช่วงแตกใบอ่อน ช่วงออกดอก และช่วงติดผล ควรหมั่นตรวจสอบการเกิดอาการของโรคในส่วนต่างๆของพืชอย่างสม่ำเสมอ (สุชาติ, 2541; กสก., 2551)

โรคราดำและช่อดอกดำ

โรคราดำ (Sooty mould) และช่อดอกดำ (Blossom blight) เกิดจากเชื้อหลายชนิดด้วยกัน ได้แก่ เชื้อรา *M. mangiferea Cldosporium* sp. และ *Capnodium* sp. ทำให้ยอดช่อดอก ผล และกิ่งก้าน มีกลุ่มสีดำเจริญคลุมผิว เชื้อราเหล่านี้อาศัยผิวพืชเป็นที่ยึดเกาะโดยมีการระบาดร่วมกับแมลงและศัตรูพืช เช่น เพลี้ยจั๊กจั่น เพลี้ยแป้ง การเจริญเติบโตของราดำจะขึ้นอยู่กับน้ำหวานที่ขับถ่ายออกมาจากแมลง โดยเชื้อราจะกินน้ำหวานที่ขับอยู่บนใบ กิ่ง ช่อดอก และผลทำให้ส่วนดังกล่าวมีสีดำปกคลุมอยู่ เนื่องจากเป็นโรคที่มีสาเหตุมาจากแมลงและศัตรูพืชเป็นส่วนใหญ่ ดังนั้นการป้องกันและกำจัดต้องกำจัดแมลงที่เป็นสาเหตุของโรค โดยการฉีดพ่นสารฆ่าแมลง Carbaryl หรือ Cyfluthrin ในการป้องกันกำจัดแมลงปากดูดพวกเพลี้ยจั๊กจั่นในช่วงที่มะม่วงเริ่มแทงช่อดอกและเริ่มติดผล และการใช้น้ำหมักสมุนไพรที่เป็นทางเลือกเพื่อหลีกเลี่ยงการใช้สารเคมี ได้แก่ สารสะเดา น้ำหมักยูคาลิปตัส รมควัน เป็นต้น (ธวัชชัย และคณะ, 2556)

โรคราแป้ง

โรคราแป้ง (Powdery mildew) ทำความเสียหายระยะช่อดอกและติดผลของผลไม้หลายชนิด กลุ่มเชื้อราสีขาวคล้ายฝุ่นแป้งเจริญปกคลุมใบและช่อดอกทำให้ดอกร่วงไม่ติดผล ราแป้งเกิดจากเชื้อ *O. mangiferea* มีลักษณะเป็นผงสีขาว คล้ายผงแป้งโดยจะเกิดเป็นหย่อมๆ ต่อมาก็จะขยายออกแล้วรวมกันเป็นบริเวณที่มีขนาดใหญ่ขึ้น ทำให้เนื้อเยื่อใต้บริเวณที่ติดเชื้อเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลปนม่วง และเมื่อเป็นจำนวนมากๆก็จะทำให้เนื้อเยื่อบริเวณนั้นเกิดแผลไหม้ขึ้น การป้องกันและการจำกัดทำโดยการใช้สารฆ่าเชื้อรา ควรฉีดพ่นป้องกันเป็นระยะๆ โดยทั่วไปใช้กำมะถันซึ่งให้ประสิทธิภาพสูงเมื่อฉีดพ่นทั่วถึง แต่ไม่ควรใช้อัตราที่เข้มข้นเกินไปเพราะจะทำให้เกิดพิษทำลายเนื้อเยื่อ (ธวัชชัย และคณะ, 2556)

2.5 การควบคุมโรคด้วยสารเคมี

โรคในพืช ผัก และผลไม้ เป็นปัญหาสำคัญในการเพาะปลูก ซึ่งจัดเป็นศัตรูพืชชนิดหนึ่งที่สามารถทำความเสียหายให้แก่เกษตรกรผู้ปลูก โดยอาจเกิดขึ้นตั้งแต่เริ่มเพาะปลูกจนกระทั่งหลังการเก็บเกี่ยว การควบคุมโรคพืชมีหลายวิธี แต่วิธีที่ง่ายและได้ผลเร็วคือการใช้สารเคมี

มีการใช้สารเคมีหลายชนิดเพื่อยืดอายุการเก็บรักษา โดยมีวัตถุประสงค์ลดการเน่าเสียจากเชื้อราสาเหตุของโรคและชะลอการสุกและการเสื่อมสภาพของผล โดยการกำจัดหรือยับยั้งการผลิตเอทิลีน สารเคมีที่มีการนำมาใช้ในการค้าเพื่อยืดอายุการเก็บรักษามะม่วง ได้แก่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1-Met1hylcyclopropene (1-MCP) ซึ่งมีผลต่อการชะลอการสุกของมะม่วงได้นาน 33 วัน (จารุวัฒน์, 2554) และมีรายงานว่าพบว่า สาร1-MCP สามารถชะลอการสุกของผลมะม่วง ทำให้สามารถเก็บรักษาได้นานกว่าการไม่ใช้สาร โดยการรมด้วย 1-MCP 2,000 ppb มีแนวโน้มในการชะลอการสุกและยืดอายุการเก็บรักษาของผลมะม่วงสดให้นานที่สุด โดยสามารถเก็บรักษาได้นานเฉลี่ย 34 วัน (ปรางค์ทอง, 2556) และมีรายงานว่าการใช้ดินสอพอง และซอล์คที่ชุบด้วยสารละลายด่างทับทิมจะสามารถดูดซับเอทีลีนจากผลมะม่วงน้ำดอกไม้ได้ (พิชญา และคณะ, 2551)

นอกจากการใช้สารเคมีแล้วก็ยังมีการเก็บรักษาโดยการเคลือบผิวผล (Fruit coating) เป็นวิธีปฏิบัติที่นำมาใช้เพื่อลดการคายน้ำจากตัวผลผลิต ช่วยให้ผิวของผลดูสวยงาม และมีอายุการเก็บรักษาที่ยาวขึ้น สารละลายไขที่นิยมนำมาใช้กับผลมะม่วง เช่น Palaffin และ Carnauba wax (Dalal et al, 1971) และไคโตซาน อย่างไรก็ตามการใช้ไขเคลือบผลมะม่วงอาจจะก่อให้เกิดความเสียหายได้หากใช้ในระดับความเข้มข้นที่ไม่เหมาะสม เนื่องจากอาจก่อให้เกิดการหายใจแบบไม่ใช้ออกซิเจนได้ ปัจจุบันการควบคุมโรคในมะม่วงโดยเฉพาะการผลิตทางการค้ามุ่งเน้นใช้วิธีปฏิบัติที่มีความปลอดภัยและปราศจากพิษตกค้างจากสารเคมี โดยใช้สารสกัดจากธรรมชาติเพื่อนำมาใช้ในการควบคุมหลังจากการเก็บเกี่ยว ตัวอย่างการใช้การควบคุมด้วยสารเคมี

การสกัดน้ำมันหอมระเหยจากพืช เช่น จาก ดอก ใบ ราก ผล ยกตัวอย่าง น้ำมันหอมระเหยจากไทม์ (Thymeoil) และน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากมะนาวแป้น (Mexican lime oil) ซึ่งพบว่า ไทม์ (Thyme) สามารถยับยั้งการเจริญเชื้อ *C. gloeosporioides* ได้ดีกว่าน้ำมันหอมระเหยจากมะนาวแป้น (Bosquez-Molina et al., 2010) การผลิต Thymol จากพืช Thymol เป็นน้ำมันหอมระเหยผลิตได้จากพืช 3 ชนิดที่มีกลิ่นหอมจากบริเวณ Mediterranean พืชทั้ง 3 ชนิดคือ *Verbena officinalis Thymus vulgaris* และ *Origanum vulgare* พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อราที่ก่อโรคบนผลไม้ได้ (Camele et al., 2012)

2.6 การควบคุมทางกายภาพ

การล้างผล (Washing) เป็นวิธีปฏิบัติที่จำเป็นสำหรับมะม่วงเพื่อการส่งออก มีวัตถุประสงค์เพื่อให้มะม่วงดูสะอาด สวยงาม และช่วยลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ที่ติดมาจากแปลงปลูก โดยนำผลมะม่วงที่ผ่านการสะเด็ดยางแล้วมาล้างทำความสะอาด (อภิตา, 2553) แนะนำให้นำมะม่วงล้างในน้ำที่ผสมสารคลอรีน

การใช้ความร้อน (Heat treatment) เพื่อควบคุมโรคหรือแมลงศัตรูพืชหลังการเก็บเกี่ยวโดยการให้ความร้อนในรูปแบบต่างๆ กันแก่ผลมะม่วง เช่น การแช่น้ำร้อน (Hot water treatment ; HWT) วิธีนี้ใช้ในการส่งถ่ายความร้อนผ่านน้ำโดยช่วงระยะเวลาสั้นๆ (Couey, 1989) ข้อดีของ HWT คือ มีประสิทธิภาพควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยวที่สำคัญ เช่น โรคแอนแทรกโนสและโรคขั้วผลเน่า (Couey, 1989; McGuire, 1991) โดยช่วงอุณหภูมิของน้ำแนะนำอยู่ระหว่าง 43-46 ^{o}C หากใช้อุณหภูมิที่สูงกว่า 46 ^{o}C อาจทำให้เกิดความเสียหายขึ้นกับผลมะม่วงได้

การฉายรังสี (Irradiation) กับผลมะม่วงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่นำมาใช้กำจัดโรคและแมลงศัตรูพืชที่อาจติดปนเปื้อนไปกับผลมะม่วงสด การฉายรังสีถือเป็นเทคโนโลยีสากลที่ได้รับการยอมรับว่าเป็นวิธีปฏิบัติที่มีความปลอดภัยสูง โดยองค์การอนามัยโลก องค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ และทบวงการพลังงานปรมาณูระหว่างประเทศได้กำหนดการฉายรังสีกับผักและผลไม้ควรใช้ในปริมาณเฉลี่ยไม่เกิน 10 กิโลเกรย์ ซึ่งจะไม่ส่งผลเสียต่อคุณค่าทางโภชนาการและทาง

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ ห้ามนำไปใช้ในการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จุลชีววิทยากับผลไม้ภายหลังการเก็บเกี่ยว รังสีที่นิยมนำมาใช้กับผลผลิตสด คือ รังสีแกมมา (Gamma ray) เป็นคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่มีความยาวคลื่นสั้นและมีอำนาจทะลุทะลวงผ่านวัตถุได้สูง สามารถทำลายโรคและแมลงศัตรูพืชที่ติดปนเปื้อนมากับผลผลิต และไม่มีรังสีตกค้างหรือสะสมในอาหารภายหลังการฉาย (ยุทธพงศ์, 2539; Gladon et al., 1997) การฉายรังสีที่นิยมใช้ในปัจจุบัน คือ รังสีแกรมมา ประโยชน์ในการฉายรังสี คือ ยับยั้งแมลงและศัตรูพืช ชะลอการเน่าเสียของผลไม้และยืดอายุการเก็บรักษามะม่วงในระหว่างการจัดจำหน่าย การฉายรังสีแกรมมาแก่มะม่วงน้ำดอกไม้ โดยการนำมะม่วงน้ำดอกไม้ไปฉายรังสีแกรมมาปริมาณ 400 และ 700 เกรย์ พบว่าสามารถลดการผลิตเอทีลีน ทำให้ชะลอการสุกและการเน่าเสียของมะม่วงได้ (จารุวัฒน์ และคณะ, 2554)

การเก็บรักษาในสภาพควบคุมบรรยากาศ (Controlled atmosphere storage; CA storage) มะม่วงเป็นผลไม้ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและเคมีภายในผลอย่างรวดเร็วหลังการเก็บเกี่ยวจากต้นจึงทำให้มีอายุสั้น โดยเฉพาะบรรยากาศปกติซึ่งประกอบด้วยแก๊สออกซิเจนประมาณ 20% คาร์บอนไดออกไซด์ 0.03% ขณะที่ในสภาพควบคุมบรรยากาศได้ลดปริมาณแก๊สออกซิเจนลง และเพิ่มคาร์บอนไดออกไซด์ให้สูงขึ้น เพื่อทำให้ผลมะม่วงมีอัตราการหายใจลดลง สภาพดังกล่าวยังทำให้การผลิตเอทิลีนแบบ Autocatalytic ethylene production ที่พบในผลไม้กลุ่มที่บ่มให้สุกได้ ในเนื้อเยื่อพืชลดลง (Gorney and Kader, 1996) อันนำไปสู่การชะลอการสุกของผล ลดการเกิดโรคและการเปลี่ยนแปลงลักษณะคุณภาพด้านต่างๆระหว่างการเก็บรักษา (อภิตา, 2553)

2.7 การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี

การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี หมายถึง การลดปริมาณเชื้อก่อโรค หรือการลดกิจกรรมการก่อโรคของเชื้อสาเหตุโรคพืช หรือปรสิตที่อยู่ในระยะเจริญเติบโตหรือระยะพักตัว โดยการใช้สิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งหรือมากกว่ามาช่วยในการป้องกันกำจัดร่วมกับการจัดการสิ่งแวดล้อม พืชอาศัยและการใช้เชื้อจุลินทรีย์ต่อต้านโรค และอาจรวมถึงการใช้สารพันธุกรรม จากสิ่งมีชีวิตนั้นด้วย ซึ่งสิ่งมีชีวิตที่ใช้นี้ไม่รวมถึงมนุษย์ (Cook and Baker, 1983) ปัจจุบันการควบคุมโดยชีววิธีเริ่มเป็นที่ยอมรับว่าเป็นวิธีที่มีโอกาสสูงในการนำไปใช้ป้องกันกำจัดโรค เนื่องจากมีการนำไปใช้ได้ผลดี เป็นทางเลือกใหม่นอกจากการใช้สารเคมี เพื่อลดปัญหามลพิษต่อสภาพแวดล้อมจนมีการนำมาผลิตเป็นการค้า ดังนั้นจึงมีผู้หันมาสนใจในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีกันมากขึ้น โดยการนำเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์มาใช้ในการควบคุมโรคพืช (เกษม, 2532)

การนำชีววิธีมาใช้ควบคุมโรคแอนแทรกโนสในมะม่วงมีงานวิจัยมามากพอสมควร ซึ่งในแต่ละงานวิจัยจะใช้จุลินทรีย์ต้านทานโรคหลากหลายชนิดแตกต่างกัน ได้แก่ แบคทีเรีย รา และยีสต์ แต่มีจุดมุ่งหมายเดียวกัน คือ เพื่อศึกษาหาจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพดีเพียงพอที่จะใช้งานได้จริงกับโรคแอนแทรกโนสในมะม่วง (Santos-Villalobos et al., 2013, จินันทนา และวิชชา, 2555) ซึ่งโรคดังกล่าวส่งผลให้เกิดความเดือดร้อนต่อเกษตรกรเป็นอย่างมากทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศ จึงต้องศึกษาวิจัยการใช้ชีววิธีที่เหมาะสมกับพื้นที่นั้นๆ และสายพันธุ์ของมะม่วงเพื่อให้เกิดผลดีที่สุด อีกทั้งการเลือกชีววิธีมาใช้เป็นการลดการใช้สารเคมีที่เป็นอันตราย ลดต้นทุนให้ต่ำลงทดแทนการซื้อและการนำเข้าสารเคมีฆ่าเชื้อรา ส่งผลให้เกิดผลดีต่อตัวเกษตรกรเองลดปัญหาการตกค้างของสารเคมีที่มีอันตรายต่อผู้บริโภค และรักษาระบบนิเวศของสิ่งแวดล้อมอีกด้วย ยกตัวอย่างการควบคุมทางชีววิธี

การใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* จำนวน 2 สายพันธุ์ คือ *Bacillus pumilus* และ *B. thuringiensis* ที่ผลิตสารระเหยได้ พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *C. gloeosporioides* ได้ทั้งหมดหรือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ฆ่าเชื้อ *C. gloeosporioides* ได้ (Zheng et al., 2013) การใช้ยีสต์ปฏิปักษ์ *Meyerozyma caribbica* มาควบคุมเชื้อก่อโรค *C. gloeosporioides* สามารถยับยั้งการเกิดโรคแอนแทรกโนสได้ 86.7% ในการทดสอบ *in vivo* (Bautista-Rosales et al., 2013) ใช้เชื้อ *Pseudomonas fluorescens; B. subtilis; Saccharomyces cerevisiae* พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. gloeosporioides* สาเหตุของโรคแอนแทรกโนสได้ (Vivekananthan et al., 2004) และการใช้เชื้อ *B. megaterium* 3103 (BM-3103) โดยการพ่นให้แก่ทรงพุ่มมะม่วงตั้งแต่เริ่มออกดอกจนกระทั่งถึงเวลาเก็บเกี่ยวมีผลทำให้ลดการเกิดเชื้อรา *C. gloeosporioides* ในแปลงมะม่วงของเกษตรกรสาเหตุของโรคแอนแทรกโนสได้และเชื้อ *B. megaterium* สายพันธุ์ 3130 ซึ่งสามารถลดความรุนแรงของเชื้อรา *C. gloeosporioides* แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *B. megaterium* สายพันธุ์ 3130 มีความเป็นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์หรือมีฤทธิ์ยับยั้งสูงจึงลดการเข้าทำลายของเชื้อก่อโรคได้ (ศันสนีย์ และคณะ, 2554; อุดม และคณะ, 2551)

2.8 การควบคุมแบบผสมผสาน

การควบคุมแบบผสมผสานนั้นเป็นการนำหลากหลายวิธีที่กล่าวมาแล้วข้างต้นมาประยุกต์ใช้เข้าด้วยกันเพื่อให้ได้ผลลัพธ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคแอนแทรกโนสได้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น โดยส่วนใหญ่จะเป็นการใช้การควบคุมทางกายภาพร่วมกับการควบคุมด้วยสารเคมี ยกตัวอย่างการควบคุมแบบผสมผสาน นันทนา และคณะ (2556) ศึกษาผลของสารเคลือบผิวไคโตซานและสภาพอุณหภูมิต่ำต่อ คุณภาพและอายุการเก็บรักษามะม่วงน้ำดอกไม้พบว่าพบว่าการเคลือบผิวด้วยไคโตซานที่ระดับความเข้มข้น 0.5% ที่อุณหภูมิ 5 °C มีอายุการเก็บรักษานาน 9 วัน ขณะที่อุณหภูมิ 10 °C และ 15 °C มีอายุการเก็บนาน 5 และ 3 วัน ตามลำดับ

อภิรดี และคณะ (2554) ทำการศึกษาผลของการจุ่มน้ำร้อนและการฉายรังสีแกมมาต่อคุณภาพของผลมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้พบว่าการจุ่มผลมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้เบอร์ 4 ในน้ำร้อน 50 °C นาน 5 และ 10 นาที ก่อนนำไปฉายรังสีแกมมาสามารถชักนำให้ผลมะม่วงฉายรังสีแกมมามีการสุกตามปกติ โดยมีการอ่อนนิ่มของเนื้อผล รสชาติ สีเปลือกและสีเนื้อไม่แตกต่างกัน ส่วนผลมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้เบอร์ 4 ที่จุ่มในน้ำร้อน 45 °C นาน 5 นาที ก่อนการฉายรังสีแกมมามีการอ่อนนิ่มของเนื้อผลน้อยกว่าทรีทเมนต์อื่นๆอย่างมีนัยสำคัญ

2.9 ประโยชน์การควบคุมโดยชีววิธีต่อการเกษตร

เกษตรแผนใหม่ในการผลิตอาหารให้เพียงพอต่อจำนวนประชากรที่เพิ่มมากขึ้น ซึ่งมีการใช้พลังงานจากน้ำมันเชื้อเพลิงและพื้นที่ในการผลิตเพิ่มมากขึ้นตามลำดับ การเกษตรขยายไปยังเขตร้อนแห้ง และเขตกึ่งร้อนแห้ง ซึ่งจำเป็นต้องใช้ชลประทาน ซึ่งก็เผชิญกับปัญหาต่างๆมากมาย การเกิดการสะสมของเกลือ ซึ่งมีผลต่อการเพิ่มความเค็มของดินและน้ำมากขึ้น นอกจากนี้ยังพบปัญหาแห้งแล้ง ผลผลิตทางการเกษตรที่เพิ่มสูงขึ้นย่อมจะต้องใช้พลังงานต่างๆมากขึ้น ความสำเร็จของการปฏิวัติเขียวของธัญพืชนั้น การได้รับผลผลิตมากขึ้นนั้น จำเป็นต้องได้รับปุ๋ยและน้ำ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องหาวิธีทางในการเพิ่มหรืออย่างน้อยสุดก็รักษาระดับของการผลิตอาหารต่อหน่วยพื้นที่ไว้ ในขณะที่ป้องกันการลดลงของทรัพยากรธรรมชาติอื่นๆ การเกษตรจะต้องมีประสิทธิภาพมากขึ้นและได้ผลผลิตมากขึ้น นั้นหมายความว่าจะต้องมีความพยายามมากขึ้นในการปรับปรุงให้พืชเจริญเติบโตอย่างปกติและให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลผลิตสูงสุด ฉะนั้นการควบคุมโรคพืชจึงเข้ามามีบทบาทสำคัญต่อการเพิ่มผลผลิตของพืช และวัตถุประสงค์ดังกล่าวนี้ สามารถที่จะประสบผลสำเร็จได้โดยการควบคุมโดยชีววิธี ซึ่งจัดว่าเป็นวิธีที่ประหยัด และมีความสำคัญขึ้น การควบคุมโดยชีววิธีมีผลต่อการเพิ่มผลผลิตโดยการกำจัดหรือทำลายเชื้อก่อโรค เป็นการป้องกันพืชจากการติดเชื้อหรือเพิ่มความสามารถให้พืชต้านทานต่อเชื้อโรค (เกษม, 2532)

2.10 การหลีกเลี่ยงปัญหาการดื้อยาของเชื้อโรคที่มีต่อสารเคมี

ปัจจุบันสายพันธุ์ที่ดื้อยาต่อสารป้องกันสารกำจัดเชื้อราและแบคทีเรียกลายเป็นปัญหาสำคัญทั่วโลก ดังนั้นจำเป็นจะต้องใช้สารเคมีผสมกันซึ่งมีผลต่อการหยุดการเจริญของเชื้อได้ขณะหนึ่ง ปัญหาของความต้านทาน หรือการดื้อยาในสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชนี้ยังเป็นปัญหาในการศึกษาโรคพืช และทางกีฏวิทยา จะเห็นได้ว่าเชื้อโรคที่ต้านทานต่อสารเคมีที่ใช้ในการควบคุมโรคที่รู้จักกันดีนั้น ได้แก่ *Venturia inaequalis* สาเหตุของแอปเปิ้ลสแคป *Erysiphe cichoracearum* สาเหตุของโรคราแป้งของพืชตระกูลกระหล่ำ *Botrytis cinerea* สาเหตุของโรคหลังจากการเก็บเกี่ยวหลายชนิด ซึ่งเชื้อดังกล่าวเหล่านี้มีความต้านทานต่อยา Benomyl

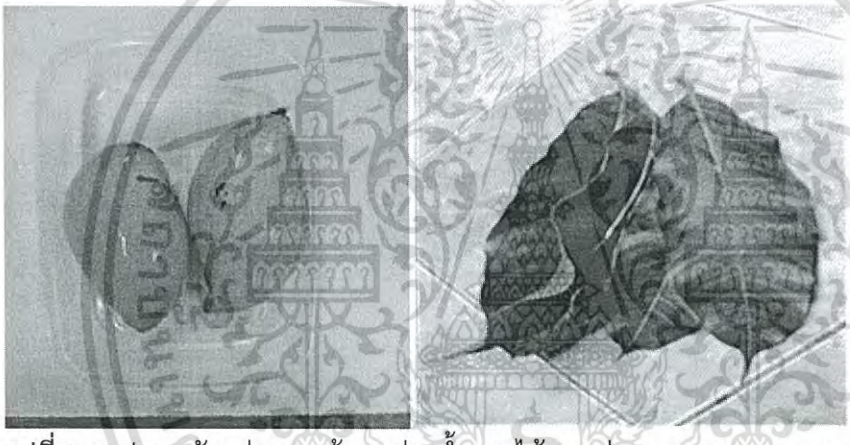
การควบคุมโรคโดยทั่วไปเกษตรกรนิยมใช้สารเคมี เช่น Benomyl Thiabendazole Prochloraz ร่วมกับวิธีการอื่นๆ ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถควบคุมโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้การใช้สารเคมีติดต่อกันเป็นแต่การใช้สารเคมีอย่างต่อเนื่องและติดต่อกันเป็นเวลานาน ก่อให้เกิดอันตรายต่อเกษตรกรผู้ปลูก ผู้บริโภค และมีผลกระทบต่อสภาวะแวดล้อม นอกจากนี้ยังทำให้เชื้อสร้างความต้านทานและกลายพันธุ์ โดยสารป้องกันกำจัดเชื้อราที่ส่งผลต่อการสร้าง Tubulin ภายในนิวเคลียสของเชื้อรา ซึ่งเมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมในตำแหน่งของยีน Beta-tubulin จะมีผลให้ 2 ลำดับเบสของกรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงไป เชื้อจึงเกิดการต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราดังกล่าว การใช้สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราสามารถชักนำให้เชื้อราสาเหตุมีการปรับตัวกลายเป็นเชื้อที่ต้านทานต่อสารเคมีที่ใช้ซึ่งลักษณะดังกล่าวถ่ายทอดไปสู่ลูกหลานได้ การที่เชื้อเกิดการกลายพันธุ์จะเกิดขึ้นจากการใช้สารเคมีชนิดนั้นติดต่อกันเป็นเวลานานและต่อเนื่อง (ธรรมศักดิ์, 2543) โดยปกติแล้วเชื้อปฏิปักษ์นั้นมักพบว่าอยู่ในดินและเศษซากพืชในสภาพแวดล้อมปกติ แม้จะมีปริมาณน้อยก็ตาม เชื้อปฏิปักษ์ส่วนมากที่นำเข้ามาใช้สำหรับควบคุมโดยชีววิธีของเชื้อโรคนั้น ได้แก่ *Agrobacterium Bacillus Pseudomanas และ Fusarium* การควบคุมโดยชีววิธีนั้นเป็นวิธีที่ประหยัดและต้นทุนการผลิตต่ำ และสามารถแก้ไขปัญหาการดื้อยาของพืชได้ (เกษม, 2532)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

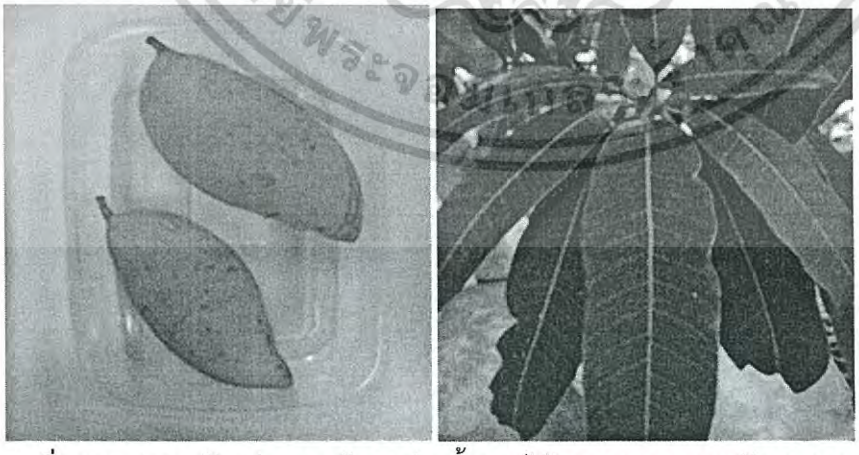
บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 การเก็บตัวอย่าง

ในการแยกเชื้อก่อโรคนั้นได้ซื้อมะม่วงที่เป็นโรคมาจากตลาดหัวตะเข้ เขตลาดกระบัง จำนวน 3 ผล โดยคาดการณ์จากจุดสีดำที่เกิดขึ้นบนผิวของผลมะม่วงซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าจะพบเชื้อ *C. gloeosporioides* ส่วนการแยกเชื้อ Epiphyte ได้หาพื้นที่เก็บตัวอย่างมะม่วงน้ำดอกไม้ด้วยการสอบถามจากคนรู้จักของคณะผู้จัดทำแทนที่จะเป็นสวนมะม่วง เพราะต้องการตัวอย่างมะม่วงที่ปราศจากการใช้สารเคมีเนื่องจากสารเคมีอาจจะส่งผลให้ตัวอย่างมะม่วงมีเชื้อจุลินทรีย์น้อยลงหรือไม่มีเลย หลังจากนั้นจึงได้สถานที่ 2 แห่ง ซึ่งเป็นมะม่วงน้ำดอกไม้ที่ปลูกไว้ในบริเวณบ้าน (เขตทุ่งครุ และเขตลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร รูปที่ 3.1 และ 3.2) โดยทำการเก็บตัวอย่างจากทั้งส่วนใบ และผลมะม่วง โดยเก็บตัวอย่างที่มีลักษณะสมบูรณ์ ไม่มีลักษณะอาการของโรค นำมาทำการแยกเชื้อภายใน 24 ชม. หลังจากเก็บตัวอย่าง



รูปที่ 3.1รูปภาพตัวอย่างจากต้นมะม่วงน้ำดอกไม้ เขตทุ่งครุ กรุงเทพมหานคร ผลมะม่วง (ซ้าย) และใบมะม่วง (ขวา)



รูปที่ 3.2 รูปภาพตัวอย่างจากต้นมะม่วงน้ำดอกไม้จากเขตลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร ผลมะม่วง (ซ้าย) และใบมะม่วง (ขวา)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 การแยกเชื้อราก่อโรค *C. gloeosporioides*

นำมะม่วงเป็นโรคที่ซื้อมาจากตลาดหัวตะเข้ เขตลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร ใส่กล่องพลาสติกบ่มที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 1-3 วัน (รูปที่ 3.3) เพื่อให้เชื้อเจริญเต็มที่ จากนั้นใช้ใบมีดผ่าตัดจุ่ม Alchohol 95% นำไปผ่านไฟ ตัดชิ้นเนื้อมะม่วงบริเวณส่วนที่เป็นโรคแอนแทรกโนสให้มีขนาดประมาณ 1x1 ตร.ซม. วางลงบนจานอาหาร PDA ที่เติมยาปฏิชีวนะ Penicillin โดยให้ด้านผิวมะม่วงที่เป็นโรคสัมผัสกับอาหาร วางชิ้นเนื้อลงกลางจานอาหารโดยวางจานละ 1 ชิ้น และทำตัวอย่างละ 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 10-15 วัน เพื่อให้เชื้อก่อโรคเจริญเต็มที่ จนเส้นใยเจริญออกมา ทำการส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แล้วแยกเชื้อราบริสุทธิ์โดยใช้ Needle เขี่ยเส้นใยที่บริเวณขอบโคโลนีไปเลี้ยงบนอาหาร PDA ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ บ่มที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นนาน 10 วัน

รูปที่ 3.3 แสดงผลของมะม่วงน้ำดอกไม้ที่มีลักษณะเป็นโรค จากตลาดหัวตะเข้ เขตลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร

3.3 การพิสูจน์การก่อโรคของเชื้อราที่แยกได้จากมะม่วง (ด้วยหลักการ Koch's Postulate (Agrios, 1997)

การปลูกเชื้อเพื่อพิสูจน์โรคบนมะม่วง โดยเลี้ยงเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่แยกได้จากหัวข้อ 3.3.2 บนอาหาร PDA ประมาณ 10-14 วัน เลือกมะม่วงสุกที่ปราศจากโรค ไม่มีรอยตำหนิ นำมะม่วงมาล้างด้วย Sterile distilled water จึงฆ่าเชื้อที่ผิวมะม่วงด้วย Alcohol 95% แล้ววางผึ่งให้แห้งภายใต้ Laminar flow จากนั้นนำผลมะม่วงมาทำให้เป็นหลุมแผลขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 มม. โดยทำผลละ 1 แผล แล้วเตรียมสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ใน NaCl 0.85% ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ให้มีความเข้มข้น 1×10^3 สปอร์/มล. ตรวจนับโดยใช้ Haemacytometer ดูดเชื้อก่อโรค *C. gloeosporioides* โดยใช้ Micro pipette ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในมะม่วงบ่มที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 7-10 วัน เมื่อครบกำหนดสังเกตอาการโรคที่เกิดขึ้น

3.4 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *C. gloeosporioides*

ศึกษาเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่แยกได้จากมะม่วงที่มีลักษณะเป็นโรค โดยเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA แล้วศึกษาลักษณะของเชื้อรา โดยสังเกตด้วยตาเปล่าและการทำการส่องภายใต้กล้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

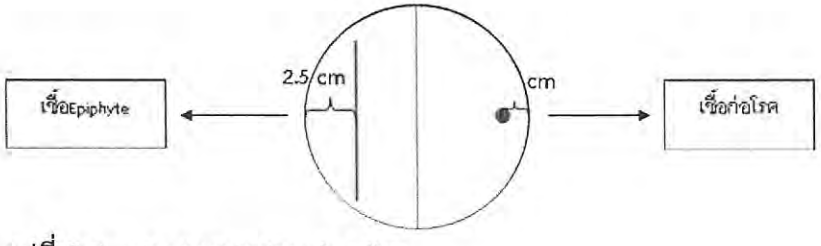
จุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า ลักษณะที่ศึกษาคือ ลักษณะสีของสปอร์ สีของเส้นใย รูปแบบของโคโลนีและเส้นใย รูปร่างของสปอร์ ทำการถ่ายภาพบันทึกผลการสังเกต

3.5 การแยกเชื้อจุลินทรีย์ Epiphyte (Swab test ดัดแปลงจากวิธีของ Wilson et al., 2010)

นำตัวอย่างผลมะม่วงและใบที่มีลักษณะสมบูรณ์ ไม่มีลักษณะอาการของโรค มาแยกเชื้อแบคทีเรีย Epiphyte โดยการ Swab เชื้อจากพื้นผิวมะม่วงและใบ แล้วป้ายลงบนอาหาร NA ที่เติมยาปฏิชีวนะ Nystatin ส่วนการแยกเชื้อยีสต์ Epiphyte นำมาป้ายบนอาหาร PDA ที่เติม Penicillin นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 ^{o}C เป็นเวลา 3-5 วัน ในการแยกเชื้อ Epiphyte จากใบได้มาทั้งหมด 62 ไอโซเลต จากการสุ่มคัดเลือกโคโลนีที่มีความเจริญมากที่สุดต่อเพลท จากทั้งหมด 31 เพลท คัดเลือกมาจำนวน 2 ไอโซเลตต่อเพลท และจากผิวของผลมะม่วง 50 ไอโซเลต จากการสุ่มคัดเลือกโคโลนีที่มีความเจริญมากที่สุดต่อเพลท จากทั้งหมด 25 เพลท คัดเลือกมาจำนวน 2 ไอโซเลตต่อเพลท รวมทั้งหมดเป็น 112 ไอโซเลต ได้เป็นแบคทีเรียทั้งหมด 93 ไอโซเลต และยีสต์ 19 ไอโซเลต เมื่อครบกำหนดจึงนำเชื้อจุลินทรีย์ Epiphyte มาทำการ Pure culture โดยใช้ Loop เผาไฟจนร้อนแดง รอให้เย็น เขี่ยเชื้อจุลินทรีย์ที่แบคทีเรียเป็นโคโลนีเดี่ยวมาทำการ Cross streak ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ NA และเชื้อยีสต์ลงอาหาร PDA

3.6 การทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรคบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

นำหลอด Eppendorf ของเชื้อก่อโรคที่เก็บที่อุณหภูมิ -4 ^{o}C มาตั้งทิ้งไว้ให้ละลาย แล้วนำมา Sub culture ภายใต้เทคนิคปลอดเชื้อ โดยใช้ Needle เผาไฟจนร้อนแดง รอให้เย็น จิกชิ้นวุ้นมาวางตรงกลางของแต่ละจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25^{o}C เป็นเวลา 7-10 วัน เมื่อใกล้ครบกำหนดระยะเวลาที่ใช้ในการบ่มเชื้อก่อโรคจึงนำเชื้อEpiphyte มาทำการ Sub culture โดยวิธีการ Cross streak เพื่อให้สามารถนำไปทำการทดสอบในระยะเวลาที่เหมาะสมได้ จากนั้นจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 ^{o}C เป็นเวลา 3-5 วัน เมื่อเชื้อ Epiphyte เจริญจนสามารถเห็นโคโลนีเดี่ยวได้ชัดเจนแล้วจึงใช้ Loop เผาไฟจนร้อนแดง รอให้เย็น ขีดลงในด้านหนึ่งของจานอาหาร ที่ใช้ทดสอบ *in vitro* (2.5 ซม. จากขอบจานอาหารด้านหนึ่ง รูปที่ 3.4) จากนั้นจึงลงเชื้อก่อโรคด้วยวิธี Corck Berlor โดยการใช้หลอดกาแฟกดเอาบริเวณขอบตัดบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อราเบาๆในจานอาหารที่ทำการ Sub culture แล้วนำไปวางลงบนอีกด้านหนึ่งของจานอาหารที่ใช้ทดสอบ *in vitro* โดยเอาส่วนที่เป็นเส้นใยของเชื้อราคว่ำลงบนผิวหน้าอาหาร (1 ซม. จากขอบจานอาหารอีกด้านหนึ่ง) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 ^{o}C เป็นเวลา 10-15 วันตรวจผลโดยการวัดระยะรัศมีการเจริญของเชื้อก่อโรค แล้วนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง



รูปที่ 3.4 แสดงการทดสอบ *in vitro*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.7 การทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรคผลมะม่วง (ดัดแปลงจากวิธีของ Zheng et al., 2013)

คัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ Epiphyte ที่สามารถยังยั้งเชื้อก่อโรคเพื่อนำมาทดสอบกับผลมะม่วง ก่อนการทำ *in vivo* ให้ลงเชื้อจุลินทรีย์ Epiphyte ที่คัดเลือกมาแล้วลงในอาหาร NB ทิ้งไว้ 18 ชม. เพื่อให้เชื้อเจริญจนอยู่ในช่วง Log phase การเลือกมะม่วงมาทดสอบควรเลือกมะม่วงสุกที่ปราศจากโรค นำมะม่วงมาล้างด้วย Sterile distilled water เพื่อทำความสะอาดคราบฝุ่นและดินออก จากนั้นจึงฆ่าเชื้อที่ผิวมะม่วงด้วย Alcohol 95% แล้ววางผึ่งให้แห้งภายใต้ Laminar flow เมื่อตัวอย่างมะม่วงแห้งแล้ว จากนั้นนำผลมะม่วงมาทำให้เป็นหลุมแผลขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 มม. โดยทำผลละ 2 แผล แล้วเตรียมสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ใน NaCl 0.85% ที่ฆ่าเชื้อแล้ว โดยใช้เชื้อราอายุ 14 วัน ที่เจริญบนอาหาร PDA ความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบ คือ 1×10^5 สปอร์/มล. ตรวจนับโดยใช้ Haemacytometer ดูดเชื้อก่อโรค *C. gloeosporioides* และ NaCl 0.85% โดยใช้ Micro pipette ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงในมะม่วง Control นำเชื้อ Epiphyte ปริมาตร 5 ไมโครลิตร และ *C. gloeosporioides* ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ใส่ลงในมะม่วงบ่มที่อุณหภูมิ 4 ^{o}C เป็นเวลา 7 วัน โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ เมื่อครบกำหนดวัดขนาดของแผลบนผลมะม่วง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

จากการแยกเชื้อจุลินทรีย์ Epiphyte จากใบและผลมะม่วงที่ปราศจากโรคในเขตทุ่งครุและเขตลาดกระบังจำนวน 112 ไอโซเลต โดยวิธี Swab test ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Wilson et al., 2010 มาทดสอบกับเชื้อ *C. gloeosporioides* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคแอนแทรกโนสที่แยกมาจากมะม่วงที่เป็นโรคจากตลาดหัวตะเข้ โดยมีการทดสอบ *in vitro* โดยลงเชื้อก่อโรคด้วยวิธี Cork borer เพื่อดูผลการยับยั้งเชื้อก่อโรคในเบื้องต้น แล้วจึงคัดเชื้อ Epiphyte ที่มีเปอร์เซ็นการยับยั้งค่อนข้างดีมาทำการทดสอบต่อใน *in vivo* ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Zheng et al., 2013 เพื่อดูผลการยับยั้งเชื้อก่อโรคในผลมะม่วง และคัดเชื้อ Epiphyte ที่มีผลการยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ดีที่สุดมา 2 ไอโซเลต เพื่อทำการจัดจำแนกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ ดังผลต่อไปนี้

4.1 ผลการแยกเชื้อราก่อโรค *C. gloeosporioides*

เมื่อนำเชื้อราก่อโรค *C. gloeosporioides* ที่แยกได้จากผลมะม่วงที่เป็นโรคจากตลาดหัวตะเข้มาตัดชิ้นเนื้อขนาด 1 × 1 ตร.ซม. แล้วเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 5-10 วัน (ตารางที่ 4.1) จะเห็นได้ว่าเชื้อก่อโรคทั้ง 9 ไอโซเลตที่แยกได้ มีลักษณะเหมือนกัน คือ มีเส้นใยสีขาวเจริญฟูหนาแน่นบนผิวหน้าอาหาร เมื่อเชื้ออายุมากขึ้นมีการสร้างสปอร์สีส้มเรียงเป็นวงชั้นใน แต่สปอร์สีส้มของเชื้อก่อโรคมีความชัดเจนไม่เท่ากัน โดยขึ้นอยู่กับร่องรอยการเกิดโรคและความรุนแรงของโรคบนพื้นผิวของผลมะม่วง จากนั้นจึงนำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ สังเกตเห็นสปอร์มีลักษณะรูปร่างเป็นท่อนสั้น หัวท้ายมน ใสไม่มีสี เหมือนกันทั้ง 9 ไอโซเลต ดังรูปที่ 4.1 จากนั้นจึงนำเชื้อก่อโรคที่แยกได้ไป Pure culture ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ก่อนนำไปทำการพิสูจน์ความสามารถในการก่อโรคด้วยวิธี Koch's Postulate

ลักษณะของเชื้อ *C. gloeosporioides* ที่พบมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของวีระณีย์ (2542) ที่ได้ทำการจำแนกเชื้อรา *Colletotrichum* sp. พบว่าเชื้อ *C. gloeosporioides* มีลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA มีสีขาว โดยเจริญเป็นวงบนผิวหน้าอาหาร สร้างเส้นใยฟูสีขาว สร้างโคโลนีสีส้มอมชมพูไม่มากนัก มีรูปร่างหัวท้ายมนใส ไม่มีสี และ ปวีณา (2554) ได้ทำการแยกเชื้อ *C. gloeosporioides* จากผลพริก โดยนำมาเลี้ยงบนอาหาร PDA พบว่าเส้นใยมีการเจริญฟูบนผิวหน้าอาหาร มีสีขาวครีม สปอร์มีลักษณะเป็นหยดเมือก สีส้มเรียงเป็นวงบนแผล เมื่อดูใต้จานอาหารเลี้ยงเชื้อเห็นกลุ่มสปอร์เป็นสีส้มและจากการตรวจดูลักษณะสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าสปอร์มีลักษณะรูปร่างเป็นท่อนสั้น หัวท้ายมน ไม่มีผนังกั้นภายใน ใสไม่มีสี

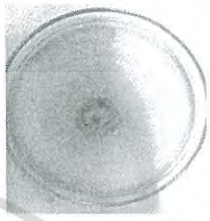
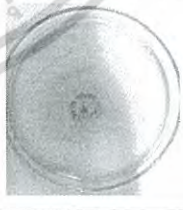
4.2 ผลการพิสูจน์เพื่อยืนยันเชื้อก่อโรค

โดยการนำผลมะม่วงมาทำให้เป็นหลุมแผลขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 มม. ผลละ 1 แผล แล้วเตรียมสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อก่อโรคจากเพลทที่ทำการ Pure culture แล้วใน NaCl 0.85% ที่ความเข้มข้น 1×10^3 สปอร์/มล. ตรวจนับโดยใช้ Haemacytometer ดูดเชื้อก่อโรคใส่แผลของมะม่วง 10 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 7-10 วัน ได้ผลดังตารางที่ 4.2 มาทดสอบการยืนยันว่าเป็นเชื้อก่อโรค พบว่าเชื้อก่อโรคทั้ง 9 ไอโซเลต สามารถก่อโรคในผล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

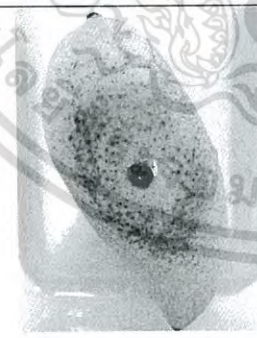
มะม่วงที่ปราศจากโรคได้จริง ทางคณะผู้จัดทำจึงได้คัดเลือกเชื้อก่อโรคมาเพียง 1 ไอโซเลต คือ P4 เพราะมีการแสดงอาการของโรคที่ชัดเจนเพื่อนำไปทดสอบในขั้นต่อไป

ตารางที่ 4.1 แสดงเชื้อก่อโรคที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้

ลำดับ		รูปภาพเชื้อก่อโรคที่เจริญบนอาหาร PDA		
1	P1		P5	
2	P2		P6	
3	P3		P7	
4	P4		P8	
			P9	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 แสดงการพิสูจน์เพื่อยืนยันเชื้อก่อโรคที่แยกได้ทั้งหมด 9 ไอโซเลต

ลำดับ	รูปภาพเชื้อก่อโรคที่เจริญบนผลมะม่วงน้ำดอกไม้ที่ปราศจากโรค			
1	P1		P5	
2	P2		P6	
3	P3		P7	
4	P4		P8	
5	P5		P9	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

4.3 ผลการแยกเชื้อจุลินทรีย์ Epiphyte

แยกเชื้อแบคทีเรีย Epiphyte โดยการ Swab เชื้อจากพื้นผิวมะม่วงและใบ ป้ายลงบนอาหาร NA ที่เติมยาปฏิชีวนะ Nystatin ส่วนการแยกเชื้อยีสต์นำมาป้ายบนอาหาร PDA ที่เติม Penicillin บ่มที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 3-5 วัน แล้วนำมา Pure culture แบคทีเรียลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ส่วนยีสต์ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เชื้อจุลินทรีย์ Epiphyte ที่แยกได้จากใบและผลมะม่วงที่ปราศจากโรค โดยในเขตทุ่งครุแยกได้ 66 ไอโซเลต และเขตลาดกระบังแยกได้ 46 ไอโซเลต แบ่งเป็นเชื้อที่แยกได้จากผิวของผล 62 ไอโซเลต และแยกได้จากใบ 50 ไอโซเลต รวมทั้งสิ้น 112 ไอโซเลต (ตารางที่ 4.3) โดยเชื้อจุลินทรีย์ Epiphyte แบคทีเรียที่แยกได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ที่ใส่ยาปฏิชีวนะ Nystatin มีจำนวน 93 ไอโซเลต ส่วนเชื้อจุลินทรีย์ Epiphyte ยีสต์ที่แยกได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ใส่ยาปฏิชีวนะ Penicilin มีจำนวน 19 ไอโซเลต ดังตารางที่ 4.4

จากการเก็บตัวอย่างเชื้อ Epiphyte ได้จำนวนทั้งหมด 112 ไอโซเลต สามารถนำไปจัดจำแนกชนิดได้ 2 ไอโซเลต เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ ประคองและคณะ (2547) ได้ทำการเก็บตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์ จากใบ ช่อดอก และผิวผลของมะม่วง ด้วยการล้างชิ้นส่วนพืช การบดชิ้นส่วนพืช และการวางชิ้นส่วนพืชได้ทั้งหมด 267 ไอโซเลต สามารถไปจัดจำแนกชนิดได้ 3 ไอโซเลต ศิริรัตน์และคณะ (2549) แยกจุลินทรีย์ผิวพืชจากทรงพุ่มมะม่วงโดย นำมาทดสอบเพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ทั้งหมด 347 ไอโซเลต คัดเลือกได้ 4 ไอโซเลต เป็นแบคทีเรีย 3 ไอโซเลต และยีสต์ 1 ไอโซเลต ที่มีลักษณะเป็นปฏิปักษ์กับเชื้อรา *C. gloeosporioides* ซึ่งในส่วนของการเก็บตัวอย่างเชื้อของงานวิจัยครั้งนี้ ได้จำนวนไอโซเลตที่น้อยกว่าอาจเป็นผลมาจากวิธีการเก็บเชื้อที่แตกต่างกัน จึงทำให้จำนวนจุลินทรีย์ที่แยกได้มีความหลากหลายน้อยกว่าและจำนวนไอโซเลตที่ได้แตกต่างกันไปด้วย

ตารางที่ 4.3 แสดงจำนวนของเชื้อจุลินทรีย์ Epiphyte ที่แยกได้จากสถานที่และตัวอย่าง

สถานที่เก็บตัวอย่าง	ตัวอย่างที่แยกเชื้อจุลินทรีย์ Epiphyte ได้		รวม
	ผิวของผลมะม่วง	ใบมะม่วง	
เขตทุ่งคร	36	30	66
เขตลาดกระบัง	26	20	46
รวม	62	50	112

ตารางที่ 4.4 แสดงการคัดแยกจุลินทรีย์ Epiphyte โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อและยาปฏิชีวนะ

อาหารเลี้ยงเชื้อและยาปฏิชีวนะที่ใช้คัดแยก	จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ Epiphyte	รวม
NA + Nystatin	93	112
PDA + Penicillin	19	

4.4 ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรคใน *in vitro*

การทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรคใน *in vitro* โดยลงเชื้อ Epiphyte ด้วยการใช้ Loop ขีดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ด้านหนึ่งห่างจากขอบของจานประมาณ 2.5 ซม. และลงเชื้อก่อโรคด้วยวิธี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

149355

Cork borer อีกด้านหนึ่งห่างจากขอบของจานประมาณ 1 ซม. แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 10-15 วัน เมื่อครบกำหนดเวลาจึงตรวจผลด้วยการวัดการเจริญของเชื้อก่อโรคโดยเริ่มวัดจากจุดกึ่งกลางของวุ้นที่ลงเชื้อด้วยวิธี ในหน่วยเซนติเมตร (ตารางที่ 4.5) จากนั้นนำไปคำนวณเปอร์เซ็นการยับยั้งตามสูตรดังต่อไปนี้

$$\% \ Inhibition = \frac{Control - \bar{x}}{Control} \times 100$$

โดยที่ % Inhibition = เปอร์เซ็นการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค (%)
Control = ระยะการเจริญของเชื้อก่อโรคในจานอาหาร Control (cm)
$\bar{x}$ = ค่าเฉลี่ยของระยะการเจริญของเชื้อก่อโรคจำนวนสองซ้ำ (cm)

ตารางที่ 4.5 ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรคใน *in vitro* ของเชื้อจุลินทรีย์ Epiphyte ทั้งหมด จำนวน 112 ไอโซเลต

ลำดับ	Epiphyte	*in vitro* 1	*in vitro* 2	Mean (cm)	Control (cm)	% Inb
1	MB1	4.70	4.50	4.60	6.52	29.45
2	MB2	4.30	4.90	4.60	6.52	29.45
3	MB3	4.80	4.50	4.65	6.52	28.68
4	MB4	4.00	4.20	4.10	6.52	37.12
5	MB5	4.80	5.60	5.20	6.52	20.25
6	MB6	3.50	3.30	3.40	6.52	47.85
7	MB7	5.70	5.40	5.55	6.52	14.88
8	MB8	5.00	5.30	5.15	6.52	21.01
9	MB9	3.60	3.50	3.55	6.52	45.55
10	MB10	5.10	4.90	5.00	6.52	23.31
11	MB11	3.80	3.60	3.70	6.52	43.25
12	MB12	4.80	5.10	4.95	6.52	24.08
13	MB13	5.50	5.20	5.35	6.52	17.94
14	MB14	5.30	5.20	5.25	6.52	19.48
15	MB15	5.40	5.60	5.50	6.52	15.64
16	MB16	7.20	6.70	6.95	6.52	-6.60
17	MB17	3.90	6.90	5.40	6.52	17.18
18	MB18	2.70	2.00	2.35	6.52	63.96
19	MB19	7.20	6.90	7.05	6.52	-8.13
20	MB20	4.90	2.50	3.70	6.52	43.25
21	MB21	2.50	1.90	2.20	6.52	66.26
22	MB22	2.40	2.20	2.30	6.52	64.72
23	MB23	6.90	6.30	6.60	6.52	-1.23
24	MB24	7	6.9	6.95	6.52	-6.60
25	MB25	6.8	6.4	6.6	6.52	-1.23
26	MB26	7.3	4.4	5.85	6.52	10.28
27	MB27	6.3	5.5	5.9	6.52	9.51
28	MB28	6.7	6	6.35	6.52	2.61
29	MB29	7	7	7	6.52	-7.36
30	MB30	6.8	6.9	6.85	6.52	-5.06

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

31	MB31	3.5	3.5	3.5	6.52	46.32
32	MB32	6.6	6.4	6.5	6.52	0.31
33	MB33	7.3	7.2	7.25	6.52	-11.20
34	MB34	7.3	5	6.15	6.52	5.67
35	MB35	8	7.9	7.95	6.52	-21.93
36	MB36	4	4.2	4.1	6.52	37.12
37	MB37	3.9	4.1	4	6.52	38.65
38	MB38	7.2	7.5	7.35	6.52	-12.73
39	MB39	7.6	7.3	7.45	6.52	-14.26
40	MB40	7.3	3.4	5.35	6.52	17.94
41	MB41	7.2	7.2	7.2	6.52	-10.43
42	MB42	7.3	7.4	7.35	6.52	-12.73
43	MB43	7.2	7.2	7.2	6.52	-10.43
44	MB44	7.2	7.5	7.35	6.52	-12.73
45	MB45	7.7	7.4	7.55	6.52	-15.80
46	MB46	7.1	7.8	7.45	6.52	-14.26
47	MB47	4.1	7.4	5.75	6.52	11.81
48	MB48	7.5	7.3	7.4	6.52	-13.50
49	MB49	7.9	8	7.95	6.52	-21.93
50	MB50	8	8	8	6.52	-22.70
51	MB51	7.9	8	7.95	6.52	-21.93
52	MB52	8.2	7.6	7.9	6.52	-21.17
53	MB53	7.3	7.3	7.3	6.52	-11.96
54	MB54	1.5	2.2	1.85	6.52	71.63
55	MB55	2.5	2.4	2.45	6.52	62.42
56	MB56	6	6	6	6.52	7.975
57	MB57	5.1	5.8	5.45	6.52	16.41
58	MB58	1.7	4.6	3.15	6.52	51.69
59	MB59	2.5	2.6	2.55	6.52	60.89
60	MB60	4.9	3.2	4.05	6.52	37.88
61	MB61	2.8	1.5	2.15	6.52	67.02
62	MB62	7	5.1	6.05	6.52	7.209
63	LB63	4.8	3	3.9	6.52	40.18
64	LB64	6.3	6.9	6.6	6.52	-1.23
65	LB65	2.8	3.2	3	6.52	53.99
66	LB66	6.9	7	6.95	6.52	-6.60
67	LB67	2.1	3.4	2.75	6.52	57.82
68	LB68	6.7	6.6	6.65	6.52	-1.99
69	LB69	6.9	6.8	6.85	6.52	-5.06
70	LB70	3.1	2.9	3	6.52	53.99
71	LB71	3.5	3.6	3.55	6.52	45.55
72	LB72	2.6	2.6	2.6	6.52	60.12
73	LB73	7	3.8	5.4	6.52	17.18
74	LB74	7.1	6.2	6.65	6.52	-1.99
75	LB75	4.8	7.5	6.15	6.52	5.67
76	LB76	6.7	6.5	6.6	6.52	-1.23
77	LB77	5.1	5.6	5.35	6.52	17.94
78	LB78	5.3	5.2	5.25	6.52	19.48
79	LB79	3.4	3.6	3.5	6.52	46.32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

80	LB80	3.9	3.8	3.85	6.52	40.95
81	LB81	5	5.4	5.2	6.52	20.25
82	LB82	5.2	5	5.1	6.52	21.78
83	LB83	5.1	5.1	5.1	6.52	21.78
84	LB84	4.9	4.7	4.8	6.52	26.38
85	LB85	3.4	3.4	3.4	6.52	47.85
86	LB86	3.3	3.2	3.25	6.52	50.15
87	LB87	4.3	4	4.15	6.52	36.35
88	LB88	4.9	4.8	4.85	6.52	25.61
89	LB89	5.3	5	5.15	6.52	21.01
90	LB90	3.1	3.8	3.45	6.52	47.09
91	LB91	5.7	5.6	5.65	6.52	13.34
92	LB92	5.1	5.3	5.2	6.52	20.25
93	LB93	5.2	5.4	5.3	6.52	18.71
94	LY94	4.3	4.4	4.35	6.52	33.28
95	LY95	4.6	4.6	4.6	6.52	29.45
96	LY96	4.7	5.3	5	6.52	23.31
97	LY97	4.7	4.8	4.75	6.52	27.15
98	LY98	4.6	4.7	4.65	6.52	28.68
99	LY99	6.6	2	4.3	6.52	34.05
100	LY100	4.8	4.8	4.8	6.52	26.38
101	LY101	7.3	8	7.65	6.52	-17.33
102	LY102	8	7.3	7.65	6.52	-17.33
103	LY103	7.8	7.8	7.8	6.52	-19.63
104	LY104	7.9	7.9	7.9	6.52	-21.17
105	LY105	5	3.8	4.4	6.52	32.52
106	LY106	5	5.1	5.05	6.52	22.55
107	LY107	4.9	4.8	4.85	6.52	25.61
108	LY108	4.5	4.7	4.6	6.52	29.45
109	LY109	4.8	4.6	4.7	6.52	27.91
110	LY110	4.5	4.8	4.65	6.52	28.68
111	LY111	4.9	5	4.95	6.52	24.08
112	LY112	4.6	4.5	4.55	6.52	30.21

หมายเหตุ แถบสีฟ้า คือ เชื้อจุลินทรีย์ Epiphyte ที่ได้ผลการยับยั้งที่ดีในการทดสอบ *in vitro*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลังจากคำนวณเปอร์เซ็นการยับยั้งเชื้อก่อโรคแล้ว พบว่าเชื้อแบคทีเรียมีแนวโน้มเปอร์เซ็นการยับยั้งที่สูงกว่ายีสต์ จากนั้นแบ่งกลุ่มของเปอร์เซ็นการยับยั้งที่ได้เป็น 5 ช่วง ซึ่งแบ่งออกเป็น 0-19% 20-39% 40-59% 60-79% และ 80-99% โดยได้จำนวนของเชื้อที่อยู่ในช่วงดังกล่าวเป็น 54 34 16 8 และ 0 ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.5 และรูปภาพที่ 4.1 จากรูปภาพที่ 4.2 แสดงจำนวนของเชื้อ Epiphyte ที่อยู่ในแต่ละช่วงเปอร์เซ็นการยับยั้ง (ตัวเลขสีแดง) โดยจะเห็นได้ว่ากลุ่ม 0-19% มีจำนวนของเชื้อ Epiphyte สูงที่สุด และรองลงมาเป็นกลุ่ม 20-39% 40-59% และ 60-79% ตามลำดับ ส่วนในกลุ่ม 80-99% ไม่พบเลย

เมื่อจัดช่วงของเปอร์เซ็นการยับยั้งเชื้อก่อโรคแล้ว จึงคัดเลือกเชื้อ Epiphyte ในช่วงที่ 4 ซึ่งมีเปอร์เซ็นการยับยั้ง 60-79% จำนวน 8 ไอโซเลต ไปทำการทดสอบ *in vivo* ในขั้นต่อไป เนื่องจากเชื้อ Epiphyte ในกลุ่มนี้มีเปอร์เซ็นการยับยั้งสูงที่สุดในจำนวนเชื้อ Epiphyte ที่พบ และมีจำนวนไม่มากจนเกินไปที่จะทำการทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรคใน *in vivo* โดยเปอร์เซ็นการยับยั้งเชื้อก่อโรคของเชื้อ Epiphyte ทั้ง 8 ไอโซเลต นี้แสดงในตารางที่ 4.2 ซึ่งจากตารางดังกล่าวพบว่าเชื้อ Epiphyte ที่ถูกคัดเลือกมานั้นเป็นเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด และเชื้อ Epiphyte ที่มีเปอร์เซ็นการยับยั้งสูงที่สุดคือรหัส MB54 (แยกมาจากผิวมะม่วงเป็นเชื้อแบคทีเรียลำดับที่ 54 จากเชื้อ Epiphyte ทั้งหมด 112 ไอโซเลต) โดยมีเปอร์เซ็นการยับยั้งสูงถึง 71.63% รองลงมาคือ MB61 MB21 MB22 MB18 MB55 MB59 และ LB72 ซึ่งมีเปอร์เซ็นการยับยั้งเป็น 67.02% 66.26% 64.72% 63.96% 62.42% 60.89% และ 60.12% ตามลำดับ

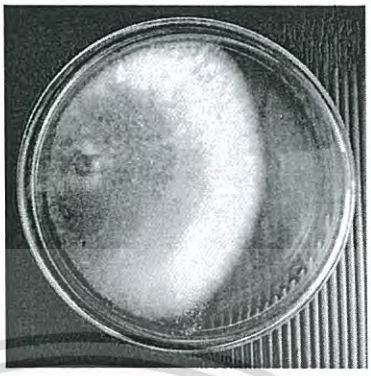
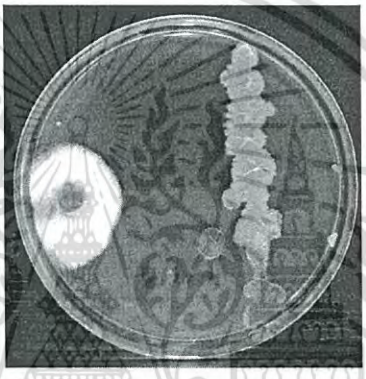
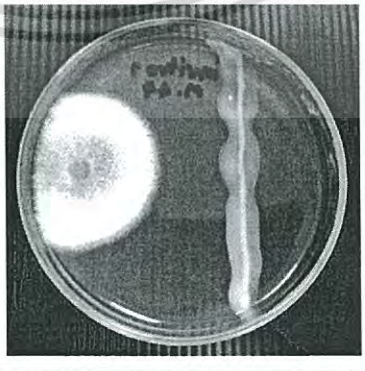
ตารางที่ 4.6 แสดงการแจกแจงความถี่ของช่วงเปอร์เซ็นการยับยั้งเป็นข้อมูลอันตรภาคชั้น

ช่วงเปอร์เซ็นการยับยั้ง	ความถี่ (f)	ความถี่สะสม
0-19	54	54
20-39	34	88
40-59	16	104
60-79	8	112
80-99	0	112

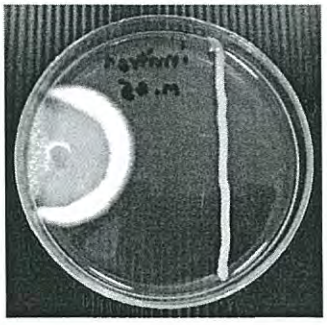
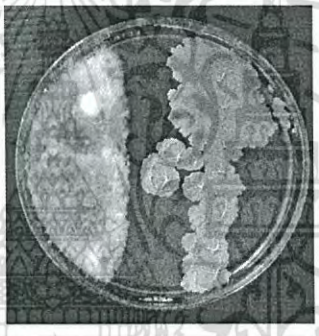
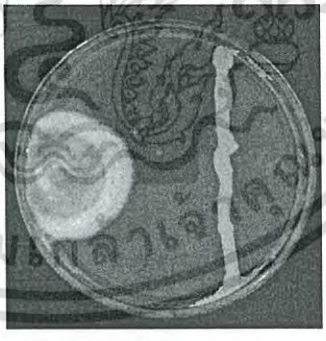
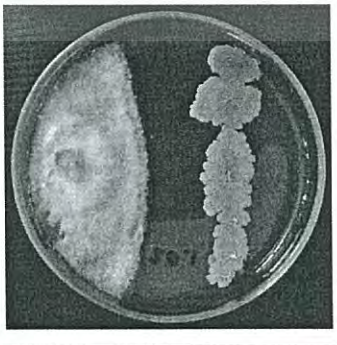
รูปภาพที่ 4.1 แผนภูมิแสดงเปอร์เซ็นการยับยั้งเชื้อก่อโรคในการทดสอบ *in vitro*

เอกสารนี้เป็นเอกสาร[illegible]ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 แสดงเปอร์เซ็นการยับยั้งของเชื้อ Epiphyte ที่คัดเลือกจากการทดสอบ *in vitro*

ลำดับ	รหัสเชื้อ **Epiphyte**	รูปแสดงการยับยั้งใน ***in vitro***	เปอร์เซ็นการยับยั้ง
1	Control		0%
2	MB54		71.63%
3	MB61		67.02%
4	MB21		66.26%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5	MB22		64.72%
6	MB18		63.96%
7	MB55		62.42%
8	MB59		60.89%
9	LB72		60.12%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการยับยั้งของเชื้อ Epiphyte ที่ได้ พบว่ามีเชื้อ Epiphyte จำนวน 8 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* สูงอยู่ในช่วง 60.12-71.63% ซึ่งจากงานวิจัยของประคอง และคณะ (2547) ที่มีเชื้อจุลินทรีย์ Epiphyte จำนวน 40 ไอโซเลต ที่มีความสามารถการยับยั้งสูงเช่นกัน ซึ่งอยู่ในช่วง 24.5-49.1% แสดงให้เห็นว่างานวิจัยครั้งนี้ เชื้อ Epiphyte ที่ได้มีเปอร์เซ็นการยับยั้งที่สูงกว่า อาจเป็นผลมาจากความสามารถของเชื้อในการยับยั้งสภาพแวดล้อมและระบบนิเวศของเชื้อตัวอย่างที่เก็บมาทดสอบที่มีความสมบูรณ์แตกต่างกัน Zheng et al. (2013) ได้ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของสารระเหยที่สร้างจากแบคทีเรีย *Bacillus* ที่ยับยั้งต่อราก่อโรคแอนแทรกโนสในมะม่วงช่วงหลังการเก็บเกี่ยว พบว่าแบคทีเรีย TB09 TB72 TB30 และ TB52 ในการทดสอบ *in vitro* สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* เป็น 88.87 80.07 46.25 และ 34.57% ตามลำดับ

4.5 ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรคใน *in vivo*

นำเชื้อจุลินทรีย์ Epiphyte ที่คัดเลือกแล้วว่ามีผลการยับยั้งเชื้อก่อโรคใน *in vitro* ได้ดี จำนวน 8 ไอโซเลต ดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น มาทำการทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรคใน *in vivo* ซึ่งเป็นการทดลองในผลมะม่วงสุกที่ปราศจากโรค โดยสร้างแผลทั้ง 2 ด้านของผลมะม่วงแล้วใส่เชื้อก่อโรคและเชื้อ Epiphyte ลงไป ซึ่งก่อนใส่เชื้อก่อโรคลงไปนั้นต้องทำการตรวจนับเชื้อด้วยวิธีHaemacytometer ก่อน ให้ได้ความเข้มข้น 1×10^5 สปอร์/มล. จากนั้นจึงนำมาคำนวณให้ได้ความเข้มข้นดังกล่าว โดยใช้สูตรดังต่อไปนี้

$$N_1V_1 = N_2V_2$$

โดย N_1 = ความเข้มข้นของสารแขวนลอยสปอร์เริ่มต้น
V_1 = ปริมาตรของสารแขวนลอยสปอร์ที่ต้องการ
N_2 = ความเข้มข้นของสารแขวนลอยสปอร์ที่ต้องการ
V_2 = ปริมาตรของสารแขวนลอยสปอร์ที่นำไปใช้จริง

ใส่เชื้อก่อโรค และ NaCl 0.85% 5 ไมโครลิตร ลงในแผลที่ทำไว้บนผิวมะม่วงของ Positive control และ Negative control ตามลำดับ ส่วนในมะม่วงที่ทดสอบใส่เชื้อก่อโรค 5 ไมโครลิตร จากนั้นจึงใส่เชื้อ Epiphyte ตามลงไป 5 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มในตู้เย็นเป็นเวลา 10-15 วัน หลังจากครบกำหนดเวลา พบว่าเชื้อ Epiphyte ที่มีการยับยั้งได้ดีที่สุดในการทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรคใน *in vivo* มีจำนวน 2 ไอโซเลต คือ เชื้อ Epiphyte ที่มีรหัส MB61 และ LB72 ดังตารางที่ 4.9 และ 4.10 เมื่อนำค่าที่ได้จากผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรคใน *in vivo* มาวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 22.0 โดยใช้วิธีของ Tukey ได้ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

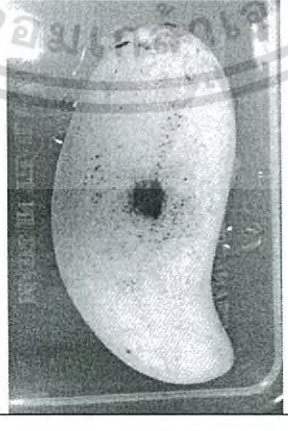
ตารางที่ 4.8 แสดงผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรคใน *in vivo*

รหัสเชื้อ Epiphyte	ค่าเฉลี่ยของขนาดแผลบนผิวมะม่วง (cm)
Control NaCl 0.85%	0.28^{b}
MB61	2.22^{c}
LB72	2.23^{c}
MB55	2.48^{cd}
MB59	2.48^{cd}
MB18	2.50^{cd}
MB54	2.64^{cd}
MB21	2.84^{d}
MB22	2.85^{d}
Control pathogen	4.20^{a}

หมายเหตุ ตัวอักษรที่ต่างกัน หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.9 แสดงการเปรียบเทียบการยับยั้งเชื้อก่อโรคกับตัวควบคุม

ลำดับ	รหัส	การยับยั้งเชื้อก่อโรคใน *in vivo*	ค่าเฉลี่ยของขนาดแผลบนผิวมะม่วง (cm)
1	Control pathogen		4.20
2	Control NaCl 0.85%		0.28
3	MB61		2.22
4	LB72		2.23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6 ผลการจัดจำแนกชนิดของจุลินทรีย์โดยลักษณะทางฟีโนไทป์

นำเชื้อจุลินทรีย์ Epiphyte ที่คัดเลือกแล้วว่ามีผลการยับยั้งเชื้อก่อโรคใน *in vivo* ได้ดี จำนวน 2 ไอโซเลต คือ รหัส MB61 และ LB72 มาทำการจัดจำแนกชนิดโดยลักษณะทางฟีโนไทป์ ดังต่อไปนี้

การตรวจดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์ Epiphyte

นำเชื้อจุลินทรีย์ Epiphyte ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ที่อุณหภูมิ 37 ^{o}C อายุ 24 ชม. มาสังเกตลักษณะภายนอกด้วยตาเปล่า และใช้ไม้บรรทัดวัดขนาดของโคโลนีในหน่วยมิลลิเมตร ดังตารางที่ 4.11

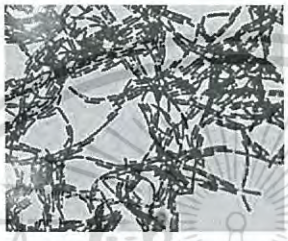
ตารางที่ 4.10 แสดงผลการตรวจดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีที่เจริญในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

ลำดับ	รหัส	รูปภาพลักษณะของโคโลนี	สี	ขนาดของโคโลนี	รูปร่างโคโลนี	ขอบโคโลนี	การยกตัวของโคโลนี	ผิวหน้าโคโลนี	ความวาวของผิวหน้าโคโลนี	คุณลักษณะเกี่ยวกับแสง
1	MB61		ขาวขุ่น	1.5 มิลลิเมตร	กลม	เรียบ	นูนโค้งจากผิวหน้าอาหาร	เรียบ	มันวาว	ทึบแสง
2	LB72		ขาวขุ่น	1.7 มิลลิเมตร	กลม	เรียบ	นูนโค้งจากผิวหน้าอาหาร	เรียบ	มันวาว	ทึบแสง

การย้อมสีแกรม

จากการย้อมสีแกรมด้วย Crystal violet และ Safranin o พบว่าเชื้อจุลินทรีน์ Epipyte ทั้ง 2 ไอโซเลต ติดสีม่วงของ Crystal violet จึงสรุปได้ว่า ทั้งรหัส MB61 และ LB72 เป็นแบคทีเรียแกรมบวก และมีการทดสอบทางชีวเคมี ดังตารางที่ 4.11 และ 4.12 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.11 แสดงผลการทดสอบ Gram staining

ลำดับ	รหัส	รูปจากกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000x	การติดสีแกรม	รูปร่างลักษณะ
1	MB61		ติดสีม่วงแกรมบวก	เซลล์มีรูปร่างเป็นท่อนอยู่ร่วมกันเป็นกลุ่มโดยต่อกันเป็นสายยาว
2	LB72		ติดสีม่วงแกรมบวก	เซลล์มีรูปร่างเป็นท่อนสั้น อยู่แยกเป็นเซลล์เดี่ยวๆกระจัดกระจาย

ตารางที่ 4.12 สรุปผลการทดสอบที่ใช้จัดจำแนกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ Epiphyte โดยลักษณะทางฟีโนไทป์

การทดสอบเพื่อจัดจำแนกเชื้อจุลินทรีย์ Epiphyte	*Bacillus* sp.	*Bacillus* sp.
Rod-shaped in young cultures	+	+
Stain Gram positive at least in young cultures	+	+
Endospores produced	+	+
Motility	+	+
Catalase	+	+
Marked acidity from glucose (TSI)	+	+
Strict aerobes	+	-
Facultative anaerobes or Microaerophiles	-	+
Oxidase	+	+

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการจัดจำแนกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ Epiphyte โดยลักษณะทางฟีโนไทป์โดยอ้างอิงจาก Bergey's Manual of Determinative Bacteriology พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ Epiphyte ที่นำมาทดสอบตรงกับคุณลักษณะของแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* ทั้ง 2 ไอโซเลต (รหัส MB61 และ LB72) จึงสรุปว่าเชื้อจุลินทรีย์ Epiphyte รหัส MB61 และ LB72 ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรค *C. gloeosporioides* ในการทดสอบ *in vivo* สูงคือ MB61 และ LB72 ซึ่งมีงานวิจัยที่ของ อุดม และคณะ (2551) ซึ่งศึกษาศักยภาพของแบคทีเรีย *Bacillus magaterium* ที่คัดเลือกแล้วในการเป็นศัตรูธรรมชาติต่อรา *C. gloeosporioides* พบว่า *B. magaterium* สายพันธุ์ 3103 มีศักยภาพในการเป็นปฏิปักษ์ต่อราบนมะม่วงน้ำดอกไม้ได้ ปวีณา (2554) รายงานว่า *Bacillus subtilis* สามารถลดการเกิดโรคแอนแทรกโนสบนผลพริกชี้ฟ้าได้ วราภรณ์ (2550) รายงานว่าแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ไอโซเลต BB165 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคแอนแทรกโนสที่เกิดจากเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ดีทั้งในเรือนปลูกทดลองและสภาพแปลงวิจัย จะเห็นได้ว่าจากงานวิจัยที่ได้กล่าวมาข้างต้นได้แสดงถึงประสิทธิภาพของการใช้แบคทีเรีย *Bacillus* sp. ในการป้องกันและกำจัดเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุของโรคแอนแทรกโนสได้ Kotan et al. (2009) รายงานว่า *B. pumilus* M-38 เป็นสายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคผลเน่า *Fusarium culmorum F. oxysporum* และ *F. sambucinum* ในมันฝรั่งได้ พื้นที่ที่ถูกยับยั้งด้วย *Bacillus pumilus* M-38 มีขนาด 24-33 มล. Toure et al. (2004) ใช้เชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ GA1 ป้องกันโรคราสีเทาจากเชื้อ *Botrytis cinerea* บนผลแอปเปิ้ลได้ Leelasuphakul et al. (2008) พบว่า *B. subtilis* สามารถยับยั้งราเขียว (Penicillium digitatum) ที่ก่อโรคในผลไม้ในสกุลส้ม ได้ 80% Arrebola et al. (2010) ศึกษาสารระเหยจากแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus* เพื่อลดการเน่าของผลส้ม พบว่าสารระเหยที่สร้างโดย *B. subtilis* หรือ *Bacillus amyloliquefaciens* พบว่ามีผลในการยับยั้งโรคที่เกิดกับส้มในการทดสอบ *in vitro* และ *in vivo* และ Chen et al. (2008) สารระเหยที่สร้างโดย *B. subtilis* สายพันธุ์ JA มีผลยับยั้ง *B. cinerea* จะเห็นได้ว่ามีงานวิจัยที่พบว่า เชื้อ *Bacillus* sp. มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งเชื้อที่ก่อโรคอื่นๆ อาทิ เช่น โรคราสีเทา โรคผลเน่า และราเขียวที่ก่อโรคในพืชสกุลส้ม ได้ด้วยเช่นกัน จากงานวิจัยที่กล่าวมาแสดงให้เห็นว่า *Bacillus* sp. มีคุณสมบัติสำหรับป้องกันกำจัดโรคพืชที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อราสาเหตุของโรคพืชได้หลายชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

ในการศึกษาครั้งนี้สามารถแยกเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคแอนแทรกโนส คือ *C. gloeosporioides* จากมะม่วงที่มีลักษณะเป็นโรคและคัดเลือกจุลินทรีย์ Epiphyte ที่ยับยั้งต่อเชื้อรา *C. gloeosporioides* ส่วนการทดสอบประสิทธิภาพการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ในการป้องกันกำจัดโรคแอนแทรกโนสในจานทดลอง ด้วยวิธี *in vitro* พบว่าทั้งสิ้น 8 ไอโซเลต ที่เชื้อก่อโรค ได้มากกว่า 60% จากจำนวนจุลินทรีย์ที่นำมาคัดเลือกทั้งหมด 112 ไอโซเลต ซึ่งแยกได้จากใบ และผิวของผลมะม่วง เมื่อทดสอบประสิทธิภาพการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการป้องกันกำจัด โรคแอนแทรกโนสบนมะม่วง ทดสอบด้วยวิธี *in vivo* พบว่ามีเพียง 2 ไอโซเลต คือ MB61 และ LB72 ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งขนาดของแผลบนผลมะม่วงได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ทำการจัดจำแนกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ Epiphyte โดยลักษณะทางฟีโนไทป์ได้เป็น *Bacillus* spp.

5.2 ข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาเพื่อจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่ที่มีฤทธิ์ยับยั้งต่อเชื้อรา *C. gloeosporioides* ควรศึกษาจากการจัดจำแนกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ Epiphyte โดยลักษณะทางฟีโนไทป์และจีโนไทป์ของ MB61 และ LB72 ต่อไป และควรทำการคัดเลือกเชื้อ Epiphyte ให้มีจำนวนไอโซเลต มากกว่านี้ เพราะยังคัดแยกได้น้อยเมื่อเทียบกับงานวิจัยอื่น ผลการศึกษาครั้งนี้มีความเป็นไปได้ที่จะใช้จุลินทรีย์เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เพื่อป้องกันกำจัดโรคแอนแทรกโนส ซึ่งน่าจะเป็นแนวทางที่ดีในการใช้จุลินทรีย์ที่ได้จากธรรมชาติ เพื่อทดแทนการใช้สารเคมีที่เป็นอันตราย จะเห็นได้ว่าเกษตรกรส่วนใหญ่ใช้สารเคมีในการควบคุมโรค การใช้จุลินทรีย์จากธรรมชาติ ยังมีความปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม เกษตรกร และผู้บริโภค การทดลองนี้เป็นการทดลองขั้นต้นเพื่อศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เท่านั้น ควรศึกษาการทดลองในสวนมะม่วงจริง เพื่อวัดประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีผลต่อมะม่วงที่ออกสู่ตลาดต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กรมส่งเสริมการเกษตร, 2551. คู่มือนักวิชาการส่งเสริมการเกษตร มะม่วง. ฝ่ายโรงพิมพ์ สำนักพัฒนาการถ่ายทอดเทคโนโลยี กรมส่งเสริมการเกษตร: กรุงเทพฯ.

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2551. เกษตรฯ เล็งเพิ่มยอดส่งออกมะม่วงสู่ตลาดญี่ปุ่น 2,000 ตัน/ปี หลังเกษตรกรใช้เทคโนโลยี JUST In TIME เพิ่มศักยภาพระบบการผลิต เดินตามแนวทางลดต้นทุนคุณภาพสม่ำเสมอ มีปริมาณตามข้อตกลง ส่งมอบทันเวลา และราคายุติธรรม. (ออนไลน์). http://maac.go.th/ewt_news.php?nid=2376 (สืบค้นเมื่อ 30 มิถุนายน 2558).

เกษม ร้อยทอง. การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี. คณะเทคโนโลยีการเกษตร. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง: กรุงเทพฯ.

จารุวัฒน์ บุญรอด ผ่องเพ็ญ จิตอารีรัตน์ อภิรดี อุทัยรัตนกิจ ทรงศิลป์ พจน์ชนะชัย และวาริช ศรีละออง, 2554. ผลของปริมาณรังสีแกมมาต่อการสุกมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้เบอร์ 4. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 42 : 3 (พิเศษ): 256-259.

จารุวัฒน์ โรจนภัทรากุล. 2554. ผลของ 1-methylcyclopropene ต่อการชะลอการสุกของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต. วิทยาศาสตร์ (เทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว). มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี: กรุงเทพฯ.

จินันทนา จอมดวง และวิชชา สะอาดสุด. 2549. การใช้ยีสต์ *Issatchenkia orientalis* ป้องกันกำจัดโรคแอนแทรกโนสของมะม่วงหลังการเก็บ. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 44. 30 ม.ค. - 2 ก.พ. 2549. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

ณรงค์ นิยมวิทย์. 2529. ผลิตภัณฑ์จากมะม่วง ตอนที่ 1. อาหาร 16(1): 8-13.

ดวงใจ มูลเขียว. 2545. การติดเชื้อแบบแฝงของเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. ในมะม่วงพันธุ์มหาชนก. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 80 น.

ทรงกลด ซื่อสัตตบงกช, 2553. โรคแอนแทรกโนส (Anthracnose). (ออนไลน์). แหล่งที่มา: http://www.agriqua.doae.go.th/plantclinic/Clinic/plant/mango /anthracnose.html (สืบค้นเมื่อ 15 มกราคม 2558).

ธวัชชัย รัตน์ชเลศ วิลาวัลย์ คำปวน และธีรนุช เจริญกิจ. 2556. มะม่วงการผลิตและเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว. วนิดาการพิมพ์. เชียงใหม่. 858 น.

ธรรมศักดิ์ สมมาตย์, 2539. คู่มือสารเคมีควบคุมโรคพืชสำหรับประชาชน. สำนักพิมพ์รั้วเขียว มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 87 น.

นันทนา เป็งเนตร์ บุญส่ง แสงอ่อน และพีระศักดิ์ ฉายประสาท. 2556. ผลของสารเคลือบผิวไคโตซานและสภาพอุณหภูมิต่ำต่อคุณภาพและอายุการเก็บรักษามะม่วงน้ำดอกไม้เบอร์ 4 ตัดแต่งพร้อมบริโภคในบรรจุภัณฑ์พลาสติก PP ห่อหุ้มด้วยถุงชนิด Nylon/LDPE. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 44 : 3 (พิเศษ) : 394-397.

นิภาดา ประสมทอง มาระตรี เปลี่ยนศิริชัย ประภัสสร บุษหมั่น วรภัทร ลัคนทินวงศ์ พิทักษ์ สิงห์-ทองลา และมงคล วงศ์สวัสดิ์, 2554. ผลของไคโตซานต่อเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของผลมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 42 : 3 (พิเศษ): 228-231.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นุชนาฏ ภักดี และ พีระศักดิ์ ฉายประสาท, 2556. ผลของบรรยากาศควบคุมต่อการเก็บรักษาผลมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้สีทอง. วารสารวิทยาศาสตร์การเกษตร. 44: 3 (พิเศษ): 194-196.

ประคอง เย็นจิตต์. 2547. การคัดเลือกและการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ในระยะก่อนและหลังการเก็บ. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต. โรคพืช. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 82 น.

ประคอง เย็นจิตต์ วรรณวิไล อินทนู จิระเดช แจ่มสว่าง นิพนธ์ วิสารทานนท์ และ วาริน อินทนา. 2547. การคัดเลือกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสบนใบของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42. 3-6 ก.พ. 2547. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ปรางค์ทอง กวานห้อง. 2556. ผลของ1-MCP และการบรรจุภัณฑ์ต่ออายุการเก็บรักษาของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้เบอร์สี่. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 43 : 3 (พิเศษ): 150-153.

ปริญญา จันทรศรี วิชชา สอาดสุด อุราภรณ์ สะอาดสุด และรัฐพล พรประสิทธิ์, 2552. การจัดการระบบการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงน้ำดอกไม้เพื่อการส่งออก. (ออนไลน์). แหล่งที่มา: www.phtnet.org/download/phtic-research/134.pdf. (สืบค้นเมื่อ 20 มกราคม 2558).

ปริยวรรณ ทรัพยสาร หทัยทิพย์ นิมิตเกียรติไกล ชัยรัตน์ เตชวุฒิพร และเฉลิมชัย วงษ์อารี, 2551. การเปรียบเทียบการจุ่มน้ำร้อนและการอบไอน้ำร้อนต่อคุณภาพการสุกของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 39 : 3 (พิเศษ): 91-94.

ปวีณา อุตะมะติง. 2554. ประสิทธิภาพการใช้เชื้อรา *Trichoderma virens* และแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ในการป้องกันกำจัดโรคแอนแทรคโนสบนผลพริกชี้ฟ้า. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต. เทคโนโลยีการเกษตร. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา: ลำปาง.

พรรณนีย์ วิชชาชู, 2557. มะม่วงน้ำดอกไม้ส่งออก. (ออนไลน์). แหล่งที่มา: http://it.doa.go.th/kasikorn/year-55/nov_dec_55/part-3.pdf. (สืบค้นเมื่อ 18 มกราคม 2558).

พาลาภ สิงหเสนี, 2540. พิษของยาฆ่าแมลงต่อผู้ใช้และสิ่งแวดล้อม. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์-มหาวิทยาลัย: กรุงเทพฯ.

พิชญา บุญประสม พรชัย ราชตนะพันธุ์ และวุฒิรัตน์ พัฒนิบูลย์. 2551. การผลิตสารดูดซับเอทิลีน สำหรับยืดอายุการเก็บรักษามะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 39 : 3 (พิเศษ): 107-110.

พิมเพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิธิยา รัตนาปนนท์. 2555. Aerobic bacteria / แบคทีเรียที่ต้องการออกซิเจน. (ออนไลน์). http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1119/aerobic-bacteria-แบคทีเรียที่ต้องการออกซิเจน. (สืบค้นเมื่อ 20 กรกฎาคม 2558)

มโนรัตน์ สุดสงวน ทิพา อัศวรักษ์ วัชระ จินตโกวิท และ จิรวรรณ กมลศิลป์. 2550. การศึกษาความสามารถของเชื้อราไตรโคเดอร์มาในการต้านทานเชื้อก่อโรคในผล. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 43 : 3 (พิเศษ): 150-153.

ยุทธพงศ์ ประชาสิทธิศักดิ์. 2539. เทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยวเพื่อลดการสูญเสียของมะขามหวานในระหว่างการเก็บรักษา. นิวเคลียร์ปริทัศน์. 1: 17-22.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ริญ เจริญศิริ และรัชนี คงฉุยฉาย. 2551. โภชนาการกับผลไม้. สำนักพิมพ์สารคดี, กรุงเทพฯ. 290 น.

วราภรณ์ บุญเกิด. 2550. การใช้เชื้อรา *Trichoderma harzianum* ร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพริก. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม. 86 น.

วิจิตรา เฉลิมชัยชนะ. 2552. โอกาสและกลยุทธ์ของสินค้าไทยในตลาดรัสเซีย. (ออนไลน์). http://dataverse.dvn.utcc.ac.th/dvn/dv/research/faces/study/StudyPage.xhtml?globalId=hdl:10527/10412 (18 มิถุนายน 2558).

วีระณีย์ ศรีพรมสุขม สมเดช กนกเมธากุล ขวัญใจ กนกเมธากุล และ เกษม สร้อยทอง. 2537. การศึกษาลักษณะความต้องการทางสรีรวิทยาของเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz.&sacc. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วง (*Mangifera indica* L.) และการควบคุมโรคโดยใช้สารสกัดจากจุลินทรีย์. วารสารสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร 16(2): 25 – 34.

วีระณีย์ ศรีพรหมสุข. 2542. การใช้เทคนิคทางเจลอิเลคโตรโฟรีซีสเพื่อจำแนกเชื้อรา *Colletotrichum* spp. และควบคุมเชื้อสาเหตุโรคแอนแทรกโนสของมะม่วงโดยชีววิธี. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต. เทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพ. 196น.

ศิริรัตน์ ตรีกาญจนวัฒนา อุดม ฟ้ารุ่งสาง ชลิดา เล็กสมบูรณ์ จริงแท้ ศิริพานิช และ นวลวรรณ ฟ้ารุ่งสาง. 2549. การคัดเลือกและศักยภาพของจุลินทรีย์ผิวพืชในการต่อต้านการเข้าทำลายโดยรา *Colletotrichum gloeosporioides* บนมะม่วงหลังการเก็บ. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 44. 30 ม.ค. -2 ก.พ. 2549. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ศันสนีย์ ศิลปะสุนทร นวลวรรณ ฟ้ารุ่งสาง ชัยณรงค์ รัตนกรีฑากุ เจริญ ขุนพรม และอุดม ฟ้ารุ่ง-สาง, 2554. ผลของการใช้ *Bacillus megaterium* ไอโซเลต 3103 ในสภาพแปลงต่อการปรากฏของโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วงภายหลังการเก็บเกี่ยว. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 42: 1 (พิเศษ) : 209-212.

ศิรกานต์ ศรีธัญรัตน์ เบญจมาส รัตนชินกร และคมจันทร์ สรงจันทร์, 2555. ผลของสารเคลือบผิวบางชนิดต่อคุณภาพของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้เบอร์ 4 ระหว่างการเก็บรักษา. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 43(2) (พิเศษ): 101-104.

สรพงค์ เบญจศรี, 2553. เกษตรอินทรีย์ในประเทศ. วารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ. 13(1).

สุชาติ วิจิตรานนท์, 2541. สมุดภาพโรคมะม่วง และการป้องกันกำจัดโดยวิธีผสมผสาน. กรมวิชาการเกษตร: กรุงเทพฯ.

สุดฤดี ประเทืองวงศ์ และคณะ, 2551. กระบวนการเฉพาะและสูตรจุลินทรีย์เพื่อสุขภาพพืช. (ออนไลน์). แหล่งที่มา: http://www.ku.ac.th/e-magazine/jan52/agri/agri2.htm. (สืบค้นเมื่อ 20 มกราคม 2558).

สำนักงานวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1, 2556. โรคและแมลงศัตรูของมะม่วง. (ออนไลน์). แหล่งที่มา: http://www.oard1.org/index.php?option=com_content&view=article&id=68&Itemid=72 (สืบค้นเมื่อ 30 มิถุนายน 2558).

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อภิตา บุญศิริ. 2553. วิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวมะม่วงและมังคุดเพื่อการส่งออก. เอกสารประกอบการบรรยายในการสัมนา "การพัฒนาการผลิตมะม่วงอย่างยั่งยืน". 20 กรกฎาคม 2553. ณ อาราญาน่าภูพิมาน รีสอร์ทแอนด์สปา อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา. 14 น.

อภิรดี อุทัยรัตนกิจ และผ่องเพ็ญ จิตอารีย์รัตน์. 2554. ผลของการจุ่มน้ำร้อนและการฉายรังสีแกมมาต่อคุณภาพของผลมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้เบอร์4. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 42: 1 (พิเศษ): 197-200.

อุดม ฟ้ารุ่งสาง นวลวรรณ ฟ้ารุ่งสาง ลพ ภวภูตานนท์ ชัยณรงค์ รัตนกรีฑากุล และเจริญ ขุนพรม, 2551. การใช้ Mango-Leaf Assay ในการประเมินศักยภาพของ *Bacillus megaterium* สายพันธุ์ 3103 ในการเป็นศัตรูธรรมชาติต่อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคหลังเก็บเกี่ยวของมะม่วง. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 39: 3 (พิเศษ) : 43-46.

Agrios, G. 1997. Plant pathology. Academic press: New York.

Alvindia, D. and Acda, M. 2015. Revisiting the efficacy of hot water treatment in managinganthracnose and stem-end rot diseases of mango cv. 'Carabao'. Crop protection. 67: 96-101.

Arrebola, E., Kumar, D. and Korsten, L. 2010. Effect of volatile compounds produced by*Bacillus* strains on post-harvest decay in citrus. Biological Control. 53: 122-128.

Bautista-Rosales, P., Calderon-Santoyo, M., Servin-Villegas, R., Ochoa-Alvarez, N. and Ragazzo-Sanchez, J. 2013. Action mechanisms of the yeast *Meyerozyma caribbica* for the control of the phytopathogen *Colletroricum Gloeosporioides*. Biological control. 65: 2293-301.

Bautista-Rosales, P., Calderon-Santoyo, M., Servin-Villegas, R., Ochoa-Alvarez, N., Vazquez-Juarez, R. and Ragazzo-Sanchez, J. 2014. Biocontrol action mechanisms of *Cryptococcus laurentii* on *Colletotrichum gloeosporioides* of mango. Crop Protection. 65: 194-201.

Block, G. and Langeth, L. 1994. Antioxidant vitamins and disease prevention. Food Technology. 48 (7): 80-84.

Bosquez-Molina, E., Ronquillo-de Jesús, E., Bautista-Banos, S., Verde-Calvo, J. and Morales-López, J. 2010. Inhibitory effect of essential oils against *Colletotrichum gloeosporioides* and *Rhizopus stoloniferin* stored papaya fruit and their possible application in coatings. Postharvest Biology and Technology. 57: 132-137.

Camele, I., Altieri, L., Martino, L., Feo, V., Mancini, E. and Rana, G. 2012. *In vitro* control of post-harvest fruit rot fungi by some plant essential oil components. International Journal of Molecular Sciences. 13: 2290-2300.

Chen, H., Xiao, X., Wang, J., Wu, L., Zheng, Z. and Yu, Z. 2008. Antagonistic

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

effects of volatiles generated by *Bacillus subtilis* on spore germination and hyphal growth of the plant pathogen, *Botrytis cinerea*. Biotechnology Letters. 30: 919-923.

Couey, H.M. 1989. Heat treatment for control of postharvest diseases and insect pests of fruits. HortScience. 24(2): 198-202.

Cook, R. and. Baker, K. 1983. The Nature and Practice of Eiological Control of Plant Pathogens. American Phytopathological Society. 539 p.

Cummings, B. 2006. Bacteria colonies. Pearson education: New York.

Dalal, V., Epieson, W., and Singh, N. 1971. Wax emulsion for fresh fruits and vegetables to extend their storage life. Indian Food Packer. 25: 9-15.

Department of Agriculture and Fisheries Queensland Government. 2012. Anthracnose. (online). https://www.daf.qld.gov.au/plants/fruit-and-vegetables/a-z-list-of-horticultural-diseases-and-disorders/anthracnose. Accessed 1 July 2015.

Finegold, S. and Martin, W. 1982. Diagnostic Microbiology. The C.V. Mosby Co., St. Toronto: London.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2014. Why is organic food more expensive than conventional food (online). http://www.fao.org/organicag/oa-faq/oa-faq5/en/. Accessed 2 October 2014.

Gautam, A. 2014. *Colletotrichum gloeosporioides*: Biology, Pathogenicity and Management in India. Journal of Plant Physiology & Pathology. 2: 2.

Gladon, R., Reitmeier, C., Gleason, M., Nonnecke, G., Agnew, N. and. Olsen, D. 1997. Irradiation of horticultural crops at lowa State University. HortScience. 32: 582-585.

Gorney, J. and Kader, A. 1996. Relation of ethylene biosynthesis in climacteric apple fruit by elevated CO_2 and reduced O_2 atmosphere. Postharvest Biology and Technology. 9: 311-323.

Gupta, V., Pandey, A., Kumar, P., Pandey, B., Gaur, R., Bajpai, V., Sharma, N., and Sharma, S. 2010. Genetic characterization of mango anthracnose pathogen *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. byrandom amplified polymorphic DNA analysis. African Journal of Biotechnology. 9(26): 4009-4013.

Holt, J., Krieg, N., Sneath, P., Staley, J., Williams, S. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Williams & Wilkins: Baltimore.

Kefialew, Y. and Ayalew, A. 2008. Postharvest biological control of anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) on mango (*Mangifera indica*). Postharvest Biology and Technology. 50: 8-11.

Kotan, R., Sahin, F., Demirci, E. and Eken, C. 2009. Biological control of the potato dry rot caused by *Fusarium* species using PGPR strains. Biological Control. 50: 194-198.

Kumpoun, W. and Uthaibutra, J. 2009. Storage life extension of exported 'Nam Dok

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Mai' mango by refrigerated modified atmosphere packing. The 10th International Controlled & Modified Atmosphere. 4-7 April 2009. Antalya, Turkey.

Leboffe, M. and Pierce, B. 1996. A photographic atlas for the microbiology laboratory. CO: Morton: Englewood. 138 p.

Leelasuphakul, W., Hemmanee, P. and Chuenchitt, S. 2008. Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit. Postharvest Biology and Technology. 48: 113-121.

Maqboo, M., Ali, A., Alderson, P., Mohamed, M., Siddiqui, Y. and Zahid, N. 2011. Postharvest application of gum arabic and essential oils for controlling anthracnose and quality of banana and papaya during cold storage. Postharvest Biology and Technology. 62: 71–76.

Maqboo, M., Ali, A., Ramachandran, S., Smith, D. and Alderson, P. 2010. Control of postharvest anthracnose of banana using a new edible composite coating. Crop Protection. 29: 1136-1141.

McEwan, F. and Stephenson, G. 1979. The use and significance of pesticides in the environment. Wiley-Interscience. New York. 538 p.

McGuire, R. 1991. Concomitant decay reduction when mangoes are treated with heat to control infestations of Caribbean fruit flies. Plant Disease. 75: 946-949.

Nelson, S. 2008. Mango anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*). Cooperative Extension Service, College of Tropical Agriculture and Human Resources, University of Hawai'i at Manoa. PD-48.

Ploetz, R., Zentmyer, G., Nishijima, W., Rohrbach, K. and Ohr, H. 1994. A Compendium of Tropical Fruit Diseases. The American Phytophatological Society Press, Inc. St. Pual, Minnesota. 118 p.

Prescott, L., Harley, J. and Klein, D. 2002. Microbiology. McGraw-Hill: Boston. 1026 p.

Santos-Villalobos, S., Guzmán-Ortiz, D., GÓmez-Lim, M., Délano-Frier, J., Folter, S., Sánchez-García, P. and Peña-Cabriales, J., 2013. Potential use of *Trichoderma asperellum* (Samuels, Liechfeldt et Nirenberg) T8a as a biological control agent against anthracnose in mango (*Mangifera indica* L.). Biological Control. 64:37–44.

Scalbert, A., Johnson, I., and Saltmarsh, M. 2005. Polyphenols: Aatioxidants and beyond. American Journal of Clinical Nutrition. 81: 2155-2175.

Sornsrivichai, J., Anusadorn, P., Oogaki, C. and Gemma, H. 1989. Storage life and quality of mango (Manaifera indica L. cv. Keaw Sawoey) fruits atored in seal packaging by plastic films and under low pressure at different temperatures. Japanese Journal of Tropical Agriculture. 33: 6-17.

Sornsrivichai, J., Gomolmanee, S., Boonyakiat, D., Uthaibutra, J., Boonlong, P. and

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ ดัดแปลง เผยแพร่ หรือนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Gemma, H. 1992. Seal packaging by plastic film as a technique for limiting fungal decay of mangoes. ActaHorticulturae. 296: 24-32.

Sutton, B. 1980. The Coelomycetes: fungi imperfect with pycnidia, acervulus and stromata. Commonwealth Mycological Instilute: England.

Than, P., Prihastuti, H., Phoulivong, S., Taylor, P. and Hyde, D. 2008. Chilli anthracnose disease caused by *Colletotrichum* species. Journal of Zhejiang University Science B. 9(10): 764-778.

Tittsler, R. and Sandholzer, L. 1936. The use of semi-solid agar for the detection of bacterial motility. Journal of Bacteriology. 31: 575-580.

Toure, Y., Ongena, M., Jacques, P., Guiro, A. and Thonart, P. 2004. Role of Lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease causedby *Botrytis cinerea* on apple. Journal of Applied Microbiology. 96: 1151–1160.

Vivekananthan, R., Ravi, M., Saravanakumar, D., Kumar, N., Prakasam, V. and Samiyappan, R. 2004. Microbially induced defense related proteins against postharvest anthracnose infection in mango. Crop protection. 23: 1061–1067.

Weir, B., Johnston, P. and Damm, U. 2012. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. Studies in Mycology. 73: 115-180.

Wilson, G., Raftos, D., Corrigan, S. and Nair, S. 2010. Diversity and antimicrobial activities of surface-attached marine bacteria from Sydney Harbour, Australia. Microbiological Research. 165:300-311.

Zheng, M., Shi, Jin., Shi, Jia., Wang, Q. and Li, Y. 2013. Antimicrobial effects of volatiles produced by two antagonistic Bacillus strains on the anthracnose pathogen in postharvest mangoes. Biological control 65: 200–206.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

สรุปค่าใช้จ่ายการดำเนินการ

1 การเบิกจ่ายงบประมาณ

งวดที่ 1 42,500บาท 85 % วันที่ได้รับอนุมัติให้เบิกจ่ายเงิน (ว/ด/ป) 13 มกราคม 2560

งวดที่ 2 7,500 บาท 15 % วันที่ได้รับอนุมัติให้เบิกจ่ายเงิน (ว/ด/ป) 27 มิถุนายน 2560

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. สรุปงบประมาณค่าใช้จ่ายที่ใช้นับตั้งแต่เริ่มทำการวิจัยถึงปัจจุบัน (จำแนกตามหมวดค่าใช้จ่าย)

บันทึกรายการรับ-จ่ายเงิน โครงการวิจัย สัญญาเลขที่ ..... ตั้งแต่วันที่ ...1 ตุลาคม 2559..... ถึงวันที่ .....30 กันยายน 2560.....

แหล่งทุน: เงินรายได้คณะ

ชื่อโครงการ : การคัดเลือกจุลินทรีย์เพื่อควบคุมโรคแอนแทรกโนสในมะม่วง

ชื่อหัวหน้าโครงการ: ณัฐวุฒิ รุ่งจินดามัย

ว/ด/ป	รายการ	เลขที่อ้างถึง	รายการรับ - จ่าย			รายรับ	รายจ่าย						รวม
			รับ	จ่าย	คงเหลือ	ดอกเบี้ยรับ	งบบุคลากร	งบดำเนินงาน				งบลงทุน	รายจ่าย
							ค่าจ้างชั่วคร	ค่าตอบแทน	ค่าใช้สอย	ค่าวัสดุ	ค่าสาธารณูปโภค	ค่าครุภัณฑ์	
	งบประมาณที่ได้รับการอนุมัติ (ตามแผน)												-
	จำนวนเงินที่ได้รับ (งวดที่ 1 = 85%)		42,500.00			58.57							
	จำนวนเงินที่ได้รับ (งวดที่ 2 = 15%)		7,500.00			13.92							
	จำนวนเงินที่ได้รับ (งวดที่ 3)		-										
	หัก ค่าใช้จ่าย (ครั้งที่ 1)			27,700.45			-	-	1,990.00	25,710.45	-	-	27,700.45
	ค่าใช้จ่าย (ครั้งที่ 2)			22,357.00			-	-	-	22,357.00	-	-	22,357.00
	งบประมาณคงเหลือ		50,000.00		-	57.45	72.49						
	รายละเอียดค่าใช้จ่าย												
ครั้งที่ 1													
	Petri dish	99434								24,212.13			24,212.13
	ค่าน้ำมัน สำหรับเดินทางเก็บตัวอย่าง	140/49							750.00				750.00
	ค่าน้ำมัน สำหรับเดินทางเก็บตัวอย่าง	10163916							940.00				940.00
	ค่าน้ำมัน สำหรับเดินทางเก็บตัวอย่าง	99869/49934632							300.00				300.00
	labtips	L57-13922								1,258.32			1,258.32
	Daiso	00048003000123								240.00			240.00
													-
													-
													-
													-
													-
	รวมครั้งที่ 1				-		-	-	1,990.00	25,710.45	-	-	27,700.45

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ห้ามทำซ้ำ ดัดแปลง เผยแพร่ หรือนำไปใช้ประโยชน์ทางการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ เว้นแต่ได้รับอนุญาตเป็นลายลักษณ์อักษรจากมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ | All rights reserved

ครั้งที่ 2													
	อุปกรณ์ทั่วไป	5001149691							303.00			303.00
	อาหารเลี้ยงเชื้อ SDA	SX5903001329							1,348.20			1,348.20
	อุปกรณ์ทั่วไป	103-002915							905.00			905.00
	เก้าอี้บาร์	1030610559							2,990.00			2,990.00
	อุปกรณ์ทั่วไป	0381708180015							1,041.00			1,041.00
	สินค้าแมคโคร	001010564613							552.00			552.00
	อุปกรณ์ทั่วไป lab connection	5803023							12,752.80			12,752.80
	Gammaco	263/13125							2,465.00			2,465.00
												-
												-
												-
												-
	รวมครั้งที่ 2						-	-	-	22,357.00	-	-	22,357.00

ลงชื่อหัวหน้าโครงการ ..... วันที่ .....

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยการกีฬาแห่งชาติ วิทยาลัยการทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

T149355

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้