Agricultural Sci. J. 39 : 3 (Suppl.) : 43-46 (2008) ว. วิทย. กษ. 39 : 3 (พิเศษ) : 43-46 (2551)

การใช้ Mango-Leaf Assay ในการประเมินศักยภาพของ *Bacillus megaterium* สายพันธุ์ 3103 ในการเป็นศัตรูธรรมชาติต่อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคหลังเก็บเกี่ยวของมะม่วง

Benefit of Mango-Leaf Assay on the Assessment of Antagonistic Spectrum of the *Bacillus megaterium* Isoate 3103 upon Diversity of Postharvest Pathogen, *Colletotrichum gloeosporioides*

อุดม ฟ้ารุ่งสาง[1,5] นวลวรรณ ฟ้ารุ่งสาง[2] ลพ ภวภูตานนท์[3] ชัยณรงค์ รัตนกรีฑากุล[1] และ เจริญ ขุนพรม[4,5]

Udom Farungsang[1,5], Nuanwan Farungsang[2], Lop Phavaphutanon[3], Chainarong Rattanakreetakul[1] and Charoen Kunprom[4,5]

Abstract

In the experiments determining antagonistic spectrum of the selected *Bacillus megaterium* isolate 3103 upon diversity of *Colletotrichum gloeosporioides*, we proposed the mango-leaf assay to accomplish the fungal infection with disease development. Fresh immature leaves with light green colour of Nam-dok-mai mango were the most suitable stage for the assay. Soon after the leaves were detached from their canopies, they were rinsed, surface sterilized and blotted. Drops of *C. gloeosporioides*-spore involved suspension were placed on the upper side of the leaves at the pre-marked target sites. The inoculated leaves were incubated for fungal development at 26-28°C in humid condition. For this time, *B. megaterium* isolate 3103 was tested upon 14 *C. gloeosporioides* isolates. The assay served well in our experiments and also benefited an evaluation of pathogenicity of the tested fungus isolates as well. *B. megaterium* isolate 3103 was proved as an aggressive antagonist towards *C. gloeosporioides* demonstrated with the average lesion size reduction from 5.12 mm on non-protected to 0.79 mm on protected treatments.

Keywords: Anthracnose, Mango, Postharvest disease, *Colletotrichum gloeosporioides*

บทคัดย่อ

ในการประเมินศักยภาพของ *Bacillus magaterium* ที่คัดเลือกแล้ว (สายพันธุ์ 3103) ในการเป็นศัตรูธรรมชาติต่อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ที่รวบรวมจากแหล่งต่างๆ จำนวน 14 สายพันธุ์ โดยการปลูกเชื้อแบบไม่ทำแผลในห้องปฏิบัติการ ด้วย spore suspension ของราร่วมกับ cell culture ของ *B. magaterium* ลงบนใบมะม่วงอ่อนพันธุ์น้ำดอกไม้ระยะหลังของการเปลี่ยนสี (mango-leaf assay) *B. Magaterium* สายพันธุ์ 3103 สามารถทำให้ขนาดเฉลี่ยของแผลลดลงได้อย่างมีนัยสำคัญ จาก 5.12 มิลลิเมตร เป็น 0.79 มิลลิเมตร แสดงให้เห็นว่า mango-leaf assay สามารถใช้ทดสอบประสิทธิภาพการเป็น antagonist ได้ และ *B. Magaterium* สายพันธุ์ 3103 มีศักยภาพในการเป็น antagonist ต่อรา *C. gloeosporioides* สูงมาก ในการวิจัยครั้งนี้ นอกเหนือไปจากการทดลองหลักแล้ว ในการวิเคราะห์ผลการทดลองยังสามารถแสดงให้เห็นความแตกต่างด้านความสามารถในการก่อให้เกิดโรคของรา *C. gloeosporioides* ที่นำมาทดสอบด้วย

คำสำคัญ: แอนแทรคโนส มะม่วง โรคหลังเก็บเกี่ยว *Colletotrichum gloeosporioides*

คำนำ

การควบคุมโรคโดยชีววิธีเป็นแนวทางหนึ่งที่จำเป็นต้องมีการค้นคว้า เพื่อนำมาใช้ลดหรือหลีกเลี่ยงข้อปฏิเสธสินค้าเกษตรของไทยในตลาดการค้าโลกที่ให้ความสำคัญด้านการปนเปื้อนโดยเชื้อโรคพืชและสารเคมี การคัดเลือกจุลินทรีย์ทรงพุ่มที่มีคุณลักษณะเป็นศัตรูของรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงหลังการเก็บเกี่ยว โดย

[1] ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140
[1] Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture at Kamphaengsaen, Kasetsart University, Nakhon pathom
[2] ฝ่ายปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง สถาบันวิจัยและพัฒนา กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140
[2] Central Laboratory and Greenhouse Complex, Research and development Institute at Kamphaengsaen, Kasetsart University, Nakhon pathom
[3] ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140
[3] Department of Horticulture, Faculty of Agriculture at Kamphaengsaen, Kasetsart University, Nakhon pathom
[4] ศูนย์เทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว สถาบันวิจัยและพัฒนา กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140
[4] Postharvest Techonology Center, Research and development Institute at Kamphaengsaen, Kasetsart University, Nakhon pathom
[5] ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140
[5] Postharvest Technology Innovation Center, Kasetsart University, Nakhon pathom

การทดสอบจุลินทรีย์บนผลมะม่วงโดยตรง นอกจากสิ้นเปลืองเวลา พื้นที่ และค่าใช้จ่ายแล้ว ฤดูกาลของผลไม้ยังเป็นปัจจัยจำกัดด้านเวลาสำหรับการดำเนินการทดลอง (Coates et al., 1998; Farungsang et al., 1998; Polashock et al., 2006) mango-leaf assay ที่นำเสนอนี้ นอกจากจะให้ผลดีในการทดสอบประสิทธิภาพการเป็นศัตรูธรรมชาติของ *Bacillus megaterium* สายพันธุ์ 3103 ต่อรา *C. gloeosporioides* ยังแสดงให้เห็นความผันแปรด้านความสามารถในการก่อให้เกิดโรคของรา *C. gloeosporioides* ที่เก็บรวบรวมจากแหล่งต่างๆ นอกจากนี้ การใช้ mango-leaf assay ทำให้ไม่ต้องเผชิญกับปัญหาที่เกี่ยวเนื่องกับการทำงานวิจัยโดยใช้ผลมะม่วง

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมใบมะม่วง : ใช้ใบสดของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ระยะใบอ่อนที่เป็นสีเขียว และเก็บจากต้นใหม่ๆ ล้างใบด้วยน้ำไหลเบาๆ จากนั้นแช่ใบในสารละลาย sodium hypochlorite 1% และเขย่าตามแนวระนาบด้วย shaker เป็นเวลาประมาณ 4-5 นาที ล้างด้วยน้ำที่ฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง ซับด้วยกระดาษซับที่ฆ่าเชื้อแล้ว และทำเครื่องหมายบริเวณที่ต้องการปลูกเชื้อบนใบให้ชัดเจน

ผลของตำแหน่งบนใบต่อการเข้าทำลายโดยรา *Colletotrichum gloeosporioides* : เตรียม spore suspension ของรา *C. gloeosporioides* ด้วย GYPB (glucose, yeast extract, peptone, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ และ KH_2PO_4 10, 0.5, 2, 0.5 และ 0.5 กรัม/ลิตร, ตามลำดับ) ให้มีความหนาแน่น $1x10^6$ spores/มิลลิลิตร กำหนดบริเวณหลักบนใบมะม่วงเป็นส่วนปลายและส่วนโคนใบ ทำการทดสอบบนด้านใดด้านหนึ่งของใบโดยใช้เส้นกลางใบเป็นหลัก กำหนดตำแหน่งทดสอบโดยการทำเครื่องหมายบนส่วนปลายใบ 4 ตำแหน่ง และส่วนโคนใบ 4 ตำแหน่ง เรียงตามแนวยาวของใบ ให้ห่างกันประมาณ 2 เซนติเมตร (ภาพที่ 1) หยด spore suspension ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงบนแต่ละตำแหน่งที่กำหนดไว้บนใบใบมะม่วง วางใบมะม่วงลงในภาชนะสะอาดที่สามารถเก็บกักความชื้นได้ และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 26-28°C ราแต่ละสายพันธุ์ใช้ใบมะม่วงในการทดสอบ 10 ใบ บันทึกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของแผล หลังการหยด spore suspension เป็นเวลา 3 และ 6 วัน

การทดสอบศักยภาพของศัตรูธรรมชาติ *Bacillus megaterium* สายพันธุ์ 3103 ต่อความหลากหลายทางชีวภาพของรา *Colletotrichum gloeosporioides* : เลี้ยง *B. megaterium* สายพันธุ์ 3103 (ศิริรัตน์ และคณะ, 2549; Farungsang *et al*., 2005) ในสภาพ aerobic โดยการเขย่า นาน 15-20 ชั่วโมง ในอาหาร GYPB เตรียม spore suspension ของรา *C. gloeosporioides* ด้วย GYPB ให้ได้ความหนาแน่นของ spore ประมาณ $2x10^6$ spores/มิลลิลิตร ผสม cell culture ของ *B. megaterium* กับ spore suspension ของรา *C. gloeosporioides* อัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร หยดส่วนผสม spore suspension และ cell culture ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงบนตำแหน่งของใบที่เตรียมไว้ และหยด spore suspension ของรา *C. gloeosporioides* ที่ผสมกับ GYPB อัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร เป็น positive control treatment ทำการทดลอง treatment ละ 10 ใบ โดยมีน้ำที่ฆ่าเชื้อแล้ว GYPB และ cell suspension ของ *B. megaterium* เป็น negative control treatment เก็บใบที่ทำการทดลองในสภาพชื้น อุณหภูมิ 26-28°C บันทึกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของแผลหลังการหยด suspension เป็นเวลา 3 และ 6 วัน

ผล

ตำแหน่งบนใบไม่มีผลต่อขนาดของแผลที่เกิดจากราสายพันธุ์เดียวกัน โดยหลังการปลูกเชื้อ 6 วัน แผลด้านปลายใบและโคนใบมีขนาดเฉลี่ย 10.77 และ 10.53 มิลลิเมตร ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ (Table 1, Fig 1) ในการทดสอบ

Table 1 Area located on the leaf affecting the consistency of mango-leaf assay

Tested CG	Average Lesion Diameter after Inoculation (mm)			
	3 Days		6 Days	
	Diftal Half	Basal Half	Diftal Half	Basal Half
405	1.38	1.29	5.00	5.92
426	3.63	3.38	13.95	15.67
788	3.17	3.67	13.38	10.00
Average	2.727[a]	2.78[a]	10.777[b]	10.53[b]

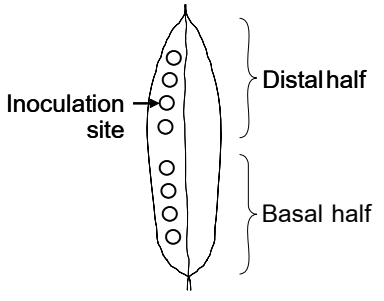

Fig 1 Pre-marked target sites on the leaf

โดย mango-leaf assay *B. megaterium* สายพันธุ์ 3103 มีคุณลักษณะเป็นศัตรูธรรมชาติที่ดี สามารถลดความรุนแรงของการเข้าทำลายโดย *C. gloeosporioides* ทั้ง 14 สายพันธุ์ แสดงให้เห็นอย่างเด่นชัดในวันที่ 6 ของการทดลอง ด้วยขนาดเฉลี่ยของแผลที่ลดลงจาก 5.12 มิลลิเมตร เป็น 0.79 มิลลิเมตร (Table 2, Fig 2)

Table 2 Determination on antagonistic potential of *Bacillus megaterium* (BM) isolate 3103 against biodiversity of *Colletotrichum gloeosporioides* (CG)

Tested CG	Average Lesion Diameter After Inoculation (mm)[1]				Source of the Tested CG
	3 Days		6 Days		
	Protective	Non-Protective	Protective	Non-Protective	
370	0.38	1.00	0.63	2.88	Fruit, Namdokmai / Chachoengsao[2]
405	0.58	1.34	0.79	4.95	Fruit, Mahachanaka / Lamphun
413	0.35	1.98	0.83	8.95	Fruit, Namdokmai-seetong / Nan
421	1.00	1.85	2.23	3.98	Leaf, Namdokmai / Chonburi
426	0.56	3.51	0.77	12.83	Fruit, Okrong / Ratchaburi
428	0.40	0.75	0.55	1.88	Fruit, Namdokmai / Ratchaburi
437	0.13	0.55	0.15	2.55	Fruit, Farlan / Samutsakhon
440	0.33	1.30	1.25	4.50	Fruit, Namdokmai-seetong / Uthaithani
441	0.25	1.00	0.63	4.38	Fruit, Namdokmai-seetong / Uthaithani
446	0.33	1.38	0.75	5.75	Fruit, Okrong / Nakhonpathom
448	0.23	0.78	0.68	4.15	Fruit, Okrong / Nakhonpathom
459	0.05	0.13	0.10	0.45	Fruit, Mahachanaka / Prachuapkhirikhan
732	0.38	1.40	1.03	4.13	Fruit, Namdokmai / Samutsakhon[2]
788	0.53	3.42	0.63	10.35	Leaf, Namdokmai / Nakhonpathom
Average	0.39[a]	1.46[b]	0.79[A]	5.12[B]	

[1] Average lesion diameters on the leaves inoculated with sterilized water, GYPB and *B. megaterium* isolate 3103 were 0, 0.09 and 01.8 mm, and 0, 0.15 and 0.21 mm at 3 and 6 days after inoculation, respectively.

[2] proved as benomyl resistant isolate

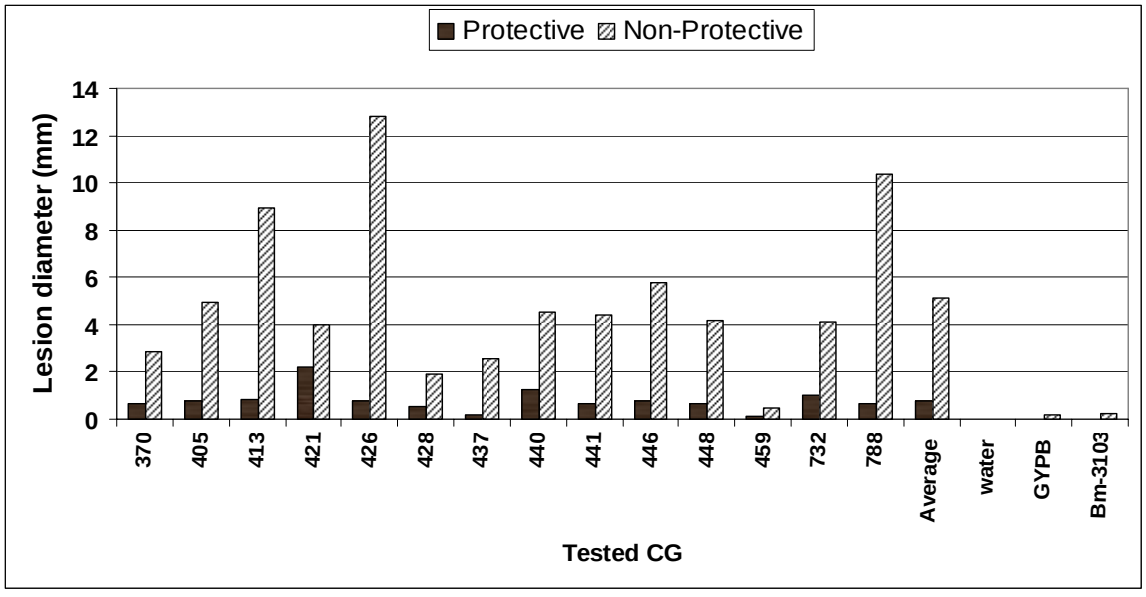

Fig 2 Antagonistic spectrum of *Bacillus megaterium* isolate 3103 towards various isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* determined through mango-leaf assay, 6 days after inoculation.

วิจารณ์ผล

ตำแหน่งบนใบ (ด้านปลาย และด้านโคนใบ) ไม่มีผลต่อการเข้าทำลายโดยรา *C. gloeosporioides* แสดงให้เห็นจากขนาดเฉลี่ยของแผลที่เกิดจากราสายพันธุ์เดียวกันบนทั้งสองตำแหน่งของใบไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (Table 1, Fig 1) mango-leaf assay มีประสิทธิภาพสูงในการทดสอบศักยภาพการเป็นศัตรูธรรมชาติของ *B. megaterium* สายพันธุ์ 3103 ต่อรา *C. gloeosporioides* ที่เก็บรวบรวมจากแหล่งต่างๆกัน รวมทั้งยังเป็นแนวทางในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสที่เกิดจากรา *C. gloeosporioides* ที่ต้านทานสารเคมี (Table 2, Fig 2) ในการทดลองเดียวกันนี้ยังแสดงให้เห็นความหลากหลายทางชีวภาพด้านความสามารถในการก่อให้เกิดโรคของรา *C. gloeosporioides* ที่ปรากฏในธรรมชาติ (Fig 2) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าวิธีการนี้สามารถใช้ประโยชน์ในการศึกษาความสามารถในการก่อให้เกิดโรคของรา *C. gloeosporioides* ได้อย่างมีประสิทธิภาพด้วย วิธีการนี้ลดปัญหาทุกประการที่เกี่ยวข้องกับการใช้ผลมะม่วงในการวิจัย นอกจากนี้ยังลดขั้นตอนการปฏิบัติงานลงมากเมื่อเทียบกับ leaf disk assay ที่ได้เคยรายงานไว้ และน่ามีความเที่ยงตรงสูงกว่าเนื่องจากการใช้ใบมะม่วงสดในการทดสอบเป็นสภาพแวดล้อมที่ใกล้เคียงกับขบวนการเข้าทำลายพืชที่เกิดขึ้นในธรรมชาติ เมื่อเทียบกับ leaf disk ที่จำเป็นต้องทำการลวก leaf disk ในน้ำเดือดเป็นเวลา 30 วินาทีเพื่อยับยั้งขบวนการเสื่อมสภาพของเนื้อเยื่อ (tissue senescence) ก่อนทำการทดสอบ (ศิริรัตน์ และคณะ, 2549; Coates *et al*., 1998; Farungsang *et al*., 1998a,b)

การใช้รา *C. gloeosporioides* จำนวนมากถึง 14 สายพันธุ์ที่ได้จากแหล่งที่มาหลากหลาย และในตำแหน่งการปลูกเชื้อที่มี *B. megaterium* สายพันธุ์ 3103 (protective treatment) ขนาดของแผลที่เกิดจากการเข้าทำลายโดยราลดลงหลายเท่าเมื่อเทียบกับตำแหน่งการปลูกเชื้อที่ไม่มี *B. megaterium* สายพันธุ์ 3103 (non-protective treatment) แสดงถึงการเป็น antagonist ที่มีประสิทธิภาพกว้าง (broad spectrum) ในการต่อต้านรา *C. gloeosporioides* ของ *B. megaterium* สายพันธุ์ 3103

สรุป

mango-leaf assay มีประสิทธิภาพในการทดสอบศักยภาพของ *B. megaterium* สายพันธุ์ 3103 ต่อรา *C. gloeosporioides* ที่มีความผันแปรสูงในธรรมชาติ ซึ่งแสดงให้เห็นในรูปแบบความแตกต่างด้านความรุนแรงในการเข้าทำลายใบมะม่วงในการวิจัยครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่าวิธีนี้สามารถใช้ในการศึกษาความสามารถในการก่อให้เกิดโรคของรา *C. gloeosporioides* ได้ด้วย *B. megaterium* สายพันธุ์ 3103 สามารถลดความรุนแรงของการเข้าทำลายโดยรา *C. gloeosporioides* ทุกสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบ แสดงให้เห็นว่า *B. megaterium* สายพันธุ์ 3103 มีศักยภาพสูงมากในการลดการเข้าทำลายโดยรา *C. gloeosporioides*

เอกสารอ้างอิง

ศิริรัตน์ ตรีกาญจนวัฒนา, นวลวรรณ ฟ้ารุ่งสาง, ชลิดา เล็กสมบูรณ์ และ อุดม ฟ้ารุ่งสาง. 2549. การลดความเสียหายที่เกิดจากโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงโดยจุลินทรีย์ที่แยกได้จากทรงพุ่ม. Agricultural Sci.J. 37(2) (Suppl):90-93.

Coate, L.M., R.D. Davis, A.W. Cooke, K.T. Cannon, J.R. Dean and A. van der Kruyssen. 1998. Biological control of anthracnose in tropical fruit. International Workshop on Disease Control and Storage Life Extension. May 22-23, 1997. Chiang Mai, Thailand. pp. 101-107.

Farungsang, N., U. Farungsang, and S. Sangchote. 1998a. Biological control of postharvest fruit rot (*Greeneria* sp.) in rambutan with phylloplane yeasts. International Workshop on Disease Control and Storage Life Extension. May 22-23, 1997. Chiang Mai, Thailand. pp.113-119.

Farungsang, N., U. Farungsang and S. Sangchote. 1998b. Factors affecting the consistency of leaf disk assay. International Workshop on Disease Control and Storage Life Extension. May 22-23, 1997. Chiang Mai, Thailand. pp.131-136.

Farungsang, N., S. Trikanchanawatana and U. Farungsang. 2005. Phylloplane antagonists, potential for the control of anthracnose disease infection on mango. In 15th Biennial Australasian Plant Pathology Society Conference, Sep 26-29, 2005. Deakin University, Waterfront Campus, Geelong, Victoria, Australia. p. 118.

Polashock, J.J., M.K. Ehlenfeldt, A.W. Stretch and M. Kramer. 2006. Leaf disk infection by *Colletotrichum acutatum* and its relation to fruit rot in diverse blueberry germplasm. Plant Disease. 41:270-271.