Agricultural Sci. J. 42 : 3 (Suppl.) : 228-231 (2011) ว. วิทย. กษ. 42 : 3 (พิเศษ) : 228-231 (2554)

ผลของไคโตซานต่อเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของผลมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้

Effect of chitosan on anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) of mango fruit cv. Nam Dok Mai

นิภาดา ประสมทอง[1*], มาระตรี เปลี่ยนศิริชัย[1], ประภัสสร บุษหมั่น[2], วรภัทร ลัคนทินวงศ์[3], พิทักษ์ สิงห์ทองลา[4] และมงคล วงศ์สวัสดิ์[1]

Nipada Prasothong [1*], Maratree Plainsirichai[1], Prapassorn Bussaman[2], Voraphat Luckanatinavong[3] , Pitak Singhthongla [4] and Mongkol Wongsawas[1]

Abstract

Mango cv. Nam Dok Mai is an important economic fruit of Thailand. However, it always has a problem from anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. Use of chemical control may cause the remaining recidure. Chitosan at 0.1, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0%, compared with 750 ppm (0.075%) benomyl and sterile distilled water were mixed to Potato Dextrose Agar (PDA) tested with *C.gloeosporioides in vitro* by poisoned food technique, mycelium disc of *C. gloeosporioides* was old 7 days on PDA mixed with chitosan. This was put center of the agar plate. Incubation temperature at 25 °C. Mycelium growth was recorded by measuring the diameter of mycelium growth for 7 days. The result demonstrated that 2.0 % chitosan inhibited 80.4 % of mycelium growth 80.4 % while 0.075 % benomyl and sterile distilled water inhibited the mycelium at 100.0% and 0.0% respectively.

Keywords: Chitosan, Mango Fruit cv. Nam Dok Mai, *C. gloeosporioides*

บทคัดย่อ

มะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้เป็นผลไม้เศรษฐกิจที่สำคัญของไทย แต่มักมีปัญหาโรคแอนแทรคโนสจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* การควบคุมโดยใช้สารเคมีทำให้เกิดพิษตกค้าง งานวิจัยนี้ใช้ ไคโตซานความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0% เปรียบเทียบกับ Benomyl ความเข้มข้น 750 ppm (0.075%) และน้ำกลั่นปลอดเชื้อ โดยผสมกับอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) ทดสอบกับเชื้อรา *C. gloeosporioides* ในห้องปฏิบัติการ ด้วยวิธี Poisoned food technique โดยนำ mycelial disc ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* อายุ 7 วัน มาวางบนอาหาร PDA ที่ผสมไคโตซานดังกล่าว โดยวางตรงตำแหน่งจุดศูนย์กลางของจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส บันทึกการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* ด้วยการวัดเส้นใยที่เจริญเป็นเวลา 7 วัน พบว่าไคโตซานความเข้มข้น 2.0 % ยับยั้งการเจริญของเส้นใยได้ 80.4 % การใช้ Benomyl และน้ำกลั่นปลอดเชื้อยับยั้งได้ที่ 100.0% และ 0.0% ตามลำดับ

คำสำคัญ: ไคโตซาน มะม่วงน้ำดอกไม้ เชื้อรา *C.gloeosporioides*

คำนำ

มะม่วง (*Mangifera indica* Linn.) อยู่ในวงศ์ Anacardiaceae มีถิ่นกำเนิดอยู่ในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และอินเดีย (**ศิริรัตน์**, 2549) เป็นผลไม้ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ โดยเฉพาะมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ เป็นมะม่วงรับประทานสุกที่ได้รับความนิยมจากผู้บริโภคทั้งในและต่างประเทศ อย่างไรก็ตามปัญหาสำคัญของมะม่วงพันธุ์นี้คือ อ่อนแอต่อการเข้าทำลายของโรคหลังการเก็บเกี่ยวได้ง่ายกว่าพันธุ์อื่น โดยเฉพาะโรคแอนแทรคโนส (Anthracnose disease) เกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* โรคปรากฏให้เห็นได้ทั้งระยะก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว โดยเชื้อราสามารถติดไปกับผลอ่อนในสภาพพักตัว และเจริญอย่างรวดเร็วเมื่อผลเริ่มสุก ทำให้เกิดจุดดำกระจายบนผล และขยายตัวออกกว้างเมื่อผลมะม่วงสุก

[1] ภาควิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม จ. มหาสารคาม 44150
[1] Department of Agricultural Technology, Faculty of Technology, Mahasarakham University, Maha Sarakham 44150.
[2] ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม จ. มหาสารคาม 44150
[2] Department of Biotechnology Faculty of Technology, Mahasarakham University, Maha Sarakham 44150.
[3] ภาควิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ จ.ปทุมธานี 12120
[3] Department of Agricultural Technology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University, Pathumthani 12120.
[4] ภาควิชาเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี จ. อุบลราชธานี 44150
[4] Department of Agricultural, Faculty of Kasadsat, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani 34190.
* Corresponding author: Email: nipada.pt@gmail.com

มาก และมีกลุ่มสปอร์สีชมพู หรือสีส้ม เกิดบริเวณเนื้อเยื่อที่เน่าดำมาก ผลมะม่วงจะเหี่ยวและเน่าดำทั้งผลในเวลาต่อมา ปัจจุบันการควบคุมมักใช้สารเคมีในการป้องกันโรค โดยเฉพาะสารเคมีประเภทดูดซึม เช่น Carbendarzime, Benomyl และ Thiabendazole แต่เริ่มมีข้อจำกัดในบางประเทศ เนื่องจากมีสารพิษตกค้างเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค ซึ่งในประเทศที่พัฒนามีการออกมาตรการควบคุมการใช้สารเคมีบางชนิด เช่นประเทศญี่ปุ่น และสหรัฐอเมริกา (สุดคะนึง, 2546) ดังนั้นการใช้วิธีการอื่นแทนการใช้สารเคมีเพื่อควบคุมโรคแอนแทรคโนสในมะม่วงจึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจและจำเป็น งานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาการใช้สารจากธรรมชาติที่ปลอดภัย เช่น ไคโตซาน (Chitosan) นอกจากนิยมนำมาใช้ในการเคลือบผิวเพื่อรักษาคุณภาพผลไม้แล้ว ยังพบว่าสามารถลดการเกิดโรคหลังการเก็บเกี่ยวได้ เนื่องจากไคโตซานเป็นสารตั้งต้นของการชักนำการสร้างเอนไซม์ต่างๆ เพิ่มปริมาณ Pathogenesis-related (PR) Proteins โดยเพิ่มการสังเคราะห์เอนไซม์ Chitinases และ เอนไซม์ ß - 1, 3 -glucanase ให้มากกว่าปกติ ซึ่งเป็นเอนไซม์หลักที่มีคุณสมบัติต่อต้าน และป้องกันการรุกรานของเชื้อราสาเหตุโรคพืช

อุปกรณ์และวิธีการ

เตรียมเชื้อราสาเหตุโรค

นำ *C.gloeosporioides* Penz. ที่ได้จากภาควิชาโรคพืชวิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กรุงเทพฯ มาทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้เข็มปลายงอตัดชิ้นวุ้นบริเวณที่ปลายเส้นใยเจริญจาก Slant เชื้อรา *C. gloeosporioides* Penz. วางชิ้นวุ้นบนกลางอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วบ่มเชื้อในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 25 °C นาน 7 วัน จากนั้นใช้ Cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 5 มิลลิเมตร ที่ฆ่าเชื้อด้วยการจุ่มในเอทธานอล 95% แล้วลนไฟฆ่าเชื้อ รอให้ Cork borer เย็นลง จึงตัดปลายเส้นใยของเชื้อรา นำชิ้นวุ้นของเชื้อราที่ตัดแล้วมาวางบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) โดยให้ด้านที่มีเชื้อราสัมผัสผิวหน้าอาหาร บ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ ที่ 25 °C นาน 7 วัน แล้วจึงนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

การเตรียมไคโตซาน

ดัดแปลงจากวิธี Bautista-Baños *et al*. (2003) โดยละลายผงไคโตซาน คือ 6.0% แล้วเติมกรดอะซิติกความเข้มข้น 1.0% ละลายให้เข้ากันแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น แล้วนำมาเจือจางในอาหาร PDA ให้ได้ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0% ปรับ pH 5.6 ด้วย NaHO 1 N

การศึกษาผลของไคโตซานต่อเชื้อรา

ศึกษาผลของไคโตซานที่ความเข้มข้นต่างกันต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *C. gloeosporioides* Penz.

วางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) แบ่งออกเป็น 7 กรรมวิธี ๆ ละ 4 ซ้ำ คือ

กรรมวิธีที่ 1 Benomyl 750 ppm
กรรมวิธีที่ 2 น้ำกลั่นปลอดเชื้อ
กรรมวิธีที่ 3 ไคโตซาน ความเข้มข้น 0.1%
กรรมวิธีที่ 4 ไคโตซาน ความเข้มข้น 0.5%
กรรมวิธีที่ 5 ไคโตซาน ความเข้มข้น 1.0%
กรรมวิธีที่ 6 ไคโตซาน ความเข้มข้น 1.5%
กรรมวิธีที่ 7 ไคโตซาน ความเข้มข้น 2.0%

นำเชื้อรา *C. gloeosporioides* Penz. อายุ 7 วัน มาทดสอบด้วยวิธี Poisoned food technique โดยวางเชื้อราบนผิวอาหาร PDA ที่มีไคโตซานที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0% เปรียบเทียบกับชุดควบคุมคือ Benomly 750 ppm และน้ำกลั่นปลอดเชื้อ บันทึกการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* Penz. โดยการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี (เซนติเมตร) เป็นเวลา 7 วัน นำค่าที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การเจริญของเส้นใยและการยับยั้งการเจริญของเชื้อราจากสมการดังนี้

สมการการหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเส้นใยเชื้อรา

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเส้นใย} = \frac{(A-B) \times 100}{A}$$

สมการการหาเปอร์เซ็นต์การเจริญของเส้นใย

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเจริญของเชื้อรา} = \frac{\text{ค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลาง ชุดทดสอบ} \times 100}{\text{ค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลาง ชุดควบคุม}}$$

โดย A คือ ค่าเฉลี่ยของการเจริญเส้นใยในชุดควบคุม
B คือ ค่าเฉลี่ยของการเจริญเส้นใยในชุดทดสอบ
ชุดควบคุม = น้ำกลั่นปลอดเชื้อ
ชุดทดสอบ = ไคโตซานความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ Benomly 750 ppm

ผลและวิจารณ์

การใช้ไคโตซาความเข้มข้น 1.0, 1.5 และ 2.0% มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *C.gloeosporioides* Penz. ได้เท่ากับ 77, 79.40 และ 80.40% ส่วนไคโตซาน 0.1 และ 0.5% มีค่าการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเท่ากับ 7.40 และ 31.30% แตกต่างกับชุดควบคุมคือน้ำกลั่น มีค่าเท่ากับ 0.0 % ขณะที่ Benomyl 750 ppm สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้อย่างสมบูรณ์ มีค่าเท่ากับ 100% แตกต่างทางสถิติ (Figure 1.) ไคโตซานมีผลต่อการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรา เนื่องจากไคโตซานมีโครงสร้างเหมือนตาข่ายคล้อยฟองน้ำ มีช่องว่างเล็กๆ ทำให้ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ (Maqbool *et al*., 2010) ดังงานวิจัยของ สุดคะนึง (2546) ได้ทดสอบไคโตซานต่อการเจริญเติบโตทางเส้นใยของเชื้อรา *C. gloeosporioides* Penz. บนอาหาร PDA ที่ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 % มีค่าการยับยั้งเท่ากับ 41.63, 42.11, 48.81 และ 54.07% ตามลำดับ

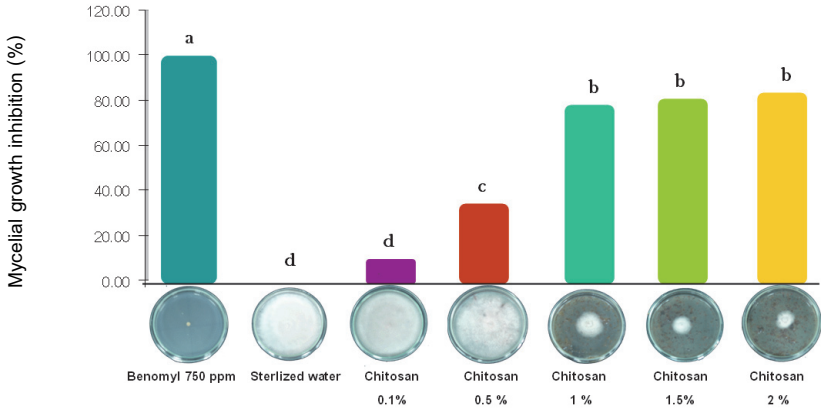

Figure 1. Effect of various concentrations of Chitosan on mycelial growth inhibition (%) of *C. gloeosporioides* Penz.

ส่วนการเจริญเติบโตของเส้นใยพบว่าในวันที่ 7 ของการใช้ไคโตซาความเข้มข้น 1.0, 1.5 และ 2.0% มีค่าเท่ากับ 40.60, 33.60 และ 31.90 % ส่วนไคโตซาน 0.1 และ 0.5% มีค่าการเจริญเติบโตของเส้นใยเท่ากันกับน้ำกลั่น (ชุดควบคุม) คือ 100 % ขณะที่ Benomyl 750 ppm ไม่พบการเจริญเติบโตของเส้นใย (Figure 2.) ไคโตซานนอกจากจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา ยังมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา

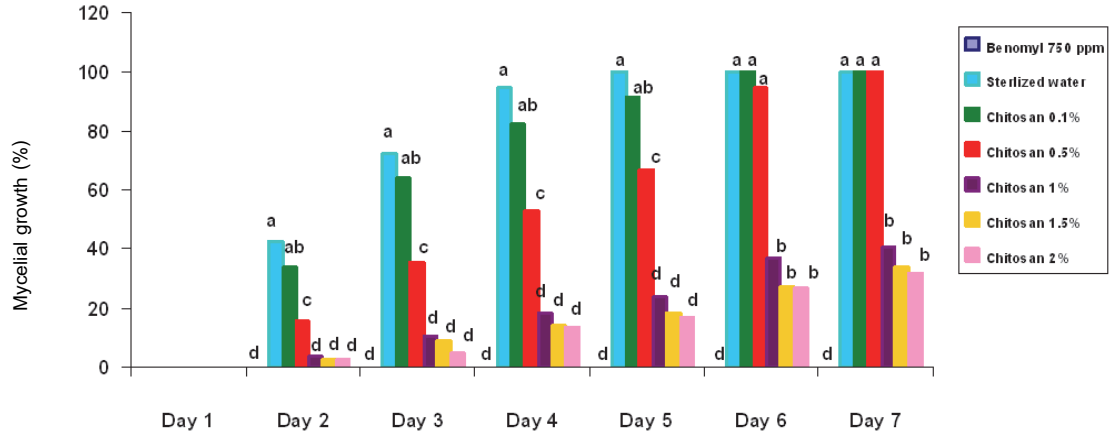

Figure 2. Effect of various concentrations of Chitosan on mycelial growth of *C. gloeosporioides* Penz.

สรุป

ระดับความเข้มข้นของไคโตซานมีผลต่อประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *C. gloeosporioides* Penz. คือไคโตซานที่ความเข้มข้นที่ 1.0, 1.5 และ 2.0 สามารถยังยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราได้ดี

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณภาควิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่สนับสนุนอุปกรณ์และเครื่องมือในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

สุดคะนึง พึ่มชัย. 2546. ผลของไคโตซานต่อการชักนำความต้านทานและการควบคุมโรคแอนแทรคโนสในมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี. 105 น.

ศิริรัตน์ ตรีกาญจนวัฒนา. 2549. การคัดเลือกและศักยภาพของจุลินทรีย์ผิวพืชในการต่อต้านการเข้าทำลายโดยรา *Colletotrichum gloeosporioides* บนมะม่วงหลังการเก็บเกี่ยว. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. กรุงเทพฯ:มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 95 น.

Bautista-Bãos, S., M. Hernández-López, E. Bosquez-Molina and C.L. Wilson. 2003. Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit. Crop Protection. J. 22: 1087-1092.

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