Agricultural Sci. J. 42 : 1 (Suppl.) : 209-212 (2011) ว. วิทย. กษ. 42 : 1 (พิเศษ) : 209-212 (2554)

ผลของการใช้ *Bacillus megaterium* isolate 3103 ในสภาพแปลงต่อการปรากฏของโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วงภายหลังการเก็บเกี่ยว

Impact of Preharvest Application of *Bacillus megaterium* Isolate 3103 on Postharvest Incidence of Mango Fruit Anthracnose

ศันสนีย์ ศิลปสุนทร[1,4], **นวลวรรณ ฟ้ารุ่งสาง**[2], **ชัยณรงค์ รัตนกรีฑากุล**[1], **เจริญ ขุนพรม**[3] **และ อุดม ฟ้ารุ่งสาง**[1,4]
Sansanee Sinlapasunthorn[1,4], Nuanwan Farungsang[2], Chainarong Rattanakreetakul[1], Charoen Kunprom[3] and Udom Farungsang [1,4]

Abstract

Anthracnose is one of the serious postharvest diseases resulted from the typical quiescent phase of infection occurred in the field by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Bacillus megaterium* isolate 3103 (BM-3103) was the most outstanding among a large number of phylloplane bacterial flora tested in laboratory for its antagonistic potential towards *C. gloeosporioides*. Field application of BM-3103 was performed in order to determine the protective efficacy against field infection occurred by *C. gloeosporioides* under commercial field practice. MB-3103 cell culture, 15-20 hrs in GYPB, formulated 1:1 v/v with GYPB was applied to mango canopies every 14-day interval from the flowering stage until harvest. Mature green mangoes harvested from the treated canopies were kept in humid conditions at ambient temperature. Recording of anthracnose disease development was kept on for 9 days when the fruit was 20% ripening. Promising efficacy of BM-3103 was demonstrated by the noticeable reduction in disease severity of 25.51 and 11.86% assessing in terms of diseased area on the fruits surface and total diseased fruit, respectively.
Keywords: postharvest disease, Colletotrichum gloeosporioides, Bacillus megaterium

บทคัดย่อ

แอนแทรคโนสเป็นโรคภายหลังเก็บเกี่ยวที่สำคัญที่เป็นผลของการเข้าทำลายโดยไม่ปรากฏอาการของโรคที่เกิดขึ้นในสภาพแปลงโดยรา *Colletotrichum gloeosporioides* การทดสอบในห้องปฏิบัติการ *Bacillus megaterium* isolate 3103 (BM-3103) มีความเด่นกว่าแบคทีเรียอื่นๆที่แยกได้จากทรงพุ่มด้านศักยภาพการเป็นศัตรูธรรมชาติของรา *C. gloeosporioides* งานวิจัยนี้รายงานประสิทธิภาพของ BM-3103 ในการลดการเข้าทำลายโดยรา *C. gloeosporioides* เมื่อนำไปใช้ในสภาพแปลงของเกษตรกร BM-3103 ที่พ่นให้แก่ทรงพุ่มต้นมะม่วงได้จาก cell culture ของ BM-3103 อายุ 15-20 ชั่วโมงที่เลี้ยงในอาหาร GYPB ผสมกับ อาหาร GYPB อัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร ทำการพ่นทุก 14 วันตั้งแต่ดอกเริ่มบานจนถึงเก็บเกี่ยว เก็บรักษาผลมะม่วงแก่ที่เก็บเกี่ยวจากต้นมะม่วงที่ทำการทดลองในสภาพชื้นและอุณหภูมิของห้องปฏิบัติการ บันทึกการพัฒนาของโรคแอนแทรคโนสตั้งแต่ผลมีการสุก 20% ต่อเนื่องเป็นเวลา 9 วัน ประสิทธิภาพของ BM-3103 แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนด้วยความรุนแรงของโรคที่ลดลง 25.51 และ 11.86% เมื่อประเมินโดยใช้พื้นที่ผิวของผลที่ปรากฏอาการของโรคและจำนวนผลที่เป็นโรคแอนแทรคโนส ตามลำดับ
คำสำคัญ: โรคพืชหลังเก็บเกี่ยว, Colletotrichum gloeosporioides, Bacillus megaterium

คำนำ

แอนแทรคโนสเป็นโรคภายหลังการเก็บเกี่ยวที่เป็นผลของการเข้าทำลายในสภาพแปลงโดยรา *Colletotrichum gloeosporioides* ซึ่งเชื้อโรคสามารถมีชีวิตอยู่ภายในผลไม้โดยไม่ทำให้เกิดอาการของโรคจนกว่าผลไม้เริ่มสุก ขั้นตอนการ

[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] ศูนย์เทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว สถาบันวิจัยและพัฒนา กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140
[3] Postharvest Technology Center, Research and development Institute at Kamphaengsaen, Kasetsart University, Nakhon Pathom
[4] ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140
[4] Postharvest Technology Innovation Center, Kasetsart University, Nakhon Pathom

ควบคุมโรคที่มีการปฏิบัติกับผลิตผลที่เก็บเกี่ยวมาแล้วไม่สามารถควบคุมการพัฒนาของราซึ่งตั้งรกรากอยู่ภายใต้ผิวของผลไม้ การควบคุมโรคที่น่าจะให้ผลดีจึงควรเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นในสภาพแปลงเพื่อป้องกันการเข้าทำลายโดยเชื้อโรค (Bailey *et al*., 1992; Smilanick *et al*., 1993; Ippolito and Nigro, 2000) การตื่นตัวด้านสุขอนามัยและสิ่งแวดล้อมยังผลในการปฏิเสธการควบคุมโรคพืชด้วยสารเคมี การควบคุมโรคโดยชีววิธีเป็นแนวทางหนึ่งที่ได้รับการยอมรับเพื่อทดแทนการใช้สารเคมี *Bacillus megaterium* เป็นจุลินทรีย์ที่พบทั่วไปในดิน และได้รับการพิจารณาว่าไม่เป็นจุลินทรีย์สาเหตุของโรค (Biohazard level 1) (Office of Health and Safety, 1998) สำหรับ isolate 3103 (BM-3103) เป็น *B. megaterium* ที่คณะผู้วิจัยคัดเลือกได้จากทรงพุ่มที่มีความเด่นกว่าจุลินทรีย์อื่นๆในกลุ่มเดียวกันในด้านคุณลักษณะเป็นศัตรูของรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงหลังการเก็บเกี่ยว ทั้งทางด้านประสิทธิภาพการต่อต้านกระบวนการเข้าทำลายและศักยภาพในการต่อต้านราได้หลาย isolate (*ศิริรัตน์ และคณะ*, 2549; Farungsang *et al*., 2005, 2008) งานวิจัยนี้รายงานผลการนำ BM-3103 ไปใช้ในสภาพแปลงของเกษตรกรในการลดความเสียหายของผลมะม่วงภายหลังการเก็บเกี่ยวที่เกิดจากโรคแอนแทรคโนส เพื่อประเมินประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ศัตรูธรรมชาติ (antagonist) เมื่อเผชิญกับสภาพแปลง

อุปกรณ์และวิธีการ

การเพิ่มปริมาณ *Bacillus megaterium* isolate 3103 (BM-3103): BM-3103 ที่ใช้ทดลองได้จาก BM-3103 ที่เก็บรักษาโดยวิธี under water preservation ที่อุณหภูมิ 15 °C เพิ่มปริมาณโดยการเลี้ยง BM-3103 ในอาหาร GYPB (glucose 10, yeast extract 0.5, peptone 2, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 และ KH_2PO_4 0.5 กรัม/ลิตร, ตามลำดับ) และเขย่าตามแนวระนาบด้วย shaker เป็นเวลา 15-20 ชั่วโมง

การนำ BM-3103 ไปใส่ให้แก่ทรงพุ่มของต้นมะม่วง: ผสม cell suspension กับ GYPB อัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร ทำการพ่นด้วยเครื่องพ่นแบบอัดอากาศ (air-pressured sprayer) โดยเน้นช่อดอกและผลอ่อน โดยทำการทดลองเปรียบเทียบกับอีก 2 การทดลอง คือการพ่นด้วยน้ำ และ GYPB ใช้ต้นมะม่วงการทดลองละ 10 ต้น (10 ซ้ำ) วางแผนการทดลองแบบ CRD และวิเคราะห์ผลการทดลองโดยใช้โปรแกรม R

สถานที่และต้นมะม่วงที่ใช้ในการทดลอง: ใช้พื้นที่สวนของเกษตรกร อ. สามโก้ จ. อ่างทอง ต้นมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้สีทองอายุประมาณ 2-3 ปี ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางทรงพุ่มประมาณ 1-2 เมตร สูงประมาณ1.5 เมตร ปลูกแบบยกร่องและมีน้ำตามแนวร่อง ทำการฉีดพ่นตั้งแต่เริ่มออกดอกจนถึงเก็บเกี่ยว (27 มกราคม – 2 เมษายน 2552) รวมการฉีดพ่นทั้งหมด 4 ครั้ง

การประเมินประสิทธิภาพของ BM-3103: เก็บเกี่ยวผลมะม่วงแก่ โดยแยกตามทรีทเมนต์ และไม่ให้ผลสัมผัสพื้นดิน นำมาเก็บรักษาในสภาพชื้นและอุณหภูมิ ในห้องปฏิบัติการ (100% RH และ 30°C) บันทึกการพัฒนาของโรคโดยการบันทึกพื้นที่ผิวของผลที่ปรากฏอาการของโรคและจำนวนผลที่เป็นโรคแอนแทรคโนสเมื่อผลสุก 20%

ผล

การปรากฏของโรคแอนแทรคโนสเริ่มต้นเมื่อผลสุก 20% การพัฒนาของโรคบนผลที่เก็บจากทรงพุ่มที่พ่นด้วยน้ำเริ่มต้นช้ากว่าเล็กน้อยแต่มีอัตราการพัฒนาสูงกว่าเห็นได้ชัดเจนในวันที่ 5 และ 6 หลังจากเริ่มบันทึกผลเมื่อเทียบกับการพัฒนาของโรคบนผลที่เก็บเกี่ยวจากทรงพุ่มที่พ่นด้วย BM-3103 และ GYPB ตามลำดับ (Fig 1) ค่าเฉลี่ยของพื้นที่ผิวของผลที่ปรากฏอาการของโรคแอนแทรคโนสในวันที่ 7 ของการเก็บรักษาคือ 59.29, 53.02, และ 39.47% และเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (9 วัน) คือ 75.75, 69.57, และ 50.24% ในการทดลองที่พ่นด้วยน้ำ, GYPB, และ BM-3103 ตามลำดับ (Table 1) ผลที่เป็นโรคในการทดลองที่พ่นด้วย BM-3103 มีจำนวนน้อยกว่าการทดลองอื่นอย่างชัดเจนตลอดการเก็บรักษา (Fig 2) จำนวนผลที่ปรากฏอาการของโรคในวันที่ 7 ของการเก็บรักษาคือ 92.31, 94.44, และ 78.85% ในการทดลองที่พ่นด้วยน้ำ, GYPB, และ BM-3103 ตามลำดับ (Table 2) และเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (9 วัน) ผลมะม่วงที่เก็บเกี่ยวจากการทดลองที่พ่นด้วยน้ำและ GYPB เป็นโรคทั้งหมด ขณะที่ในการทดลองที่พ่นด้วย BM-3103 มีผลที่เป็นโรค 88.14% (Table 2, Fig 2)

วิจารณ์ผล

การพ่น BM-3103 ให้แก่ทรงพุ่มมะม่วงทุก 2 สัปดาห์ ตั้งแต่เริ่มออกดอกจนกระทั่งถึงเวลาเก็บเกี่ยวมีผลทำให้ความรุนแรงของโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วงระหว่างการเก็บรักษาลดลงอย่างมีนัยสำคัญ คือ 19.98% (จาก 59.29 เหลือ 39.47%) และ 25.51% (จาก 75.75 เหลือ 50.24%) หลังจากเก็บรักษาเป็นเวลา 7 วัน และ 9 วัน (สิ้นสุดการทดลอง) ตามลำดับ โดยความรุนแรงของโรคภายหลังการเก็บเกี่ยวในการทดลองที่ไม่มีการพ่น BM-3103 เพิ่มขึ้นอย่างรุนแรงเมื่อเทียบ

กับการทดลองที่มีการพ่น BM-3103 ซึ่งความรุนแรงของโรคเพิ่มขึ้นอย่างสม่ำเสมอหลังจากวันที่ 4 ของการเก็บรักษา (Fig. 1) จำนวนผลที่ปรากฏอาการของโรคลดลงประมาณ 13. 46% (จาก 92.31 เหลือ 78.8%) และ 11.86% (จาก 100 เหลือ 88.14%) หลังจากเก็บรักษาเป็นเวลา 7 วัน และ 9 วัน (สิ้นสุดการทดลอง) ตามลำดับ (Table 2, Fig. 2) แสดงให้เห็นว่า BM-3103 สามารถลดการเข้าทำลายโดยราสาเหตุของโรคในสภาพแปลงได้ อย่างไรก็ตาม ความรุนแรงของโรคที่บันทึกในงานวิจัยครั้งนี้อาจได้รับผลกระทบจากความชื้น และอุณภูมิสูงในสภาพแวดล้อมการเก็บรักษา

Table 1 Impact of preharvest application of BM-3103 on incidence of anthracnose on harvested mangoes assessed in terms of diseased area on the fruit surface

Applied medium	Diseased area (% on the fruit surface)*								
	1 day	2 days	3 days	4 days	5 days	6 days	7 days	8 days	9 days
Water	0.69	6.85	13.92	23.77	33.67	47.73	59.29b	64.53	75.75b
GYPB	3.24	8.98	17.78	27.78	38.08	42.60	53.02b	64.33	69.57b
BM-3103	1.54	8.56	14.57	23.51	29.35	34.58	39.47a	47.55	50.24a

* Data recording was started when fruit was 20% ripening

Means in the same column with different letters are significantly different (p≤0.05) by DMRT

Table 2 Impact of preharvest application of BM-3103 on incidence of anthracnose on harvested mangoes assessed in terms of diseased fruit

Applied medium	Total diseased fruit percentage*								
	1 day	2 days	3 days	4 days	5 days	6 days	7 days	8 days	9 days
Water	3.08	29.23	41.54	61.54	76.92	83.08	92.31b	97.14	100b
GYPB	12.96	31.48	50.00	68.52	81.48	87.04	94.44b	100	100b
BM-3103	6.73	24.04	32.69	47.12	59.62	65.38	78.85a	84.75	88.14a

* Data recording was started when fruit was 20% ripening

Means in the same column with different letters are significantly different (p≤0.05) by DMRT

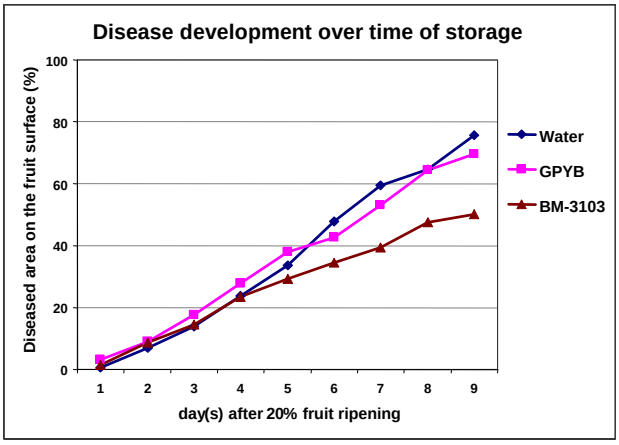

Fig. 1 Impact of preharvest application of BM-3103 on the incidence of anthracnose disease on harvested mangoes assessed in terms of diseased area on the fruit surface

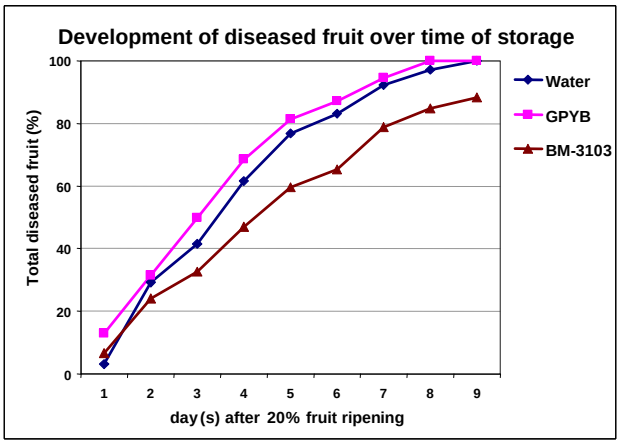

Fig. 2 Impact of preharvest application of BM-3103 on the incidence of anthracnose disease on harvested mangoes assessed in terms of total diseased fruit

ประสิทธิภาพของ BM-3103 ในการลดการเข้าทำลายโดยราที่เป็นสาเหตุของโรคแอนแทรคโนส (*Colletotrichum gloeosporioides*) ในสภาพแปลงขึ้นอยู่กับปัจจัยที่มีผลต่อการปรากฏของประชากรและกิจกรรมของ BM-3103 โดยเฉพาะอย่างยิ่งการมีธาตุอาหารต่ำ รังสี UV อุณหภูมิสูง และความแห้ง (Ippolito and Nigro, 2000) ในสถานการณ์ที่ประชากรของ BM-3103 ไม่สามารถครอบครองพื้นที่หรือไม่สามารถดำเนินกิจกรรมบนผิวของผลได้ย่อมเป็นการเปิดโอกาสให้การเข้าทำลาย

โดยเชื้อโรค จากการประเมินการเปลี่ยนแปลงของระดับประชากรของ BM-3103 หลังการฉีดพ่นให้แก่ทรงพุ่ม พบว่าการอยู่รอดในช่วงแรกของจุลินทรีย์ศัตรูธรรมชาติ (antagonist) เป็นปัจจัยที่มีนัยสำคัญอย่างยิ่งต่อการตั้งรกราก (งานวิจัยอยู่ระหว่างดำเนินการ) ซึ่งต่อเนื่องถึงการครอบครองพื้นที่ทรงพุ่มของจุลินทรีย์ศัตรูธรรมชาติ เช่นเดียวกับที่นักวิจัยที่ปฏิบัติงานด้านนี้ได้ให้ข้อวิจารณ์สาเหตุของความไม่ประสบความสำเร็จในกรณีของผลผลิตงานวิจัยที่ได้รับการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ชีวมวลแล้ว (Ippolito and Nigro, 2000)

การพ่นธาตุอาหาร (GYPB) มีผลทำให้ความรุนแรงของโรคระหว่างการเก็บรักษาลดลงเล็กน้อย จาก 75.75 เหลือ 69.57% (ลดลง 6.18%) ทั้งนี้อาจเกิดจากการพัฒนาอย่างช้าๆ ของจำนวนประชากรรวมทั้งกิจกรรมของจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่มีอยู่ไม่มาก จนมีผลในการลดการเข้าทำลายของเชื้อโรคในช่วงก่อนการเก็บเกี่ยวผลไม่นาน และจุลินทรีย์ประจำถิ่นเหล่านั้นมีประสิทธิภาพต่ำในการเป็นศัตรูธรรมชาติของราสาเหตุของโรค (Ippolito and Nigro, 2000)

ในระยะเวลา 20 ปีที่ผ่านมาของการวิจัยด้านการควบคุมโรคหลังเก็บเกี่ยวของผลไม้โดยชีววิธี มีงานวิจัยมากมายที่ได้รับความสำเร็จในห้องปฏิบัติการในการแยกและคัดเลือกได้จุลินทรีย์ศัตรูธรรมชาติที่มีประสิทธิภาพ รวมทั้งยังมีงานวิจัยการควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยวอีกมากและเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงที่ผ่านมา อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบกันแล้ว งานวิจัยด้านการควบคุมโรคหลังเก็บเกี่ยวโดยการทำ preharvest applications ที่นำจุลินทรีย์ศัตรูธรรมชาติไปทดสอบในสภาพแปลงมีรายงานน้อยมาก (Ippolito and Nigro, 2000) ซึ่งในจำนวนนี้มักเป็นงานวิจัยเพื่อการควบคุมโรคหลังเก็บเกี่ยวที่มีสาเหตุจากการเข้าทำลายขณะหรือหลังเก็บเกี่ยว (postharvest infection) โดยจุลินทรีย์ในกลุ่ม saprophytic fungi งานวิจัยนี้จึงนับได้ว่าเป็นหนึ่งในงานวิจัยนำร่องของการนำจุลินทรีย์ศัตรูธรรมชาติที่มีประสิทธิภาพในห้องปฏิบัติการไปทดลองใช้ก่อนการเก็บเกี่ยวแล้วเพื่อลดความเสียหายของผลิตผล อันเนื่องมาจากโรคหลังเก็บเกี่ยวที่มีการเข้าทำลายแบบแฝง (quiescent infection) โดยจุลินทรีย์ในกลุ่มเชื้อราก่อโรค (pathogenic fungi) นอกจากนี้ ยังเป็นการยืนยันประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ศัตรูธรรมชาติ ที่ประเมินโดย Mango-leaf assay (Farungsang *et al*., 2008)

สรุป

การพ่น *Bacillus megaterium* isolate 3103 (BM-3103) ให้แก่ทรงพุ่มมะม่วงตั้งแต่เริ่มออกดอกจนกระทั่งถึงเวลาเก็บเกี่ยวมีผลในการลดการเข้าทำลายในสภาพแปลงของเกษตรกรโดยรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนส ความเสียหายของผลผลิตมะม่วงที่เก็บเกี่ยวจากทรงพุ่มที่ได้รับการพ่น BM-3103 ลดลง 19.98 และ 25.51% เมื่อประเมินด้วยพื้นที่ผิวของผลที่ปรากฏอาการของโรค และ จำนวนผลที่เป็นโรคลดลง 13.46 และ 11.86% เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 7 และ 9 วัน ตามลำดับ

เอกสารอ้างอิง

ศิริรัตน์ ตรีกาญจนวัฒนา, นวลวรรณ ฟ้ารุ่งสาง, ชลิดา เล็กสมบูรณ์ และ อุดม ฟ้ารุ่งสาง. 2549. การลดความเสียหายที่เกิดจากโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงโดยจุลินทรีย์ที่แยกได้จากทรงพุ่ม. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 37 (2 พิเศษ): 90-93.

Bailey, J.A., R.J. O'Connell and C. Nash. 1992. Infection strategies of *Colletotrichum* species, p. 88-120. *In* J.A. Bailey and M.J. Jeger. (eds.). *Colletotrichum*: Biology, Pathology and Control. Chapter 5. CAB International. Wallingford, UK.

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 Waterfront, Geelong, Victoria, Australia.

Farungsang, U., N. Farungsang, L. Phavaphutanon, C. Rattanakreetakul and C. Kunprom. 2008. Benefit of mango-leaf assay on the assessment of antagonistic spectrum of the *Bacillus megaterium* isolate 3103 upon diversity of postharvest pathogen, *Colletotrichum gloeosporioides*. Agricultural Sci. J. 39(3)(Suppl.):43-46.

Ippolito, A. and F. Nigro. 2000. Impact of preharvest application of biological control agents on postharvest diseases of fresh fruits and vegetables. Crop Protection 19(8-10):715-723.

Office of Health and Safety (OHS). 1998. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL). 4th edition. U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes of Health, Atlanta, Georgia, USA.

Smilanick, J.L., R. Denis-Arrue, J.R. Bosch, A.R. Gonzales, D. Henson and W.J. Janisiewicz. 1993. Control of postharvest brown rot of nectarines and peaches by *Pseudomonas* species. Crop Protection 12:513-520.