



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

ปริญญา

โรคพืช	โรคพืช
สาขา	ภาควิชา
เรื่อง	การควบคุมโรคแอนแทรกโนสโดยชีววิธีบนมะม่วงหลังการเก็บเกี่ยวโดยใช้ <i>Bacillus megaterium</i> ไอโซเลต 3103 ในสภาพแปลง
	Biological Control of Antracnose on Postharvest Mango by Field Application of <i>Bacillus megaterium</i> Isolate 3103
نامผู้วิจัย	นางสาวศันสนีย์ ศิลปสุนทร
ได้พิจารณาเห็นชอบโดย	
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	(รองศาสตราจารย์ศศิธร วุฒินิชย์, วท.ม.)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	(อาจารย์นวลวรรณ ฟ้างูสง, วท.ม.)
หัวหน้าภาควิชา	(ผู้ช่วยศาสตราจารย์รัชณี สงประยูร, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา วีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การควบคุมโรคแอนแทรกโนสโดยชีววิธีบนมะม่วงหลังการเก็บเกี่ยวโดยใช้
Bacillus megaterium ไอโซเลต 3103 ในสภาพแปลง

Biological Control of Anthracnose on Postharvest Mango by Field Application of
Bacillus megaterium Isolate 3103

โดย

นางสาวศันสนีย์ ศิลปสุนทร

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

พ.ศ. 2556

ศันสนีย์ ศิลปสุนทร 2556: การควบคุมโรคแอนแทรคโนสโดยชีววิธีบนมะม่วงหลังการเก็บเกี่ยวโดยใช้ *Bacillus megaterium* ไอโซเลท 3103 ในสภาพแปลง ปรินญาวิทยา ศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สาขาโรคพืช ภาควิชาโรคพืช อาจารย์ที่ปรึกษา วิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์ ศศิธร วุฒินิชย์, วท.ม. 70 หน้า

โรคแอนแทรคโนสมีสาเหตุจากรา *Colletotrichum gloeosporioides* เป็นโรคที่สำคัญของมะม่วงหลังเก็บเกี่ยว เป็นผลของการเข้าทำลายแบบแอบแฝงในสภาพแปลงที่เกิดขึ้นในขณะที่ผลมะม่วงยังอยู่บนต้น งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินประสิทธิภาพของ *Bacillus megaterium* ไอโซเลท 3103 (BM-3103) ในการลดการเข้าทำลายโดยรา *C. gloeosporioides* ในสภาพแปลง โดยการนำ cell culture ของ BM-3103 ไปฉีดพ่นให้แก่ทรงพุ่มต้นมะม่วงทุก 14 วัน ตั้งแต่ระยะมะม่วงออกดอกจนกระทั่งเก็บเกี่ยวผลแก่ ในการศึกษาใช้แปลงทดลอง 5 แปลง กับมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้และน้ำดอกไม้สีทอง ผลแก่หลังการเก็บเกี่ยวถูกนำมาไว้ในสภาพที่เอื้ออำนวยต่อการพัฒนาอาการของโรค ประเมินการเกิดและพัฒนาอาการของโรคโดยใช้พื้นที่ผิวของผลและจำนวนผลที่แสดงอาการของโรคแอนแทรคโนสเป็นดัชนี การทดลองอย่างมีนัยสำคัญของโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วงทั้งสองพันธุ์ที่เก็บเกี่ยวจากแปลงทดลองชี้ให้เห็นถึงประสิทธิภาพของ BM-3103 ในการลดการเข้าทำลายในสภาพแปลงโดยรา *C. gloeosporioides* การศึกษาความอยู่รอดของประชากร BM-3103 ในทรงพุ่มต้นมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ พบว่าประชากรของ BM-3103 ลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 9 วันหลังจากการฉีดพ่นครั้งแรก การดัดแปลงสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงเพื่อช่วยให้ BM-3103 อยู่รอดในสภาพแปลงได้ดีขึ้น พบว่าการเติม xanthan gum 0.05 เปอร์เซ็นต์ลงในอาหาร ทำให้ระดับประชากรของ BM-3103 คงที่และอยู่รอดในทรงพุ่มต้นมะม่วงได้นานขึ้น การฉีดพ่นซ้ำทำให้เสถียรภาพของประชากร BM-3103 ในทรงพุ่มต้นมะม่วงดีกว่าการฉีดพ่นเพียงครั้งเดียว ความอยู่รอดของประชากร BM-3103 ในทรงพุ่มต้นมะม่วง เพิ่มขึ้นจาก 12 วัน เป็น 21 วัน หลังการฉีดพ่นครั้งที่ 3

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

Sansanee Sinlapasunthorn 2013: Biological Control of Anthracnose on Postharvest Mango by Field Application of *Bacillus megaterium* Isolate 3103. Master of Science (Agriculture), Major Field: Plant Pathology, Department of Plant Pathology. Thesis Advisor: Associate Professor Sasitorn Vudhivanich, M.S. 70 pages.

Anthracnose, caused by *Colletotrichum gloeosporioides*, is one of the most serious postharvest diseases of mango (*Mangifera indica*) resulting from the quiescent phase of infection established in the field. This research determined biological control capability under commercial field condition of *Bacillus megaterium* isolate 3103 (BM-3103) on quiescent infection caused by *C. gloeosporioides*. BM-3103 cell culture was sprayed onto mango canopies every 14 days starting from flowering stage until harvesting of mature green fruit. The application was done at 5 experimental sites with ‘Nam-dok-mai’ and ‘Nam-dok-mai-seethong’ mango. Mature green mangoes were harvested and incubated in condition favouring anthracnose disease development. The disease incidence was recorded and assessed in terms of diseased areas on the fruit surface, and total numbers of diseased fruit. Incidence of anthracnose indicated antagonistic efficacy of BM-3103 by the reduction in disease severity on postharvest mangoes of both cultivars. Determination on population survival of BM-3103 in the canopies conducted on ‘Nam-dok-mai’ mango demonstrated sharp decline of the antagonist population during 9 days after the first application. Prolonged and stabilized antagonist population in mango canopies was improved by supplementation of 0.05% xanthan gum in the multiplying culture broth. However, population maintenance was supported by repeated application of the antagonist, that accumulation and survival of BM-3103 population in mango canopies could be prolonged from 12 to 21 days after the third applications.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาและวิจัยครั้งนี้สำเร็จเป็นวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้ ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ
รศ. ศศิธร วุฒิวิเศษย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก อ. นวลวรรณ ฟ้ารุ่งแสง อาจารย์ที่ปรึกษา
วิทยานิพนธ์ร่วม รศ. สมชาย สุชะกุล ประธานการสอบ รศ. ดร. พงศ์พันธุ์ เขียวหิรัญ ผู้ทรงคุณวุฒิ
ภายนอก ที่ดูแลเอาใจใส่ให้คำปรึกษาที่ดีในทุกเรื่อง ตลอดจนตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้เสร็จ
สมบูรณ์

กราบขอบพระคุณ ผศ. อุดม ฟ้ารุ่งแสง ที่ให้คำแนะนำและช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และศูนย์นวัตกรรม
เทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่สนับสนุนทุนวิจัย

กราบขอบพระคุณ คุณพ่อ-คุณแม่ ที่ให้การสนับสนุนด้านการศึกษา และเป็นกำลังใจให้
ตลอดมา

ขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ นิสิต เจ้าหน้าที่ และบุคลากร ภาควิชาโรคพืชทุกท่าน สำหรับ
ความร่วมมือช่วยเหลือจนการทำวิทยานิพนธ์สำเร็จลุล่วง

คุณประโยชน์จากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ขอมอบไว้แก่คุณพ่อ และคุณแม่ ตลอดจนอาจารย์ทุก
ท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาให้มาจนถึงปัจจุบัน

ศันสนีย์ ศิลปสุนทร

มีนาคม 2556

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	16
ผลและวิจารณ์	24
ผล	24
วิจารณ์	45
สรุป	49
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	50
ภาคผนวก	63
ภาคผนวก ก	64
ภาคผนวก ข	67
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	70

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ผลของการฉีดพ่นทรงพุ่มด้วย BM-3103 ต่อการปรากฏของโรคแอนแทรกโนสบนผลมะม่วงหลังเก็บเกี่ยว แปลงทดลองที่ 4 (อ. สามโก้ จ. อ่างทอง) มะม่วงน้ำดอกไม้สีทอง ถัดจากการเก็บเกี่ยวปี 2552	31
2	ผลของการฉีดพ่นทรงพุ่มด้วย BM-3103 ต่อจำนวนผลมะม่วงหลังเก็บเกี่ยวที่ปรากฏอาการของโรคแอนแทรกโนส แปลงทดลองที่ 4 (อ. สามโก้ จ. อ่างทอง) มะม่วงน้ำดอกไม้สีทอง ถัดจากการเก็บเกี่ยวปี 2552	32
3	ผลของการฉีดพ่นทรงพุ่มด้วย BM-3103 ต่อการปรากฏของโรคแอนแทรกโนสบนผลมะม่วงหลังเก็บเกี่ยว แปลงทดลองที่ 5 (อ. บ้านแพ้ว จ.สมุทรสาคร) มะม่วงน้ำดอกไม้ ถัดจากการเก็บเกี่ยวปี 2552	36
4	ผลของการฉีดพ่นทรงพุ่มด้วย BM-3103 ต่อจำนวนผลมะม่วงที่ปรากฏอาการของโรคแอนแทรกโนส แปลงทดลองที่ 5 (อ. บ้านแพ้ว จ.สมุทรสาคร) มะม่วงน้ำดอกไม้ ถัดจากการเก็บเกี่ยวปี 2552	36

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 ระดับการเกิดโรคแอนแทรกโนสบนผลมะม่วง	20
2 ผลการทดสอบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาของ <i>Bacillus megaterium</i> สายพันธุ์ 3103 (BM-3103)	25
3 ผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อของ <i>Bacillus megaterium</i> สายพันธุ์ 3103 (BM-3103)	26
4 ผลมะม่วงที่เก็บเกี่ยวจากแปลงมะม่วง ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน	28
5 ความเสียหายของผลมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ในสวนของเกษตรกร อำเภอสามโก้ จังหวัดอ่างทอง (คุณ สุนทร สมาริมงคล) ที่ถูกเพลี้ยไฟเข้าทำลาย	29
6 ผลของการฉีดพ่นทรงพุ่มด้วย BM-3103 ต่อการปรากฏของโรคแอนแทรกโนสบนผลมะม่วงหลังเก็บเกี่ยว แปลงทดลองที่ 4 (อ. สามโก้ จ. อ่างทอง) ฤดูการเก็บเกี่ยวปี 2552	33
7 ผลของการฉีดพ่นทรงพุ่มด้วย BM-3103 ต่อจำนวนผลมะม่วงที่ปรากฏอาการของโรคแอนแทรกโนส แปลงทดลองที่ 4 (อ. สามโก้ จ. อ่างทอง) ฤดูการเก็บเกี่ยวปี 2552	33
8 การเปรียบเทียบอาการของโรคแอนแทรกโนสบนผลมะม่วงน้ำดอกไม้สีทองที่เก็บเกี่ยวจากแปลงทดลองที่ 4 (อ. สามโก้ จ. อ่างทอง) หลังจากเก็บในสภาพชื้นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน	34
9 ผลของการฉีดพ่นทรงพุ่มด้วย BM-3103 ต่อการปรากฏของโรคแอนแทรกโนสบนผลมะม่วงน้ำดอกไม้หลังเก็บเกี่ยว แปลงทดลองที่ 5 (อ. บ้านแพ้ว จ.สมุทรสาคร) ฤดูการเก็บเกี่ยวปี 2552	37
10 ผลของการฉีดพ่นทรงพุ่มด้วย BM-3103 ต่อจำนวนผลมะม่วงน้ำดอกไม้ที่ปรากฏอาการของโรคแอนแทรกโนส แปลงทดลองที่ 5 (อ. บ้านแพ้ว จ. สมุทรสาคร) ฤดูการเก็บเกี่ยวปี 2552	37
11 การเปรียบเทียบอาการของโรคแอนแทรกโนสบนผลมะม่วงน้ำดอกไม้ที่เก็บเกี่ยวจากแปลงทดลองที่ 5 (อ. บ้านแพ้ว จ. สมุทรสาคร) หลังจากเก็บในสภาพชื้นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน	38

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
12 การเปลี่ยนแปลงระดับประชากร BM-3103 ในทรงพุ่ม หลังการฉีดพ่นครั้งที่ 1 (วันที่ 17 ตุลาคม 2551)	40
13 การลดลงของประชากร BM-3103 ในทรงพุ่ม เนื่องจากการชะล้างของฝน หลังการฉีดพ่นครั้งที่ 2 (วันที่ 31 ตุลาคม 2551)	40
14 การเปลี่ยนแปลงระดับประชากร BM-3103 ในทรงพุ่ม หลังการฉีดพ่นครั้งที่ 3 (วันที่ 21 พฤศจิกายน 2551)	41
15 การเปลี่ยนแปลงระดับประชากร BM-3103 ในทรงพุ่ม หลังการฉีดพ่นครั้งที่ 4 (วันที่ 12 ธันวาคม 2551)	41
16 การเปลี่ยนแปลงระดับประชากรในทรงพุ่มของ BM-3103 ที่เลี้ยงด้วยอาหาร GYPB, TYPB และ GYPB+Xg หลังการฉีดพ่นทรงพุ่มต้นมะม่วง ครั้งที่ 1 (วันที่ 16 ธันวาคม 2555) เปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ประจำถิ่น (RM)	43
17 การเปลี่ยนแปลงระดับประชากรในทรงพุ่มของ BM-3103 ที่เลี้ยงด้วยอาหาร GYPB, TYPB และ GYPB+Xg หลังการฉีดพ่นทรงพุ่มต้นมะม่วง ครั้งที่ 2 (วันที่ 6 มกราคม 2556) เปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ประจำถิ่น (RM)	43
18 การเปลี่ยนแปลงระดับประชากรในทรงพุ่มของ BM-3103 ที่เลี้ยงด้วยอาหาร GYPB, TYPB และ GYPB+Xg หลังการฉีดพ่นทรงพุ่มต้นมะม่วง ครั้งที่ 3 (วันที่ 27 มกราคม 2556) เปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ประจำถิ่น (RM)	44

การควบคุมโรคแอนแทรกโนสโดยชีววิธีบนมะม่วงหลังการเก็บเกี่ยวโดยใช้ *Bacillus megaterium* ไอโซเลต 3103 ในสภาพแปลง

Biological Control of Anthracnose on Postharvest Mango by Field Application of *Bacillus megaterium* ไอโซเลต 3103

คำนำ

มะม่วง (*Mangifera indica* Linn.) เป็นผลไม้ทางเศรษฐกิจที่สำคัญ มีการปลูกอย่างแพร่หลายภายในประเทศ มีการผลิตเพื่อบริโภคทั้งผลดิบและผลสุก ทั้งยังทำการค้าทั้งภายในประเทศและส่งออกต่างประเทศ โดยในปี 2550 ประเทศไทยผลิตมะม่วงส่งออก 35,393 ตัน ต่อมาในปี 2555 เพิ่มขึ้นเป็น 44,450 ตัน (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2550, 2555) จะเห็นว่าตลาดมีความต้องการมะม่วงเพิ่มสูงขึ้น โรคแอนแทรกโนสที่เกิดจากรา *Colletotrichum gloeosporioides* เป็นปัญหาสำคัญของผลมะม่วงรับประทานสุก เนื่องจากทำให้เกิดการเน่าเสียในระหว่างการขนส่งและเก็บรักษา มะม่วงพันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรคแอนแทรกโนสมากที่สุดคือพันธุ์น้ำดอกไม้ รongลงมาคือพันธุ์มหาชนก น้ำดอกไม้สีทอง โชคอนันต์ และมะม่วงแรด (อุดม และ นวลวรรณ, 2544)

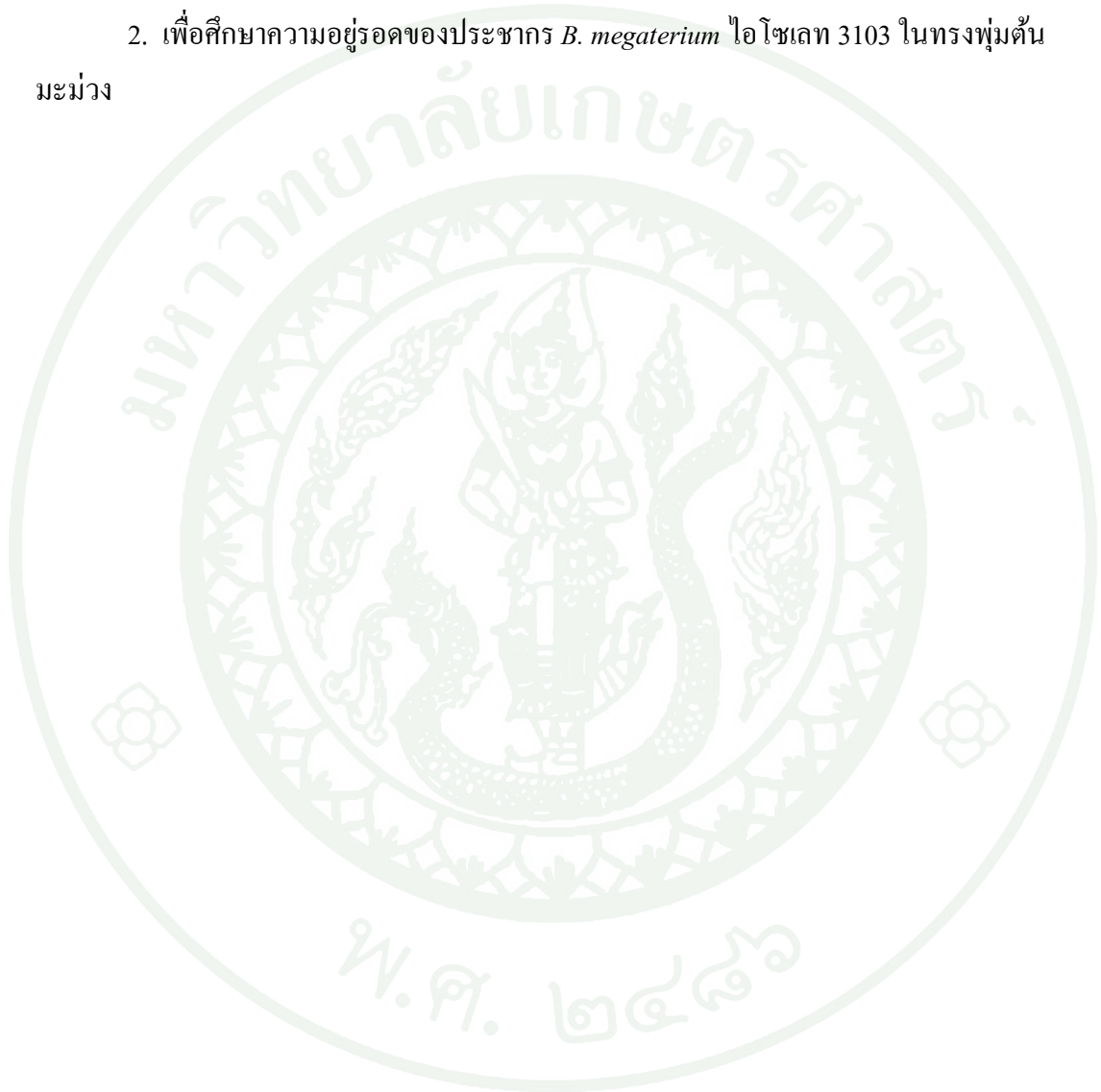
เนื่องจากการเข้าทำลายผลมะม่วงโดยรา *C. gloeosporioides* เกิดขึ้นในสภาพแปลง ดังนั้นแนวทางการควบคุมโรคที่ได้ผลจึงควรเป็นวิธีที่ทำในสภาพแปลงเพื่อป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อรา ซึ่งมีหลายวิธี ทั้งการตัดแต่งกิ่ง การปรับปรุงสภาพแวดล้อมของสวนมะม่วงให้ไม่เหมาะต่อการอยู่อาศัยและการพัฒนาของรา การใช้สารเคมีในกลุ่ม benzimidazole แต่การใช้สารเคมีในกลุ่ม benzimidazole ต่อเนื่องและเป็นระยะเวลานาน ส่งผลให้รา *C. gloeosporioides* มีพัฒนาการสามารถต่อต้านสารเคมี (Farungsang and Farungsang, 1992; Prior *et al.*, 1992) จึงมีการนำการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีมาใช้ *Bacillus megaterium* ไอโซเลต 3103 (BM-3103) เป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากทรงพุ่มของมะม่วง ได้รับการพิสูจน์ว่ามีคุณลักษณะในการปกป้องใบมะม่วงจากการเข้าทำลายโดยรา *C. gloeosporioides* ในสภาพห้องปฏิบัติการ (ศิริรัตน์ และคณะ, 2549) งานวิจัยครั้งนี้เป็นการประเมินประสิทธิภาพของ *Bacillus megaterium* ไอโซเลต 3103 ในการลดการเข้าทำลายโดยรา *C. gloeosporioides* ในสภาพแปลงและความเป็นไปได้ในการพัฒนาไปเป็น biological control agent เพื่อควบคุมโรคแอนแทรกโนสบนผลมะม่วงหลังเก็บเกี่ยว

งานวิจัยนี้จะเป็นงานวิจัยนำร่องของการทดลองนำจุลินทรีย์ที่คัดกรองและทดสอบในห้องปฏิบัติการไปใช้เพื่อลดการเข้าทำลายแบบ quiescent infection ที่เกิดขึ้นในสภาพแปลงที่เป็นสาเหตุของความเสียหายที่เกิดขึ้นหลังเก็บเกี่ยวบนผลมะม่วง ผลงานวิจัยจะประเมินความเป็นไปได้ของการนำ *Bacillus megaterium* ไอโซเลต 3103 ไปใช้ในสภาพสวนมะม่วงที่ปลูกเป็นการค้า



วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาศักยภาพของ *Bacillus megaterium* ไอโซเลต 3103 ในการลดความรุนแรงของโรคแอนแทรกโนสที่เกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ในสภาพแปลง
2. เพื่อศึกษาความอยู่รอดของประชากร *B. megaterium* ไอโซเลต 3103 ในทรงพุ่มต้นมะม่วง



การตรวจเอกสาร

มะม่วง

มะม่วงเป็นไม้ยืนต้นอยู่ในวงศ์ Anacardiaceae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Mangifera indica* Linn. มีถิ่นกำเนิดแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และอินเดีย มีลักษณะเป็นไม้ยืนต้นขนาดกลางถึงขนาดใหญ่ ลำต้นตั้งตรง ขนาดของลำต้นขึ้นอยู่กับชนิดของพันธุ์และอายุของมะม่วง เปลือกมีสีเขียว เมื่อแก่จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแกมแดงมีลักษณะขรุขระและมีเกร็ดมาก ลักษณะทรงพุ่มเป็นรูปครึ่งวงกลมหรือรูปไข่ มีรากแบบรากแก้ว โดยทั่วไปรากดูดซึมน้ำอาหารจะอยู่ที่บริเวณผิวดินจนถึงระดับความลึกประมาณ 30-60 เซนติเมตร แผ่กว้างออกเป็นรัศมีประมาณ 750 เซนติเมตร แผ่รอบทรงพุ่มใบเป็นใบเดี่ยวรูปหอก รูปไข่ รูปไข่ หรือเรียวยาว ผิวใบเป็นมันไม่มีขน ใบจะอยู่เป็นกระจุกที่ปลายกิ่งและเรียงตัวแบบสลับกัน ออกดอกเป็นช่อตามปลายกิ่งหรือตามกิ่ง ดอกเรียงตัวแบบช่อดอกย่อย (cyme) ก้านดอกสั้น มีกลิ่นหอม แต่ละช่อประกอบด้วยดอกดอกสองชนิด คือดอกตัวผู้และดอกสมบูรณ์เพศ ผลจัดเป็นผลแบบ drupe ผิวเรียบ แต่ละพันธุ์จะมีความแตกต่างกันในเรื่องขนาด รูปร่าง สี ปริมาณเส้น รสชาติและกลิ่น ผลสุกมีรสชาติดหวานและน้ำมากจนถึงเปรี้ยวและค่อนข้างแข็ง กลิ่นอ่อนจนถึงกลิ่นรุนแรง เมล็ดมีตั้งแต่ขนาดใหญ่จนถึงเมล็ดเล็ก หรือไม่มีเมล็ด เปลือกหุ้มเมล็ดมีเชื้อหุ้มชั้นนอกและชั้นใน มีใบเลี้ยง 2 อัน อาหารเลี้ยงชีพจะไม่อยู่ในใบเลี้ยง มะม่วงสามารถปลูกได้ในสภาพดินหลายๆชนิด แต่ดินที่เหมาะสมที่สุดคือ ดินร่วนที่มี pH อยู่ในช่วงระหว่าง 5.5-7.5 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของมะม่วงอยู่ในช่วง 21.2-26.7 องศาเซลเซียส ในภูมิภาคเขตร้อนมะม่วงมักออกดอกในช่วงฤดูหนาว อุณหภูมิที่กระตุ้นให้มะม่วงออกดอกอยู่ที่ประมาณ 15-20 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5-10 วัน และหลังดอกบานเต็มที่ประมาณ 100 วัน เป็นช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการเก็บเกี่ยวผล สำหรับประเทศไทยมะม่วงออกดอกช่วงเดือนธันวาคมถึงมกราคม และเก็บผลผลิตช่วงเดือนมีนาคมถึงเมษายน การขยายพันธุ์มะม่วงสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การใช้เมล็ด การติดตา การเสียบยอด การทาบกิ่ง การชำ การตอน แต่วิธีที่เป็นที่นิยมมากที่สุดคือการทาบกิ่ง เพราะได้ต้นที่มีลักษณะตรงตามพันธุ์เดิมและมีระบบรากแก้วที่แข็งแรงเหมือนกับการเพาะเมล็ด (เฉลิมชัย, 2539)

พันธุ์มะม่วงที่ปลูกเป็นการค้าแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ มะม่วงที่รับประทานสุก และมะม่วงที่รับประทานดิบ มะม่วงที่รับประทานสุก เช่น น้ำดอกไม้ อกร่อง หนั่งกลางวัน ทองคำ และ พิมเสน เป็นต้น ส่วนมะม่วงที่รับประทานดิบ เช่น เขียวสวาย ฟ้าลั่น แรด หนองแซง และสายฝน

เป็นต้น (ชาลา, 2530) เมื่อมีการส่งออกมะม่วงเพิ่มมากขึ้นส่งผลให้มีพื้นที่ปลูกมะม่วงเพิ่มมากขึ้น จังหวัดที่ปลูกมะม่วงมากคือ ฉะเชิงเทรา ชลบุรี สระบุรี เพชรบูรณ์ ราชบุรี นครราชสีมา สุโขทัย อุบลราชธานี เชียงใหม่ และกำลังขยายพื้นที่ปลูกอีกหลายจังหวัด (ชลอ, 2539)

โรคแอนแทรคโนสของมะม่วง (Anthracnose of mango)

โรคแอนแทรคโนสของมะม่วงมีเชื้อสาเหตุมาจากรา *Colletotrichum gloeosporioides* ในสภาพแปลงมักพบการระบาดรุนแรงในช่วงระยะใบแตกอ่อนและแทงระยะแทงช่อดอกในฤดูฝน หรือช่วงที่มีอากาศชื้นสูง (สุชาติ และคณะ, 2531; Dodd *et al.*, 1992)

ลักษณะอาการ บนใบมะม่วงเป็นจุดสีน้ำตาลกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2-3 มิลลิเมตร เนื้อเยื่อบริเวณกลางจุดมักแตกหลุดร่อนเป็นรู ใบอ่อนที่เป็นโรครุนแรงจะมีจุดแผลเป็นจำนวนมาก ทำให้ใบอ่อนบิดงอเนื่องจากการยึดตัวของขอบใบไม่สม่ำเสมอ ดอกมะม่วงที่ถูกราเข้าทำลายจะทำให้ดอกฝ่อและหลุดร่วง ถ้าเชื้อราเข้าทำลายตรงก้านดอกหรือก้านช่อดอก จะเกิดแผลเน่าโดยรอบ ทำให้พืชไม่สามารถนำอาหารไปเลี้ยงปลายช่อดอกได้ ทำให้ช่อแห้งเหี่ยวเป็นสีดำทั้งช่อ ถ้าไม่รุนแรงนักจะทำให้การติดผลน้อย แต่ถ้าเป็นมากจะไม่ได้ผลผลิต ระยะติดผลและระยะผลอ่อนที่เริ่มพัฒนาเป็นระยะที่อ่อนแอที่สุด เนื่องจากเชื้อราจะเข้าทำลายผลอ่อนตั้งแต่วัยที่เป็นรังไข่ และพักตัวในเนื้อเยื่อได้ผิวผล เมื่อสภาพแวดล้อมมีฝนตกชุกความชื้นสูง ผลที่ถูกราเข้าทำลายจะแสดงอาการลักษณะเป็นจุดสีดำกระจายบนผลทำให้ผลมะม่วงเป็นแผลแตกตามความยาวของผล และอาจพบจุดดำเป็นทางยาวตามแนวไหลของน้ำค้ำ ทำให้อายุเก็บเกี่ยวสั้นลง ผลเน่าดำรุนแรง ผลมะม่วงส่วนใหญ่ที่ยังไม่แสดงอาการของโรคในระยะก่อนเก็บเกี่ยว จะเริ่มพบอาการของโรคเมื่ออยู่ในระหว่างการบ่มและผลสุก อาการของโรคบนผลเริ่มต้นจากจุดแผลสีดำขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1-2 มิลลิเมตร เมื่อแผลขยายตัวกลางแผลมีลักษณะเป็นแอ่งนูนซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของโรคแอนแทรคโนส อาจพบการสร้างกลุ่มของสปอร์สีส้ม (อังสุมา, 2530; นิพนธ์, 2542)

เชื้อสาเหตุ *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. เป็นระยะ asexual stage ของ *Glomerella cingulata* (Spauld.) Spauld. And von schrenk. (Ascomycotina) (Hawksworth *et al.*, 1983; Sutton, 1992; Webster and Weber, 2007; Cannon *et al.*, 2012) Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi 7th edition (Hawksworth *et al.*, 1983) ได้จัดไว้ใน Genus *Colletotrichum* ไว้ใน Division Eumycota, Sub-division Deuteromycotina, Class Coelomycetes, Order Melanconiales ลักษณะ โคลนีสบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) มีลักษณะกลม ขอบเรียบ

เส้นใยสีขาวออกสีเทาอ่อนจนถึงเทาเข้ม เรียงอัดกันเป็นแผ่นหรือกระจุก บางครั้งอาจพบเส้นใยสีขาวถึงน้ำตาลหรือดำขึ้นอยู่กับอายุของเชื้อ ราสร้าง spore ใน fruiting body ที่เรียกว่า acervulus เกิดเรียงตัวเป็นวงแหวน (zonate ring) acervulus รูปร่าง cushion-shaped เมื่อแก่ spore ถูกปลดปล่อยเป็นกลุ่มที่มีลักษณะเปื่อย เรียกว่า spore mass สีส้ม ถึงส้มอมชมพู แต่ละไอโซเลทอาจต่างกันเล็กน้อยในเรื่องความหนาแน่น และสีของกลุ่ม สปอร์รูปทรงกระบอก ปลายมน ใส เซลล์เดียว ขนาด 12-17 x 3.5-6 ไมโครเมตร สร้าง appressorium รูปทรงกระบอก สีน้ำตาล มีขนาด 6-20 x 4-12 ไมโครเมตร (Sutton, 1980) *C. gloeosporioides* เป็นราสาเหตุโรคพืชที่สำคัญที่พบได้ทั่วไปในเขตร้อนชื้นและกึ่งร้อนของโลก (Farr *et al.*, 1989; Uhm *et al.*, 2003) การเข้าทำลายพืชเกิดขึ้นได้ทุกระยะการเจริญเติบโตของผล เมื่อเข้าสู่พืชได้แล้วเชื้อราจะพักตัวอยู่ใต้ผิวของผลระยะหนึ่งและจะเจริญเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว และการพัฒนาของโรคจะเกิดขึ้นในระยะที่ผลเริ่มสุก ซึ่งมักอยู่ระหว่างการขนส่งและเก็บรักษา (Tandon and Singh, 1968)

การเข้าทำลายพืช กระบวนการเข้าทำลายพืชของรา *Colletotrichum* spp. มีรูปแบบเฉพาะสามารถเข้าสู่พืชได้โดยตรง (direct penetration) (Bailey *et al.*, 1992) โดยสปอร์ของรามีการแบ่งเซลล์เกิดเป็น septum ก่อนที่จะงอก germ tube ขึ้นๆ ขนาด 10-20 ไมครอน และมีการสร้าง appressorium รูปร่างค่อนข้างกลม ไม่มีสีอยู่ที่ปลายซึ่งเป็นลักษณะของรา *Colletotrichum* spp. และเป็นโครงสร้างที่สำคัญในการเข้าทำลายพืช เมื่อ appressorium มีอายุมากขึ้น (ประมาณ 12-24 ชั่วโมง) ผนังจะหนาและเปลี่ยนจากไม่มีสีกลายเป็นสีน้ำตาลเข้มเนื่องจากเกิดจากการสะสมของเม็ดสีเมลานิน แล้วงอก infection peg ผ่านชั้น cuticle และ epidermis เข้าไปในผิวพืชด้วยการใช้แรงดัน (mechanical force) ร่วมกับการสร้างเอนไซม์คิวตินเอสออกมาย่อยคิวตินที่เคลือบผิวพืชโดยไม่ต้องอาศัยบาดแผลหรือช่องเปิดธรรมชาติ (Kuo, 1999) เมื่อราเข้าครอบครองเซลล์พืชแล้ว จึงเริ่มกระบวนการเข้าทำลายพืชแบบ hemibiotroph ซึ่งแบ่งเป็น 2 ระยะ คือในระยะแรกเชื้อรามีการพัฒนาเส้นใย (intracellular hypha) อยู่ภายในเซลล์พืชโดยไม่ทำอันตรายต่อเซลล์พืช ระยะที่สองเกิดเมื่อมีสภาพแวดล้อมเหมาะสมเส้นใยที่พักตัวจึงพัฒนาเส้นใย (intercellular hypha) เข้าทำลายเซลล์พืชข้างเคียงทำให้เกิดอาการเซลล์ตายเป็นแผลลูกกลาม (Jeffries *et al.*, 1990; Bailey *et al.*, 1992; Son-Quang, 2002)

การเข้าทำลายโดยรา *C. gloeosporioides* ที่เป็นสาเหตุโรคแอนแทรคโนสที่เกิดกับมะม่วง หลังเก็บเกี่ยวเกิดขึ้นตั้งแต่ระยะผลอ่อนอยู่ในแปลงโดยไม่ปรากฏอาการของโรค เมื่อผลไม่พัฒนาการสุกจะเกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและสรีรวิทยาภายในผลมมะม่วง คือ มีอัตราการ

หายใจ ผลิตภัณฑ์คาร์บอนไดออกไซด์ และก๊าซเอทิลีนสูงกว่าปกติ (Sangchote, 1989) มีองค์ประกอบที่เป็นน้ำตาลสูงขึ้น ความเป็นกรดและสารที่เป็นพิษต่อราลดลง (Prusky and Keen, 1993) ซึ่งเอทิลีนที่เกิดขึ้นในขณะผลสุกมีผลในการชักนำให้เกิดการเข้าทำลายเซลล์พืชของเชื้อสาเหตุโรคแอนแทรคโนสในมะม่วง (Flaishman *et al.* 1995)

ราสามารถพักตัวอยู่บนผลมะม่วงภายหลังจากการสร้าง appressorium แล้ว โดยมี appressorial matrix ปกคลุมอยู่จนกระทั่งถึงช่วงเวลาที่เหมาะสมแล้วจึงงอก infection hypha เข้าทำลายพืชต่อไป นอกจากนี้การพักตัวของราอาจเกิดขึ้นในระหว่างการพัฒนา intracellular hypha ซึ่งอยู่ภายในเซลล์พืชที่มีชีวิตได้เช่นกัน การเข้าทำลายรูปแบบนี้เรียกว่าการเข้าทำลายแบบแฝง (quiescent infection) (Jeger *et al.*, 1987; Bailey *et al.*, 1992)

อังสุมา (2530) ได้ศึกษากระบวนการเข้าทำลายของรา *C. gloeosporioides* ที่อยู่บนผิวผล พบว่ารางอก germ tube แล้วสร้าง appressorium เกาะยึดผิวมะม่วง จากนั้นจึงสร้าง infection peg แทะลงไปบนผิวมะม่วงภายในเวลา 18-24 ชั่วโมง ผ่านชั้น cuticle ลงไปอยู่ในชั้น epidermis และ sub-epidermis ลึกลงไปจากผิวนอก 2-3 ชั้นเซลล์ หรือประมาณ 90-205 ไมครอน โดยเส้นใยอยู่ระหว่างเซลล์ (intercellular) แล้วพักตัวอยู่เช่นนั้น จนกระทั่งมะม่วงเริ่มสุกราจึงเริ่มการทำลายมะม่วงต่อไป

วงจรและการแพร่ระบาด รา *C. gloeosporioides* สามารถดำรงวงจรของโรคในสวนและพร้อมเข้าทำลายพืช ด้วยการดำรงชีวิตแบบ saprophyte บนเศษพืชและอยู่ข้ามฤดูทั้งในรูปของ sexual และ asexual stage ในทรงพุ่มของพืช ซึ่งกลายเป็นแหล่งแพร่กระจายเชื้อโรค โดยมีลมและฝนเป็นพาหะที่สำคัญ (นิพนธ์, 2532; Fitzell and Peak, 1984; Barki-Golan, 2001) สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมสำหรับการงอกและการเข้าทำลายพืชอาศัยของสปอร์รา คือสภาพแวดล้อมที่มีความชื้นสูง และมีอุณหภูมิประมาณ 20-25 องศาเซลเซียส เป็นเวลาไม่ต่ำกว่า 4 ชั่วโมง จึงพบว่าในช่วงฤดูฝนมักมีการแพร่ระบาดของโรคแอนแทรคโนสอย่างรุนแรง เนื่องจากสภาพแวดล้อมเหมาะสม และเป็นช่วงที่พืชมีการพัฒนาเนื้อเยื่อเจริญซึ่งเป็นระยะที่อ่อนแอต่อการเข้าทำลายของรา (Waller, 1992)

การควบคุมโรคแอนแทรกโนส

มะม่วงที่ผลิตเพื่อการส่งออกนั้นจะต้องมีการควบคุมโรคอย่างสม่ำเสมอ โดยในช่วงที่มะม่วงผลิใบอ่อน ช่วงการออกดอก และติดผล ซึ่งเป็นช่วงที่มะม่วงมีความอ่อนแอต่อการเข้าทำลายของรา การป้องกันไม่ให้พืชถูกโรคเข้าทำลาย จะใช้การฉีดพ่นสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อโรคบนต้นพืชและควบคุมแมลงพาหะของโรค เช่น สารฆ่าแมลง สารควบคุมเชื้อรา หรือวิธีการอื่นๆที่ไม่ใช้สารเคมี เช่น การใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ และการเกษตรกรรม เป็นต้น (นิพนธ์, 2542)

การใช้วิธีเกษตรกรรม ควบคุมโดยการจัดการระบายอากาศในแปลงโดยการตัดแต่งกิ่ง ในระยะต้นโตเพื่อให้โปร่ง มีอากาศถ่ายเท และมีแสงแดดส่องทั่วถึง ทำความสะอาดแปลงปลูกโดยการเก็บและทำลายซากพืช เพื่อลดการสะสมราสาเหตุของโรค เมื่อมะม่วงอยู่ในระยะแตกใบอ่อนแทงช่อดอก และติดผลอ่อน (นิพนธ์, 2542)

นอกจากนี้ควรเพิ่มวิธีการควบคุมโรคภายหลังเก็บเกี่ยวเพื่อลดการปรากฏอาการของโรค โดยแช่ผลมะม่วงที่เก็บเกี่ยวในน้ำร้อนอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ผสมเบนโนมิล 500 ppm หรือ โพรคอร์แลซ 200 ppm เป็นเวลานาน 5-10 นาที หรือแช่น้ำร้อนอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที (นิพนธ์, 2542) Quimio and Quimio (1974) พบว่าการแช่มะม่วงในน้ำร้อนอุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที สามารถควบคุมโรคแอนแทรกโนสและโรคข้าวผลเน่าได้ดี แต่การใช้น้ำร้อนในการควบคุมโรคบนผลผลิตต้องระมัดระวัง เพราะอุณหภูมิของน้ำร้อนที่ใช้แช่ผลผลิตต้องมีระดับอุณหภูมิสูงสุดที่เชื้อสาเหตุโรคนั้นทนได้ ในขณะเดียวกันต้องเป็นอุณหภูมิที่ผลผลิตสามารถทนได้ ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมในการแช่ผลผลิต มักใกล้เคียงกับระดับที่เกิดอันตรายต่อผลผลิตได้ เนื่องจากระดับอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับแต่ละผลผลิตแตกต่างกันไป โดยทั่วไปมักเกิดความเสียหายเนื่องจากความร้อนสูงเกินไป (heat injury) ความเสียหายบนผลมะม่วงมักปรากฏให้เห็นตั้งแต่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ขึ้นไป (มุสดี, 2529) การใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 100 เปอร์เซ็นต์รมผลมะม่วงเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง (นิพนธ์ และคณะ, 2538) หรือการรมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เข้มข้นนาน 72 ชั่วโมง (Miller *et al.*, 1986) สามารถชะลอการเกิดโรคแอนแทรกโนสหรือลดการเน่าเสียจากโรคแอนแทรกโนสได้

การใช้สารเคมี ประเภทของสารเคมีที่ใช้ในการป้องกันโรคแอนแทรกโนสของมะม่วง มีทั้งแบบไม่ดูดซึมและแบบออกฤทธิ์กว้าง เช่น แมนโคเซป คอปเปอร์ออกไซด์คลอไรด์ โปรพิเนป และ

แคลแพน ส่วนใหญ่จะใช้ฉีดพ่นในลักษณะการป้องกันโรค โดยเฉพาะแหล่งปลูกที่พบการระบาดของโรคเป็นประจำ ควรฉีดพ่นเป็นระยะๆ จนกว่าจะเก็บเกี่ยว (สุชาติ, 2541)

โรคแอนแทรคโนสนี้สามารถป้องกันกำจัดได้โดยการพ่นด้วยสารเคมี โดยระยะที่มีการเจริญเติบโตที่มีเนื้อเยื่ออ่อนมีสีเขียวของพืชต้องฉีดพ่นป้องกันกำจัดเชื้อราด้วยเบนโนมิลหรือคาร์เบนดาร์ซิม และควรผสมหรือสลับกับแมนโคเซป ฉีดพ่นทุกๆ 7-10 วัน เน้นการฉีดพ่นระยะแทงช่อดอก ระยะดอกบาน และระยะติดผลอ่อน แต่ต้องระวังชนิดของสารเคมีและวิธีฉีดพ่นเพื่อไม่ให้ดอกร่วง การฉีดพ่นจะเว้นระยะห่างมากขึ้นเมื่อผลมะม่วงโตมากขึ้น คือ ฉีดพ่นทุกๆ 15 วัน แต่ถ้าสภาพอากาศเปลี่ยนแปลงบ่อย มีฝนตกสลับกับอากาศร้อนในระยษะติดผลจนถึงระยะเก็บเกี่ยวก็มีความจำเป็นต้องฉีดพ่นป้องกันทุก 7-10 วัน ควรฉีดพ่นสารเคมีต่อเนื่องกันตั้งแต่ระยะออกดอกจนถึงระยะใกล้เก็บเกี่ยวประมาณ 4-7 ครั้ง เพื่อป้องกันการพักตัวของเชื้อรา (นิพนธ์, 2542) ในช่วงที่มีความชื้นและอุณหภูมิเหมาะสมกับการเกิดโรคหรือมีโรครบาดจะใช้เบนโนมิล 10 กรัม ต่อน้ำ 20 ลิตร หรือ แมนโคเซป แมเนบ ไชเนบ อัตรา 48 กรัม ต่อน้ำ 20 ลิตร และพ่นทันทีหลังการเก็บเกี่ยวควรพ่นให้แห้งก่อนทำการบรรจุลงหีบห่อ โดยเฉพาะเพื่อการส่งออก (เอียน, 2536)

การใช้สารเคมีในการควบคุมโรคมักอาจก่อให้เกิดปัญหาได้ โดยเฉพาะความเสี่ยงต่อการชักนำความต้านทานของเชื้อรา เนื่องจากมีรายงานว่าเชื้อรา *C. gloeosporioides* สามารถต้านทานต่อสารเคมีในกลุ่ม benzimidazole ได้ ทำให้มีการใช้สารเคมีอย่างจำกัดในหลายประเทศ (Farungsang and Farungsang, 1992; Prior *et al.*, 1992) นอกจากนี้การใช้สารเคมีควบคุมโรคของผลผลิตหลังการเก็บเกี่ยวยังพบว่ามีปริมาณสารพิษตกค้างในเนื้อเยื่อพืช ทศพร (2537) ใช้วิธี bioassay เพื่อตรวจสอบสารพิษตกค้างในกล้วยหอม โดยการนำกล้วยหอมไปจุ่มในสารเคมี imazalil ที่ความเข้มข้น 250 ppm นาน 3 นาที พบว่ามีปริมาณสารพิษตกค้างในเปลือกด้านนอก 12 ppm เปลือกด้านใน 13 ppm หลังจากจุ่มสารเคมี 20 ชั่วโมง และไม่พบสารพิษตกค้างในเนื้อเยื่อของกล้วยหอมหลังจากจุ่มสารเคมี 40 ชั่วโมง

การใช้ชีววิธี การควบคุมโรคโดยชีววิธีนั้นเป็นอีกหน้ทางเลือกในการควบคุมโรคที่น่าสนใจ เนื่องจากสามารถหลีกเลี่ยงผลกระทบจากการใช้สารเคมีที่เกิดขึ้นในปัจจุบันได้ ดังนั้นจึงมีงานการศึกษาทดลองที่นำเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ เช่น แบคทีเรีย รา ยีสต์ มาควบคุมโรคพืช โดยใช้คำเรียกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคว่า จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (antagonist) คุณสมบัติของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ดีคือ สามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาพแวดล้อมที่มีความผันแปร

ของหลายปัจจัย เช่น อุณหภูมิ ปริมาณสารอาหารที่มีอยู่อย่างจำกัด และสามารถปรับตัวตามสภาพแวดล้อมได้ เพื่อประสิทธิภาพที่ดีในการยับยั้งโรค กลไกการทำงานของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในสภาพธรรมชาติมีอยู่หลายลักษณะ เช่น การชักนำให้พืชเกิดความต้านทาน (induce resistance) การเป็นปรสิตกับพืชโดยตรง (parasitism) โดยกลไกที่สำคัญและมีการศึกษารายงานมากคือ การสร้างปฏิชีวนสาร (antibiosis) ไปยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคโดยตรง (Blackman and Fokkema, 1982) Pusey and Wilson (1984) ศึกษาเรื่องจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคพืชหลังการเก็บเกี่ยวซึ่งเป็นรายงานแรกเกี่ยวกับการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ โดยใช้แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ไอโซเลท B3 ควบคุมโรคผลเน่าสีน้ำตาล (brown rot) ของ stone fruit ที่มีรา *Monilinia fructicola* เป็นสาเหตุของโรค

Baker and Cook (1974) เป็นผู้เสนอทฤษฎีว่า จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ควรหาได้จากส่วนของพืชที่ไม่เป็นโรคถึงแม้พืชนั้นจะเป็นไอโซเลทอ่อนแอต่อโรคก็ตาม เพื่อการเสาะหาและสามารถแยกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ได้สำเร็จ และ Janisiewicz (1996) เสนอว่า การแยกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์จากสภาพสวนธรรมชาติที่ปราศจากการจัดการและการใช้สารเคมี มีแนวโน้มประสบความสำเร็จสูงกว่าสวนที่มีการใช้สารเคมี เนื่องจากประชากรจุลินทรีย์ในธรรมชาติบริเวณนั้นไม่ถูกรบกวน

การศึกษาถึงการนำจุลินทรีย์ปฏิปักษ์หลายชนิดที่มีกลไกการทำงานต่างกันมาใช้ควบคุมโรคร่วมกัน พบว่ามีแนวโน้มควบคุมโรคได้ดียิ่งขึ้น Guetsky *et al.* (2002) รายงานถึงการควบคุมโรค gray mold บนใบ และลำต้นสตอเบอรี่ ซึ่งสาเหตุเกิดจาก *Botrytis cinerea* โดยใช้ยีสต์ *Pichia guilliermondii* ที่มีคุณสมบัติแข่งขันในการใช้ glucose, sucrose, adenine, histidine และ folic acid และสร้างสารประกอบที่สามารถยับยั้งราสาเหตุโรคได้ ร่วมกับแบคทีเรีย *Bacillus mycoides* ที่สามารถสร้างสารประกอบออกมายับยั้งราและชักนำให้พืชเกิดความต้านทานโรค พบว่าสามารถลดความรุนแรงของโรคได้ดีกว่าการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์แต่ละชนิดอย่างเดียวย่างมีนัยสำคัญ

มีการศึกษาแบคทีเรีย *Bacillus* (Group II; *B. subtilis* group) ในการควบคุมโรคโดยชีววิธีเป็นจำนวนมาก ซึ่งส่วนใหญ่มีกลไกการยับยั้งโรคโดยการสร้างปฏิชีวนสารต่อต้านราและแบคทีเรีย โดยผลิตจาก *B. subtilis* และแบคทีเรียในสกุลใกล้เคียง (Pusey, 1989) Chuang and Ann (1997) ได้นำแบคทีเรียปฏิปักษ์ 4 ชนิด (*Bacillus Subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pichia ohmeri* และ *Sporobolomyces* sp.) และยีสต์อีก 5 ไอโซเลท มาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของมะม่วง ที่เกิดจากรา *Colletotrichum gloeosporioides* โดยนำจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มา

ปลูกลงบนแผลที่ทำไว้บนผลมะม่วงร่วมกับราสาเหตุของโรค พบว่าจุลินทรีย์ปฏิปักษ์สามารถยับยั้งการเกิดแผลลุกลามของโรคได้ โดยขนาดของแผลลดลงเฉลี่ย 20-45 เปอร์เซ็นต์

การศึกษาจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เป็นการค้นหาจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในวงการอุตสาหกรรมหรือเป็นการพัฒนาวิธีการคัดเลือกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์จากสภาพธรรมชาติที่มีศักยภาพเหมาะสมสำหรับการพัฒนาเพื่อนำมาใช้ทดแทนสารเคมีตลอดจนการใช้ในการจัดการโรคพืชแบบผสมผสาน มณฑาทิพย์ (2540) ศึกษาการใช้ยีสต์ในอุตสาหกรรมอาหารควบคุมโรคข้าวผลเน่าบนผลมะม่วงน้ำดอกไม้ พบว่ายีสต์ *Candida tropicalis* สามารถยับยั้งการงอก และความยาว germ tube ของ conidium ของรา *Lasiodiplodia theobromae* ได้ โดยที่ *Candida tropicalis* ไม่สร้างสารพิษในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยราสาเหตุของโรคบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Farungsang et al. (1997, 1998) แยกจุลินทรีย์จากธรรมชาติ แล้วใช้วิธี leaf disk assay เพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่สามารถควบคุมโรคผลเน่าภายหลังการเก็บเกี่ยวของเงาะที่มีสาเหตุจาก *Greeneria* sp. ที่ติดมากับผลเงาะตามธรรมชาติได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทศวรรณ (2547) สามารถคัดเลือกยีสต์ *Candida krusei* และแบคทีเรีย *Bacillus amyloliquefaciens* ที่แยกได้จากทรงพุ่มของต้นเงาะแล้วนำมาใช้ควบคุมโรคผลเน่าในผลไม้ที่เกิดจากเชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae* ได้ผลดี

การศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus megaterium* เชื้อนี้ได้รับการจำแนกไว้ใน Kingdom Bacteria, Phylum Firmicutes, Class Bacilli, Order Bacillales, Family Bacillaceae รูปร่าง rod-shaped, สร้าง endospores, Gram-positive เคลื่อนที่ได้ ได้รับการจัดไว้ในกลุ่ม aerobic bacteria อุณหภูมิในการเจริญเติบโตคือ 25 องศาเซลเซียส เป็น common soil inhabitant ที่ได้รับการพิจารณาว่าไม่เป็นจุลินทรีย์สาเหตุของโรค Biohazard level 1 มีการนำ *B. megaterium* ไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมและการศึกษาวิจัยด้าน biotechnology เช่น การผลิต penicillin, enzymes สำหรับการเปลี่ยนแปลง corticosteroids และ amino acid dehydrogenases หลายชนิด (Anonymous, 2007a,b; Hayden, 2000) ทางกรมเกษตรมีรายงานว่าสามารถนำไปใช้ในรูปแบบของ soil inoculant ยับยั้งเชื้อสาเหตุของโรคพืชในดิน (กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 2010; วีระศักดิ์ และคณะ, 2548)

ศิริรัตน์ (2549) ทำการรวบรวมจุลินทรีย์ผิวพืชจากส่วนช่อดอก ยอด และผลอ่อน จากแหล่งปลูกผลไม้เขตร้อนในภาคกลาง และจังหวัดนครราชสีมา ได้แก่ มะม่วง ลำไย ชมพู่ กระท้อน เงาะ และองุ่น ได้ทั้งหมด 347 ไอโซเลท แบ่งเป็นแยกได้จากอาหาร NGA จำนวน 117 ไอโซเลทเป็น

แบคทีเรียทั้งหมด และแยกได้โดยใช้ enrichment technique ร่วมกับอาหาร GYPA จำนวน 230 ไอโซเลต เป็นยีสต์ 176 ไอโซเลต และแบคทีเรีย 54 ไอโซเลต

การคัดเลือกจุลินทรีย์ปฏิบัติต่อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ในสภาพห้องปฏิบัติการพบว่า จุลินทรีย์ปฏิบัติที่แยกได้จากอาหาร NGA จำนวน 85 ไอโซเลต สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใย เมื่อนำมาทดสอบการยับยั้งการสร้าง fruiting body ของราพบว่าแบคทีเรีย 12 ไอโซเลต ทำให้ราไม่สามารถสร้าง fruiting body ได้ และในจำนวนนี้มี 3 ไอโซเลตของ *B. megaterium* คือ BM-3103, BM-3107 และ BM-3503 ที่สามารถยับยั้งการเข้าทำลายเนื้อเยื่อพืชของรา โดยใช้ใบมะม่วงเป็นพืชทดสอบ ขณะที่การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่แยกได้จากอาหาร NGA พบว่ามีจำนวน 54 ไอโซเลต สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ราได้ดี โดยแบ่งเป็นแบคทีเรีย 25 ไอโซเลต และยีสต์ 30 ไอโซเลต เมื่อนำมาทดสอบการยับยั้งการสร้าง fruiting body และทดสอบการค้ำกันเนื้อเยื่อพืชโดยใช้ผลชมพูเป็นพืชมาทดสอบ สามารถคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการเป็นจุลินทรีย์ปฏิบัติต่อรา *C. gloeosporioides* ได้ 1 ไอโซเลต คือยีสต์ D-4113

การทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิบัติ 4 ไอโซเลต ได้แก่ BM-3103, BM-3107, BM-3503 และ D-4113 ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วงน้ำดอกไม้ โดยวิธีการปลูกเชื้อสาเหตุโรคแบบไม่ทำแผล พบว่ายีสต์ D-4113 และแบคทีเรีย BM-3107 สามารถควบคุมโรคได้ดี เมื่อใช้จุลินทรีย์ก่อนและพร้อมการปลูกราสาเหตุโรคจะมีประสิทธิภาพควบคุมโรคได้ดีกว่าการใช้จุลินทรีย์หลังการปลูกรา จุลินทรีย์ปฏิบัติ 3 ไอโซเลต ได้แก่ BM-3103, BM-3107 และ D-4113 แสดงประสิทธิภาพการควบคุมโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วงโชคอนันต์แต่ไม่เท่ากับการใช้สารเคมี azoxystrobin ความเข้มข้น 500 ppm โดยยีสต์ D-4113 สามารถยับยั้งการเกิดโรคได้ดีกว่าแบคทีเรีย การควบคุมโรคจะมีประสิทธิภาพดีเมื่อทำการควบคุมก่อนและพร้อมการปลูกราสาเหตุโรค และประสิทธิภาพจะลดลงหากทำการควบคุมภายหลังจากการปลูกรา

แบคทีเรียไอโซเลต BM-3103, BM-3107 และ BM-3503 มีกลไกการยับยั้งการงอกและการพัฒนาของเส้นใยของรา *C. gloeosporioides* โดยการผลิต secondary metabolite ทำให้ germ tube และเส้นใยของราโป่งพองและเจริญผิดปกติ และพบว่าการใช้ cell culture มีประสิทธิภาพมากกว่าการใช้ culture filtrate สำหรับยีสต์ปฏิบัติไอโซเลต D-4113 สามารถยับยั้งการงอกและลดความยาวของเส้นใยของราโดยไม่ทำให้เส้นใยเจริญผิดปกติ และการใช้ culture filtrate ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของราได้

โดยทั่วไปเชื่อว่าการควบคุมโรคหลังเก็บเกี่ยวโดยชีววิธีโดยใช้จุลินทรีย์ศัตรูธรรมชาติ (antagonistic microorganisms) มีโอกาสประสบความสำเร็จมากกว่าเมื่อนำมาใช้กับผลไม้ที่เก็บเกี่ยวมาแล้ว แต่จุดอ่อนของการปกป้องผลิตผลที่ทำหลังจากเก็บเกี่ยว (postharvest treatment) คือ จุลินทรีย์ที่นำมาใช้แม้จะมีประสิทธิภาพสูงแต่ก็ไม่สามารถมีประสิทธิผลการเข้าทำลายของเชื้อโรคที่เกิดขึ้นในสภาพแปลงและพักตัวอยู่ในผลไม้ที่เรียกว่า quiescent infections ได้ (Fernandez and Arauz, 1992) ดังนั้นการควบคุมที่ทำในสภาพแปลง (field application) ซึ่งมีจุลินทรีย์ที่ปกคลุมบนผิวของผลทำหน้าที่ป้องกันการเข้าทำลายที่เกิดขึ้นในแปลงน่าจะมีเหตุผลมากกว่า และยังเป็นทางเลือกในการบริหารโรคที่ทำให้เกิดการเน่าเสียของผลไม้ (fruit rots) ที่สามารถยับยั้งเชื้อโรคและแหล่งของเชื้อโรคได้ (Peng and Sutton, 1990; Andrews, 1992; Fokkema, 1993; Smilanick *et al.*, 1993) ความสำเร็จในการควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยวที่เกิดจากการเข้าทำลายแบบ quiescent infections โดยใช้จุลินทรีย์ศัตรูธรรมชาติมีการรายงานในผลไม้เมืองหนาว เช่น การควบคุมโรค Botrytis fruit rot ที่การเข้าทำลายเริ่มต้นที่ส่วนของดอก (Peng *et al.*, 1992; Lima *et al.*, 1997) การลดจำนวน latent infections โดยรา *Monilinia laxa* ใน sweet cherry (Wittig *et al.*, 1997) นอกจากนี้ จุลินทรีย์ศัตรูธรรมชาติที่นำไปใช้ในสภาพแปลงที่สามารถคงทนอยู่บนผิวของผลไม้และแสดงประสิทธิภาพต่อเนื่องครอบคลุมระยะเวลาหลังเก็บเกี่ยว และยังช่วยลดขั้นตอนหลังเก็บเกี่ยวเพื่อการควบคุมโรคซึ่งมีผลต่อเนื่องในการลดความเสียหายของผลิตผลในขบวนการหลังเก็บเกี่ยว โดยเฉพาะอย่างยิ่งผลิตผลที่สรีระของผลไม้เอื้อต่อขบวนการหลังเก็บเกี่ยว (Ben-Arie, *et al.*, 1991)

ในระยะ 20 ปีที่ผ่านมาของงานวิจัยการควบคุมโรคหลังเก็บเกี่ยวโดยการใช้จุลินทรีย์ศัตรูธรรมชาติมีรายงานมากมายเกี่ยวกับการคัดเลือกและทดสอบจุลินทรีย์ในห้องปฏิบัติการ แต่การประสบความสำเร็จเมื่อนำไปใช้น้อย การที่จุลินทรีย์จะประสบความสำเร็จในการควบคุมโรคได้นั้น จุลินทรีย์จะต้องสามารถมีชีวิตอยู่และคงประชากรในทรงพุ่มหรือบนพื้นที่เป้าหมายไว้ในระดับที่สามารถต่อต้านเชื้อโรคได้ ทั้งนี้คุณลักษณะที่เป็นพื้นฐานสำคัญคือความสามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่รุนแรงต่างๆ และการยึดติด (attachment) ของจุลินทรีย์ศัตรูธรรมชาติกับพื้นที่ที่เป็นเป้าหมายของการปกป้องบนพืช และรายงานในเรื่องเหล่านี้ยังมีน้อย (Wilson and Wisniewski, 1994; Ippolito and Nigro, 2000; Wisniewski *et al.*, 2007; Droby, *et al.*, 2009)

โดยทั่วไปจุลินทรีย์กลุ่มแบคทีเรียอาจอ่อนแอต่อสภาพแวดล้อมที่รุนแรงได้น้อยกว่ารา แต่ในสภาพที่มี free water หรือมีความชื้นสูงแบคทีเรียบางชนิด เช่นแบคทีเรียสกุล *Pseudomonas* และ *Bacillus* อาจควบคุม necrotrophic pathogens ในแปลง (Blakeman and Fokkema, 1982) ได้ดี

พอกับการควบคุม postharvest diseases (Korsten *et al.*, 1994; Leibinger, *et al.*, 1997) Yeast extract-like fungi *A. pullulans* มีการผลิต extracellular polysaccharide ซึ่งถูกพบว่ามียับยั้งการเกาะติดพื้นผิวของจุลินทรีย์ (Andrews, *et al.*, 1994) divalent cations อย่าง Mg^{2+} และ Ca^{2+} ทำให้แบคทีเรียสามารถติดอยู่กับผิวพืชได้ดีขึ้นเนื่องจากประจุดังกล่าวมีผลในการลด electrostatic repulsion force บนผิวของพืช (Fletcher, 1980) วิธีการที่ทำให้ประชากรและความอยู่รอดของจุลินทรีย์ศัตรูธรรมชาติเพิ่มขึ้นย่อมมีผลทางด้านการประสิทธิภาพที่เพิ่มขึ้นของจุลินทรีย์ศัตรูธรรมชาติเมื่อนำไปใช้ในสภาพแปลง เช่น ความถี่ในการพ่นทรงพุ่ม การเตรียมจุลินทรีย์ศัตรูธรรมชาติแบบแขวนลอยในธาตุอาหารที่เหมาะสม การเติมเกลือลงในอาหารที่ใช้เพิ่มประชากรจุลินทรีย์ศัตรูธรรมชาติ การเติม xanthan gum หรือ chitosan ลงในแขวนลอยของจุลินทรีย์ศัตรูธรรมชาติที่นำไปพ่นให้แก่ทรงพุ่ม (Fokkema *et al.*, 1979; Fokkema, 1993; De Cal, *et al.*, 1990; Ippolito and Nigro, 2000)

การปฏิบัติหลังเก็บเกี่ยวเพื่อควบคุมโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วงมีวัตถุประสงค์เพื่อลดระดับ quiescent infection บนผล วิธีการที่ใช้ทางการค้าต่อเนื่องกันมาคือการใช้สารเคมีหรือน้ำร้อนหรือใช้ 2 วิธีร่วมกัน (McMillan, Jr., 1987) ซึ่งการใช้สารเคมีหลังบนผลมะม่วงหลังเก็บเกี่ยวไม่สามารถนำมาใช้กับมะม่วงที่จะส่งออกไปยังบางประเทศ เช่น อเมริกา และยุโรป การทำ hot water treatment นาน 3-15 นาที โดยใช้อุณหภูมิของน้ำ 50-55 องศาเซลเซียส การใช้สารเคมีบางชนิดสามารถเป็นที่ยอมรับได้ เช่น Thiabendazole (1000-2000 ppm) Prochloraz (ไม่เกิน 1000 ppm) ให้ผลในการลดโรค 65-94% เมื่อมีระดับการทำลายปานกลาง (Arauz, 2000)

งานวิจัยการควบคุมโรคแอนแทรคโนสบนมะม่วงภายหลังการเก็บเกี่ยวโดยชีววิธีเท่าที่มีรายงานส่วนใหญ่เป็นการแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์ศัตรูธรรมชาติที่ยับยั้งการเจริญของรา *C. gloeosporioides* รวมทั้งการทดสอบการยับยั้งการพัฒนามของโรคบนผลมะม่วงที่เก็บเกี่ยวแล้วในห้องปฏิบัติการด้วยวัตถุประสงค์เพื่อการใช้แบบ postharvest application ปัจจุบันงานวิจัยการนำจุลินทรีย์ศัตรูธรรมชาติที่คัดเลือกได้ไปใช้ในสภาพแปลง (preharvest application) เพื่อลดการเข้าทำลายโดยเชื้อโรคมีน้อยมาก จุลินทรีย์เพียงไม่กี่ที่ได้รับการพัฒนาเป็นการค้า แต่มักไม่ประสบความสำเร็จเมื่อนำไปใช้ในสภาพแปลง (Jeffries and Koomen, 1992; Arauz, 2000; Droby *et al.*, 2009) งานวิจัยในสหราชอาณาจักรคัดเลือกได้ไอโซเลทของแบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescens* และ *Bacillus cereus* แต่ *P. fluorescens* เท่านั้นที่มีประสิทธิภาพบนผลมะม่วง ส่วน *Bacillus cereus* รวมทั้งการใช้จุลินทรีย์ 2 ชนิดร่วมกันไม่สามารถลดการพัฒนาของโรคได้ (Koomen and Jeffries,

1993) ในเอธิโอเปียไอโซเลทของ *Brevundimonas diminuta*, *Stenotrophomonas maltophilia*, Enterobacteriaceae, *Candida membranifaciens* มีประสิทธิภาพเท่ากับ hot water treatment ในการลดความรุนแรงของโรคแอนแทรกโนส (Kefialew and Ayalew, 2008) งานวิจัยของ Fernández and Arauz (1992) แสดงให้เห็นว่าการนำจุลินทรีย์ศัตรูธรรมชาติไปใช้หลังการเข้าทำลายของรา *C. gloeosporioides* ไม่สามารถยับยั้งการพัฒนาของโรคแอนแทรกโนสบนผลมะม่วง วิธีการคัดกรองเป็นผลกระทบหลักต่อจุลินทรีย์ที่เป็นผลลัพธ์ที่จะนำไปใช้ ดังนั้นเพื่อให้ postharvest biocontrol agents ทำงานภายใต้สภาพที่เป็นการค้า วิธีการคัดกรองอาจจำเป็นต้องสะท้อนสภาพความเป็นจริงที่ antagonist จะต้องเผชิญ (Droby *et al.*, 1993, 2000; Wisniewski *et al.*, 2001) *Bacillus megaterium* ไอโซเลท 3103 เป็นจุลินทรีย์ที่ได้รับการคัดกรองและทดสอบภายใต้สภาพแวดล้อมที่ใกล้เคียงกับขบวนการเข้าทำลายของรา *C. gloeosporioides* และแสดงศักยภาพให้เห็นในการทดสอบเบื้องต้นในสภาพแปลง (อุดม และคณะ, 2551; ศันสนีย์ และคณะ, 2553; Farungsang *et al.*, 2013)

การสร้างปฏิชีวนสารเป็น mode of action ที่สำคัญของแบคทีเรียที่เรียกว่าจะไม่เหมาะกับการนำมาใช้กับผลิตผลหลังการเก็บเกี่ยวที่ใช้เป็นอาหาร (Fokkema and Lorbeer, 1974) แต่ก็สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการควบคุมการเข้าทำลายของเชื้อโรคในสภาพแปลงได้ เนื่องจากสภาพแวดล้อมบนผิวพืชที่อยู่ในแปลง ทำให้ปฏิชีวนสารที่ถูกสร้างขึ้นมักถูกทำลายโดยสภาพธรรมชาติ โดยการย่อยสลายของจุลินทรีย์ที่อยู่บนผิวพืช การดูดซับของใบพืช และการสูญเสียไปในบรรยากาศ ไม่ตกค้างมาถึงช่วงเวลาหลังเก็บเกี่ยวได้ (Blakeman, 1985; Atlas and Bartha, 1987; Sequira, 1987; Singh and Faull, 1988)

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การทดสอบทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีบางประการของ *Bacillus megaterium* ไอโซเลต 3103 (BM-3103)

BM-3103 ได้จากงานวิจัยของศิริรัตน์ และคณะ (2549) และเก็บรักษาในสภาพ under mineral oil อุณหภูมิ 15 °C ที่ฝ่ายปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง สถาบันวิจัยและพัฒนา กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

นำ BM-3103 มาศึกษาการติดสีแกรม (Gram's stain) รูปร่างลักษณะเซลล์ (cell morphology) การสร้างเอนโดสปอร์ (endospore formation) การย่อยแป้ง และการย่อยสลาย คาร์โบไฮเดรต ตามกระบวนการจัดจำแนกชนิดแบคทีเรียของ The Burgey's Manual of Systematic Bacteriology Vol.2 (Brenner *et al.*, 2004)

2. การทดสอบประสิทธิภาพของ BM-3103 ในการควบคุมการเข้าทำลายโดยรา *Colletotrichum gloeosporioides* ในสภาพแปลง

2.1 การเตรียม cell culture ตั้งต้น และการเพิ่มปริมาณ BM-3103

เตรียม cell culture ตั้งต้น (starter) โดยการนำ BM-3103 ที่เจริญบนอาหาร Glucose Yeast extract peptone Agar (GYPA) อายุ 48 ชั่วโมง มาเลี้ยงในอาหาร GYPB วางบนเครื่องเขย่า (horizontal shaker) ในสภาพอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15-20 ชั่วโมง เพิ่มปริมาณ BM-3103 โดยการนำ cell culture ตั้งต้นปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมลงในอาหาร Glucose Yeast extract peptone Broth (GYPB) ปริมาตร 250 มิลลิลิตร วางบนเครื่องเขย่า (horizontal shaker) ในสภาพอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15-20 ชั่วโมง

2.2 การทดสอบประสิทธิภาพของ BM-3103 ในการควบคุมการเข้าทำลายโดยรา

Colletotrichum gloeosporioides ในสภาพแปลง

โดยการฉีดพ่นทรงพุ่มต้นมะม่วงด้วย BM-3103 ทุก 14 วัน ตั้งแต่ระยะออกดอกจนกระทั่งเก็บเกี่ยวผลแก่ (mature green) การฉีดพ่นเน้นที่ช่อดอกและผลอ่อน จำนวนต้นที่ใช้ทดลองประเมินจากจำนวนผลที่คาดว่าจะเก็บเกี่ยวได้เพียงพอต่อการประเมินผลการปรากฏของโรคแอนแทรคโนสหลังการเก็บเกี่ยว

2.2.1 แปลงทดลองที่ 1 พื้นที่สวนมะม่วงของเกษตรกร อ. สามชุก จ. สุพรรณบุรี (คุณสมหมาย วิโรปการ) พื้นที่ทดลองเป็นมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ อายุประมาณ 8-10 ปี ทรงพุ่มต้นสูงปลูกแบบขร่อง มีน้ำตามร่องสวน กรรมวิธีการฉีดพ่นดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ฉีดพ่น cell culture ของ BM-3103 ที่ผสมกับอาหาร GYPB ในอัตรา 1:1 โดยปริมาตร

กรรมวิธีที่ 2 ฉีดพ่นน้ำ

ทำการฉีดพ่นโดยใช้เครื่องพ่นแบบอัดลม เก็บเกี่ยวผลมะม่วงระยะแก่จัด (mature green) ด้วยกรรไกรตัดแต่ง โดยไม่ให้ผลมะม่วงสัมผัสพื้นดิน เก็บผลมะม่วงไว้ในสภาพชื้นที่อุณหภูมิห้อง (สภาพที่เอื้อต่อการพัฒนาของโรค) ตรวจและบันทึกผลการเกิดโรคแอนแทรคโนสทุก 24 ชั่วโมง ประเมินผลโดยใช้พื้นที่ผิวของผลที่ปรากฏอาการโรคแอนแทรคโนสด้วยสายตา (ภาพที่ 1)

2.2.2 แปลงทดลองที่ 2 พื้นที่แปลงมะม่วง ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน ต้นมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ อายุประมาณ 5 ปี ทำการ hard pruning และย้ายปลูกในขอบซีเมนต์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง x สูง ประมาณ 1 x 1 เมตร² ทรงพุ่มต้นเตี้ยเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3 เมตร กรรมวิธีการฉีดพ่นดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 นีดพ่น cell culture ของ BM-3103 ที่ผสมกับอาหาร GYPB ใน อัตรา 1:1 โดยปริมาตร

กรรมวิธีที่ 2 นีดพ่นน้ำ

การทดลองใช้ต้นมะม่วงกรรมวิธีละ 6 ต้น จำนวนต้นมะม่วงที่ใช้ทดลอง ทั้งหมด 12 ต้น ทำการนิตพ่นโดยใช้เครื่องพ่นแบบอัดลม เก็บเกี่ยวผลมะม่วงระยะแก่จัด (mature green) ด้วยกรรไกรตัดแต่ง โดยไม่ให้ผลมะม่วงสัมผัสพื้นดิน เก็บผลมะม่วงไว้ในสภาพชื้นที่ อุณหภูมิห้อง (สภาพที่เอื้อต่อการพัฒนาของโรค) ตรวจและบันทึกผลการเกิดโรคแอนแทรคโนส ทุก 24 ชั่วโมง ประเมินผลโดยใช้พื้นที่ผิวของผลที่ปรากฏอาการ โรคแอนแทรคโนสด้วยสายตา (ภาพที่ 1)

2.2.3 แปลงทดลองที่ 3 พื้นที่สวนมะม่วงของเกษตรกร อ. สามโก้ จ. อ่างทอง (คุณ สุนทร สมามิมงคล) พื้นที่สวนเป็นแบบยกร่อง มีน้ำตามร่องสวน ต้นมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ อายุ ประมาณ 5 ปี ทรงพุ่มต้นเตี้ยเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2 เมตร กรรมวิธีการนิตพ่นดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 นีดพ่น cell culture ของ BM-3103 ที่ผสมกับอาหาร GYPB ใน อัตรา 1:1 โดยปริมาตร

กรรมวิธีที่ 2 นีดพ่นน้ำ

การทดลองใช้ต้นมะม่วงกรรมวิธีละ 8 ต้น จำนวนต้นมะม่วงที่ใช้ทดลอง ทั้งหมด 16 ต้น ทำการนิตพ่นโดยใช้เครื่องพ่นแบบอัดลม เก็บเกี่ยวผลมะม่วงระยะแก่จัด (mature green) ด้วยกรรไกรตัดแต่ง โดยไม่ให้ผลมะม่วงสัมผัสพื้นดิน เก็บผลมะม่วงไว้ในสภาพชื้นที่ อุณหภูมิห้อง (สภาพที่เอื้อต่อการพัฒนาของโรค) ตรวจและบันทึกผลการเกิดโรคทุก 24 ชั่วโมง ประเมินผลโดยใช้พื้นที่ผิวของผลที่ปรากฏอาการ โรคแอนแทรคโนสด้วยสายตา (ภาพที่ 1)

2.2.4 แปลงทดลองที่ 4 พื้นที่สวนมะม่วงของเกษตรกร อ. สามโก้ จ. อ่างทอง (คุณ สุนทร สมามิมงคล) พื้นที่ทดลองเป็นมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้สีทอง อายุประมาณ 2 ปี ปลูกแบบยก

ร่อง มีแนวร่องน้ำระหว่างแถว ขนาดของทรงพุ่มโดยประมาณคือเส้นผ่าศูนย์กลาง 1-1.5 เมตร สูง 1.5-2 เมตร กรรมวิธีการฉีดพ่นดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ฉีดพ่น cell culture ของ BM-3103 ที่ผสมกับอาหาร GYPB ในอัตรา 1:1 โดยปริมาตร

กรรมวิธีที่ 2 ฉีดพ่นอาหาร GYPB เพื่อศึกษาผลกระทบของ GYPB ที่อาจมีต่อเชื้อจุลินทรีย์ประจำถิ่นในทรงพุ่มต้นมะม่วง

กรรมวิธีที่ 3 ฉีดพ่นน้ำเพื่อศึกษาผลกระทบของความชื้นที่เกิดจากการฉีดพ่นกรรมวิธีที่ 1 และ 2 ที่อาจมีผลต่อการเข้าทำลายโดยราที่เป็นสาเหตุของโรค

การทดลองใช้ต้นมะม่วงกรรมวิธีละ 10 ต้น จำนวนต้นมะม่วงที่ใช้ทดลองทั้งหมด 30 ต้น ทำการฉีดพ่นโดยใช้เครื่องพ่นแบบอัดลม โดยเน้นต้นที่ช่อดอก และผลของมะม่วงเก็บเกี่ยวผลมะม่วงระยะแก่จัด (mature green) ด้วยกรรไกรตัดแต่ง โดยไม่ให้ผลมะม่วงสัมผัสพื้นดิน เก็บผลมะม่วงไว้ในสภาพชื้นที่อุณหภูมิห้อง (สภาพที่เอื้อต่อการพัฒนาของโรค) ตรวจและบันทึกผลการเกิดโรคแอนแทรคโนส ทุก 24 ชั่วโมง ประเมินผลโดยใช้พื้นที่ผิวของผลที่ปรากฏอาการโรคแอนแทรคโนสด้วยสายตา (ภาพที่ 1) และจำนวนผลที่เป็นโรคเป็นดัชนี โดยเริ่มบันทึกผลพื้นที่ที่อาการของโรคปรากฏ วิเคราะห์การพัฒนาของโรคที่บันทึกวันที่ 7 และ 9 ตามวิธี

Duncan's multiple range test

2.2.5 แปลงทดลองที่ 5 พื้นที่สวนมะม่วงของเกษตรกร อ. บ้านแพ้ว จ. สมุทรสาคร (คุณ สมรัก โชติสวัสดิ์) แปลงทดลองเป็นมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ อายุประมาณ 10 ปี ขนาดทรงพุ่มโดยประมาณคือเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 เมตร สูง 4 เมตร ปลูกแบบขร่อง และมีน้ำตามร่องสวน มีกรรมวิธีดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ฉีดพ่น cell culture ของ BM-3103 ที่ผสมกับอาหาร GYPB ในอัตรา 1:1 โดยปริมาตร

กรรมวิธีที่ 2 นิดพ่นน้ำ

การทดลองใช้ต้นมะม่วงกรรมวิธีละ 5 ต้น จำนวนต้นมะม่วงที่ใช้ทดลองทั้งหมด 10 ต้น ทำการฉีดพ่นทั้งทรงพุ่มด้วยเครื่องยนต์ นิดพ่นตั้งแต่ ตุลาคม – ธันวาคม 2552 รวมการพ่นทั้งหมด 4 ครั้ง โดยเน้นต้นที่ช่อดอก และผลของมะม่วง เก็บเกี่ยวผลมะม่วงระยะแก่จัด (mature green) ด้วยกรรไกรตัดแต่ง โดยไม่ให้ผลมะม่วงสัมผัสพื้นดิน เก็บผลมะม่วงไว้ในสภาพชื้นที่อุณหภูมิห้อง (สภาพที่เอื้อต่อการพัฒนาของโรค) ตรวจสอบบันทึกผลการเกิดโรคทุก 48 ชั่วโมง ประเมินผลโดยใช้พื้นที่ผิวของผลที่ปรากฏอาการโรคแอนแทรคโนสด้วยสายตา (ภาพที่ 1) และจำนวนผลที่เป็นโรคเป็นดัชนี โดยเริ่มบันทึกผลทันทีที่อาการของโรคปรากฏ วิเคราะห์การพัฒนาของโรคที่บันทึกวันที่ 9 และ 11 ตามวิธี Duncan's multiple range test



ภาพที่ 1 ระดับการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วง

- ก. เกิดโรคแอนแทรคโนส 7 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ผิวของผล
- ข. เกิดโรคแอนแทรคโนส 12 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ผิวของผล
- ค. เกิดโรคแอนแทรคโนส 20 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ผิวของผล
- ง. เกิดโรคแอนแทรคโนส 40 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ผิวของผล
- จ. เกิดโรคแอนแทรคโนส 80 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ผิวของผล

3. การศึกษาความอยู่รอดของประชากร *Bacillus megaterium* ไอโซเลท 3103 (BM-3103) ในทรงพุ่มมะม่วง

ทำการทดลองที่แปลงทดลองภาควิชาโรคพืช มะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ ปลูกในขอบซีเมนต์ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง x สูง ประมาณ 1 x 1 เมตร² ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางทรงพุ่มประมาณ 2 เมตร ระยะระหว่างต้นประมาณ 3 x 3 เมตร² ทำการทดลองตั้งแต่เดือนตุลาคมถึงเดือนธันวาคม 2551 ใช้ต้นมะม่วง 6 ต้น แบ่งเป็น 2 กรรมวิธี คือ กรรมวิธีฉีดพ่นทรงพุ่มด้วย BM-3103 จำนวน 3 ต้น และไม่ฉีดพ่น 3 ต้น การฉีดพ่นทรงพุ่มด้วย BM-3103 โดยการนำ cell culture ของ BM-3103 ที่เตรียมตามกรรมวิธีในขั้นตอน 1.1 ผสมกับอาหาร GYPB ให้เข้ากันในอัตรา 1:1 แล้วนำไปฉีดพ่นให้ทั่วทั้งทรงพุ่ม ด้วยเครื่องพ่นแบบอัดลม ทำการฉีดพ่นซ้ำเมื่อระดับประชากร BM-3103 ลดลงจนมีระดับเท่ากับจุลินทรีย์ประจำถิ่นในทรงพุ่ม

วิเคราะห์ประชากรของ BM-3103 ในทรงพุ่มหลังการฉีดพ่นแต่ละครั้ง โดยการสุ่มเก็บใบมะม่วงจำนวน 3 ใบต่อ 1 ต้น สุ่มตัดพื้นที่ใบที่เก็บมาให้มีขนาดประมาณ 1 ตารางนิ้ว ใบละ 1 ชิ้น นำมาแช่ในแนวระนาบในสารละลาย NaCl 0.8% ปริมาตร 20 มิลลิลิตร หลังจากนั้นตรวจนับจำนวนประชากรของ BM-3103 ในสารละลาย NaCl 0.8% ด้วยวิธี dilution plate method โดยใช้อาหาร GYPB

4. การทดลองเพิ่มความสามารถในอยู่รอดของ *Bacillus megaterium* ไอโซเลท 3103 (BM-3103) ในทรงพุ่มมะม่วง โดยการดัดแปลงอาหารที่ใช้เลี้ยง

สูตรอาหารที่ใช้เพิ่มปริมาณ BM-3103

1. อาหาร GYPB
2. อาหาร GYPB ดัดแปลงโดยใช้น้ำตาล trehalose แทน glucose (TYPB)
3. อาหาร GYPB ที่เติม xanthan gum 0.05% (GYPB+Xg)

ทำการทดลองที่แปลงทดลองภาควิชาโรคพืช มะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ ปลูกในขอบซีเมนต์ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง x สูง ประมาณ 1 x 1 เมตร² ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางทรงพุ่มประมาณ 2 เมตร

ระยะระหว่างต้นประมาณ 3 x 3 เมตร² ทำการทดลองตั้งแต่เดือนธันวาคม 2555 ถึงเดือนมกราคม 2556 ใช้ต้นมะม่วง 12 ต้น แบ่งเป็น 4 กรรมวิธีดังนี้

กรรมวิธีที่ 1, 2 และ 3 ฉีดพ่นทรงพุ่มด้วย cell culture ของ BM-3103 ที่เลี้ยงด้วยอาหาร GYPB, TYPB และ GYPB+Xg ตามลำดับ โดยนำ cell culture ผสมกับอาหาร GYPB ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร แต่ละกรรมวิธีใช้ต้นมะม่วงจำนวน 3 ต้น

กรรมวิธีที่ 4 ไม่ฉีดพ่นทรงพุ่ม

ฉีดพ่นทั่วทั้งทรงพุ่มด้วยเครื่องพ่นแบบอัดลม ทำการฉีดพ่นซ้ำเมื่อระดับประชากร BM-3103 ลดลงจนมีระดับเท่ากับจุลินทรีย์ประจำถิ่นในทรงพุ่ม วิเคราะห์ประชากรของ BM-3103 ในทรงพุ่มหลังการฉีดพ่นแต่ละครั้งเป็นเวลา 3 วัน โดยการสุ่มเก็บใบมะม่วงจำนวน 3 ใบต่อ 1 ต้น สุ่มตัดพื้นที่ใบที่เก็บมาให้มีขนาดประมาณ 1 ตารางนิ้ว ใบละ 1 ชิ้น นำมาแช่ในแวนเนนาบในสารละลาย NaCl 0.8% ปริมาตร 20 มิลลิลิตร หลังจากนั้นตรวจนับจำนวนประชากรของ BM-3103 ในสารละลาย NaCl 0.8% ด้วยวิธี dilution plate method โดยใช้อาหาร GYPB

5. สถานที่ทำการวิจัย

5.1 ห้องปฏิบัติการ และแปลงทดลอง ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

5.2 สวนมะม่วงของเกษตรกร อำเภอสามชุก จังหวัดสุพรรณบุรี (คุณ สมหมาย วิโรปการ)

5.3 แปลงมะม่วง ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน

5.4 สวนมะม่วงของเกษตรกร อำเภอสามโก้ จังหวัดอ่างทอง (คุณ สุนทร สมามิมงคล)

5.5 สวนมะม่วงของเกษตรกร อำเภอบ้านแพ้ว จังหวัดสมุทรสาคร (คุณ สมรัก โชติสวัสดิ์)

6. ระยะเวลาทำการทดลอง

พฤษภาคม 2551 ถึง กุมภาพันธ์ 2556



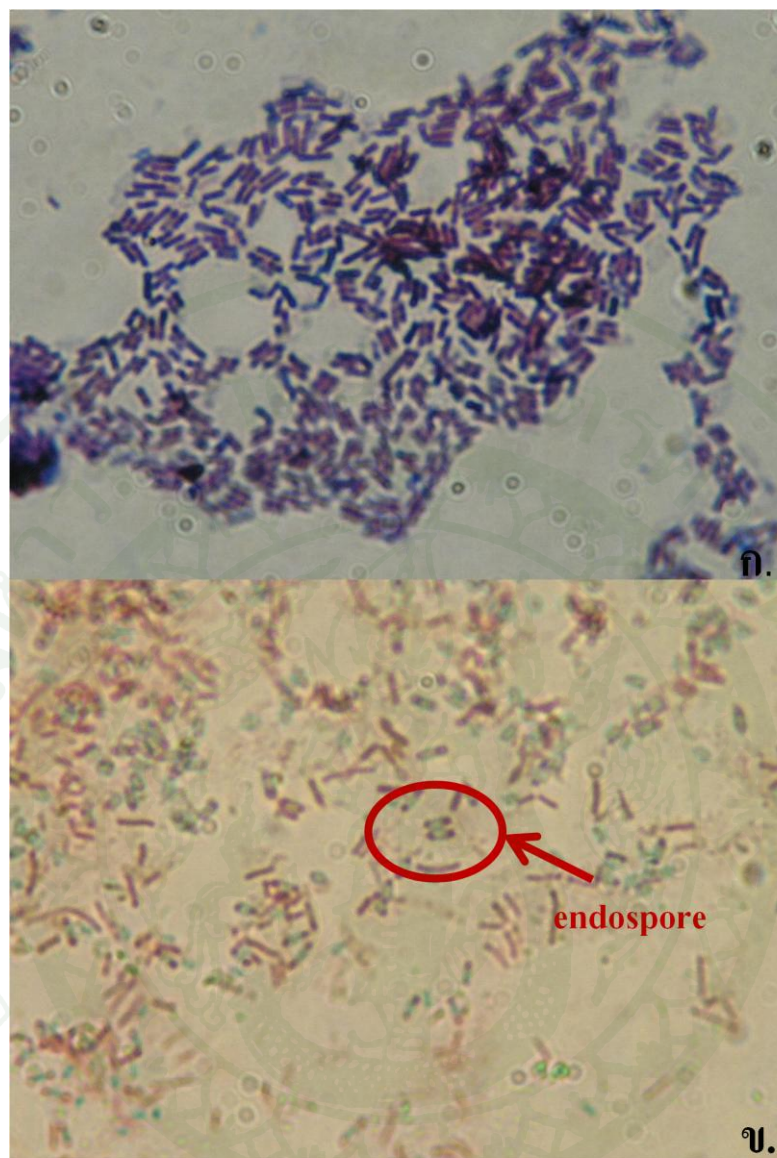
ผลและวิจารณ์

ผล

1. การทดสอบทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีบางประการของ *Bacillus megaterium* ไอโซเลต 3103 (BM-3103)

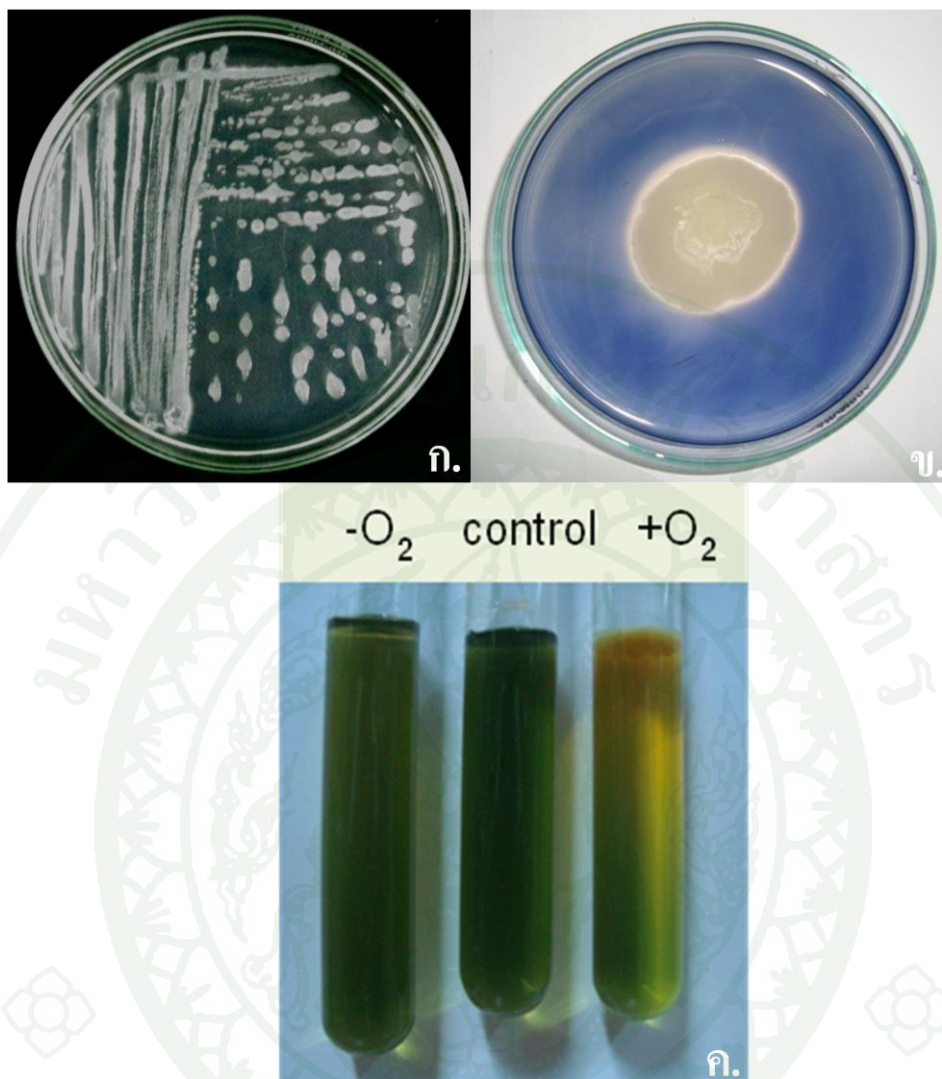
การทดสอบ Gram's strain reaction พบว่า BM-3103 ติดสีม่วงของ crystal violet (ภาพที่ 2) แสดงว่าเป็นแบคทีเรียแกรมบวก (gram positive) เมื่อนำมาทดสอบกับ 3% KOH พบว่าไม่เกิดลักษณะยัดหนืด ซึ่งเป็นลักษณะของแบคทีเรียแกรมบวก

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ BM-3103 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่า ลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Cultural characteristic) โคโลนีเจริญบนอาหาร GYPa มีลักษณะโคโลนีมีสีขาว ผิวหน้าเรียบ รูปร่างโคโลนีไม่แน่นอน (ภาพที่ 3) ลักษณะของเซลล์รูปร่างท่อนยาว เรียงต่อกันเป็นสาย สร้างเอนโดสปอร์รูปร่างรีที่บริเวณกลางเซลล์ (ภาพที่ 2) ผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการ พบว่าสามารถใช้คาร์โบไฮเดรตแบบ oxidation เกิดขึ้นในสภาพที่มีออกซิเจน และสามารถย่อยแป้งได้ (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 2 ผลการทดสอบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาของ *Bacillus megaterium* ไอโซเลท 3103 (BM-3103)

- ก. BM-3103 ติดสีม่วงของ crystal violet ในการย้อมสีแบบแกรม รูปร่างเซลล์เป็นท่อนยาวเรียงต่อกันเป็นสาย (1,000 x)
- ข. จากเทคนิคการย้อมจะเห็นติดสีเขียวของ malachite green ชัดเจน BM-3103สร้างเอนโดสปอร์รูปร่างรีบริเวณกลางเซลล์ (1,000 x)



ภาพที่ 3 ผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อของ *Bacillus megaterium* ไอโซเลท 3103 (BM-3103)

ก. ลักษณะโคโลนีบนผิวหน้าอาหาร GYP อายุ 24 ชั่วโมง โคโลนีมีลักษณะสีขาว ผิวหน้าเรียบ รูปร่างโคโลนีไม่แน่นอน

ข. คุณสมบัติการย่อยแป้งของ BM-3103 เมื่อหยด iodine solution ลงในอาหาร เกิด clear zone รอบโคโลนี

ค. การทดสอบการใช้คาร์โบไฮเดรตของ BM-3103 เกิดขึ้นสภาพที่มีออกซิเจนเนื่องจากอาหารในหลอดที่มีออกซิเจนเปลี่ยนเป็นสีเหลือง

2. การทดสอบประสิทธิภาพของ BM-3103 ในการควบคุมการเข้าทำลายโดยรา *Colletotrichum gloeosporioides* ในสภาพแปลง

2.1 การเตรียม cell culture ของ BM-3103

cell culture ของ BM-3103 ที่เลี้ยงในอาหาร GYPB ในสภาพอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15-20 ชั่วโมง เมื่อผสมกับอาหาร GYPB ในอัตรา 1:1 มีจำนวนเซลล์ที่ตรวจนับได้ประมาณ 7.1×10^6 cfu/mL

2.2 การทดสอบประสิทธิภาพของ BM-3103 ในการควบคุมการเข้าทำลายของรา *Colletotrichum gloeosporioides* ในสภาพแปลง

2.2.1 แปลงทดลองที่ 1 พื้นที่ทดลอง: สวนมะม่วงของเกษตรกร อำเภอสามชุก จังหวัดสุพรรณบุรี (คุณ สมหมาย วิโรปการ) ทำการทดลองตั้งแต่เดือนมีนาคมถึงเมษายน 2551 รวมการพ่นทั้งหมด 3 ครั้ง

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของ BM-3103 ในการทดลอง พบว่าไม่สามารถประเมินผลการปรากฏของโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วงหลังเก็บเกี่ยวได้ เนื่องจากการทำลายของแมลงวันผลไม้ (แมลงวันทอง) รบกวนการประเมินผลการปรากฏของโรคแอนแทรคโนส

2.2.2 แปลงทดลองที่ 2 พื้นที่ทดลอง: แปลงมะม่วง ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน เริ่มฉีดพ่น BM-3103 ตั้งแต่กรกฎาคม 2551 ถึงเมษายน 2552 รวมการพ่นทั้งหมด 11 ครั้ง

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของ BM-3103 ในการทดลอง พบว่าไม่สามารถประเมินผลการปรากฏของโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วงหลังเก็บเกี่ยวได้ เนื่องจากผลผลิตต่ำมาก (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 ผลมะม่วงที่เก็บเกี่ยวจากแปลงมะม่วง ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน
ผลผลิตต่ำ และรูปร่างผลไม่สมบูรณ์

2.2.3 แปลงทดลองที่ 3 พื้นที่ทดลอง: สวนมะม่วงของเกษตรกร อำเภอสามโก้ จังหวัดอ่างทอง (คุณ สุนทร สมาริมงคล) เริ่มฉีดพ่น BM-3103 เดือนมกราคม 2552 รวมการพ่นทั้งหมด 2 ครั้ง

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของ BM-3103 ในการทดลอง พบว่าไม่สามารถประเมินผลการปรากฏของโรคแอนแทรกโนบนผลมะม่วงหลังเก็บเกี่ยวทดลองได้ เนื่องจากหลังจากการฉีดพ่น BM-3103 ครั้งที่ 2 สวนมะม่วงถูกเพลิงไหม้ เข้าทำลายทำให้ผลมะม่วงเสียหายและร่วงตั้งแต่ระยะผลอ่อน (ภาพที่ 5) ทำให้ไม่มีผลผลิต



ภาพที่ 5 ความเสียหายของผลมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ในสวนของเกษตรกร อำเภอสามโก้ จังหวัดอ่างทอง (คุณ สุนทร สมาริมงคล) ที่ถูกเพลิงไหม้เข้าทำลายระหว่างการดำเนินงานวิจัยในฤดูเก็บเกี่ยวปี 2552

2.2.4 แปลงทดลองที่ 4 พื้นที่ทดลอง: สวนมะม่วงของเกษตรกร อำเภอสามโก้ จังหวัดอ่างทอง (คุณ สุนทร สมาริมงคล) เริ่มฉีดพ่น BM-3103 ตั้งแต่เดือนมกราคมถึงเดือนเมษายน 2552 รวมการพ่นทั้งหมด 4 ครั้ง

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของ BM-3103 พบว่าค่าเฉลี่ยของพื้นที่ผิวของผลที่ปรากฏอาการของโรคแอนแทรคโนสในวันที่ 7 ของการปรากฏอาการของโรคคือ 39.47, 53.02, และ 59.29% และเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (9 วัน) คือ 50.24, 69.57, และ 75.75% ในการทดลองที่พ่นด้วย BM-3103, GYPB และน้ำ ตามลำดับ (ตารางที่ 1) จำนวนผลที่ปรากฏอาการของโรคในวันที่ 7 ของการปรากฏอาการของโรคคือ 78.85, 94.44, และ 92.31% ในการทดลองที่พ่นด้วย BM-3103, GYPB, และน้ำ ตามลำดับ (ตารางที่ 2) และเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (9 วัน) ผลมะม่วงที่เก็บเกี่ยวจากการทดลองที่พ่นด้วย BM-3103 มีผลที่เป็นโรค 88.14% ขณะที่ในการทดลองที่พ่นด้วยน้ำและ GYPB เป็นโรคทั้งหมด (ตารางที่ 2 และภาพที่ 6)

ตารางที่ 1 ผลของการฉีดพ่นทรงพุ่มด้วย BM-3103 ต่อการปรากฏของโรคแอนแทรคโนสบนผล
มะม่วงหลังเก็บเกี่ยว แปลงทดลองที่ 4 (อ. สามโก้ จ. อ่างทอง) มะม่วงน้ำดอกไม้สีทอง
ฤดูการเก็บเกี่ยวปี 2552

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

* ข้อมูลบันทึกเมื่ออาการของโรคแอนแทรคโนสปรากฏเป็นครั้งแรก

¹ วันที่อาการของโรคแอนแทรคโนสปรากฏเป็นครั้งแรก

^{1/} ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95

เปอร์เซ็นต์ตามวิธี Duncan's multiple range test

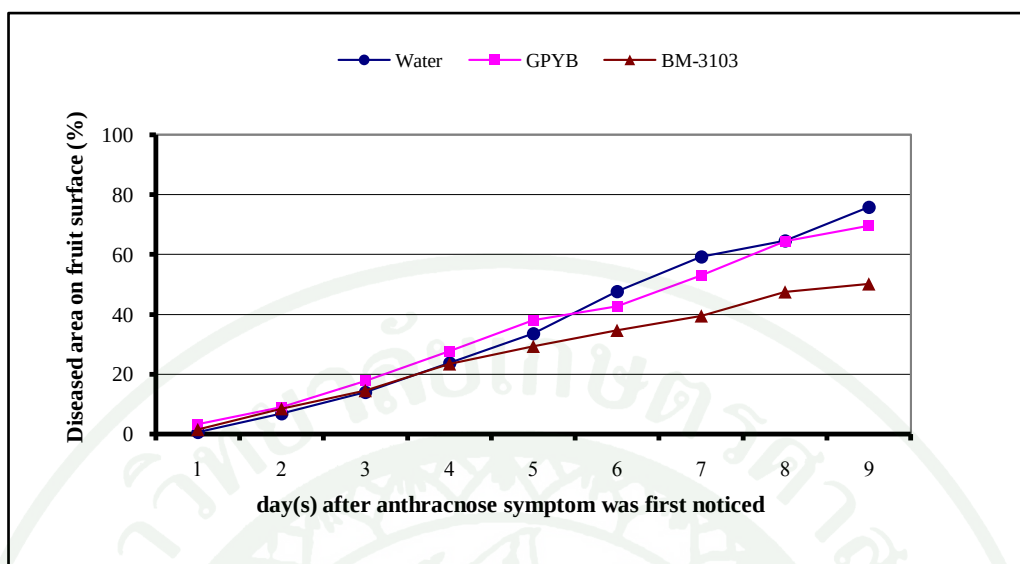
ตารางที่ 2 ผลของการฉีดพ่นทรงพุ่มด้วย BM-3103 ต่อจำนวนผลมะม่วงหลังเก็บเกี่ยวที่ปรากฏ
อาการของโรคแอนแทรกโนส แปลงทดลองที่ 4 (อ. สามโก้ จ. อ่างทอง) มะม่วง
น้ำดอกไม้สีทอง ฤดูการเก็บเกี่ยวปี 2552

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

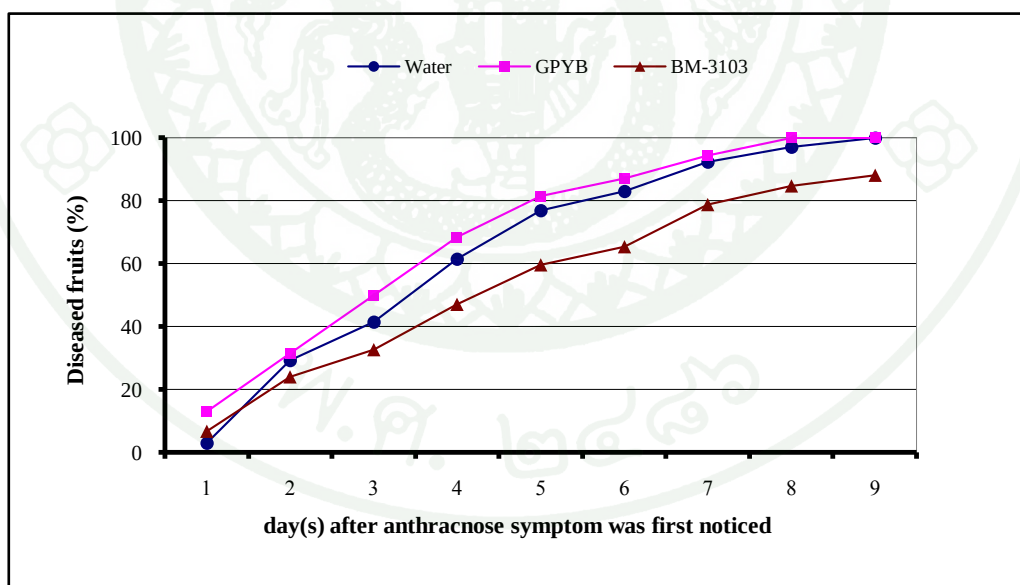
* ข้อมูลบันทึกเมื่ออาการของโรคแอนแทรกโนสปรากฏเป็นครั้งแรก

¹ วันที่อาการของโรคแอนแทรกโนสปรากฏเป็นครั้งแรก

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



ภาพที่ 6 ผลของการฉีดพ่นทรงพุ่มด้วย BM-3103 ต่อการปรากฏของโรคแอนแทรกโนสบนผลมะม่วงหลังเก็บเกี่ยว แปลงทดลองที่ 4 (อ. สามโก้ จ. อ่างทอง) ฤดูการเก็บเกี่ยวปี 2552



ภาพที่ 7 ผลของการฉีดพ่นทรงพุ่มด้วย BM-3103 ต่อจำนวนผลมะม่วงที่ปรากฏอาการของโรคแอนแทรกโนส แปลงทดลองที่ 4 (อ. สามโก้ จ. อ่างทอง) ฤดูการเก็บเกี่ยวปี 2552



ภาพที่ 8 อาการของโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้สีทองที่เก็บเกี่ยวจากแปลงทดลองที่ 4 (อ. สามโก้ จ. อ่างทอง) หลังจากเก็บในสภาพชื้นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน
 ก. และ ข. ผลมะม่วงจากแปลงที่ฉีดพ่นด้วยน้ำ
 ค. และ ง. ผลมะม่วงจากแปลงที่ฉีดพ่นด้วย GYPB
 จ. และ ฉ. ผลมะม่วงจากแปลงที่ฉีดพ่นด้วย BM-3103

2.2.5 แปลงทดลองที่ 5 พื้นที่ทดลอง: สวนมะม่วงของเกษตรกร อำเภอบ้านแพ้ว จังหวัดสมุทรสาคร (คุณ สมรัก โชติสวัสดิ์) เริ่มฉีดพ่น BM-3103 ตั้งแต่เดือนตุลาคมถึงธันวาคม 2552 รวมการฉีดพ่นทั้งหมด 4 ครั้ง

ผลของการทดสอบประสิทธิภาพของ BM-3103 พบว่าค่าเฉลี่ยของพื้นที่ผิวของผลที่ปรากฏอาการของโรคแอนแทรคโนสในวันที่ 9 ของการเก็บรักษา คือ 39.02 และ 50.47 % เมื่อสิ้นสุดการทดลอง (11 วัน) คือ 76.91 และ 90.08 % ในการทดลองที่พ่นด้วย BM-3103 และน้ำ ตามลำดับ (ตารางที่ 3) จำนวนผลที่ปรากฏอาการของโรคในวันที่ 9 ของการเก็บรักษา คือ 91.43 และ 100% ในการทดลองที่พ่นด้วย BM-3103 และน้ำ ตามลำดับ (ตารางที่ 4) และเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (11 วัน) ผลมะม่วงที่เก็บเกี่ยวจากการทดลองที่พ่นด้วย BM-3103 และน้ำ เป็นโรคทั้งหมด (ตารางที่ 4, ภาพที่ 10)

ตารางที่ 3 ผลของการฉีดพ่นทรงพุ่มด้วย BM-3103 ต่อการปรากฏของโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วงหลังเก็บเกี่ยว แปลงทดลองที่ 5 (อ. บ้านแพ้ว จ.สมุทรสาคร) มะม่วงน้ำดอกไม้ ฤดูการเก็บเกี่ยวปี 2552

Applied	Diseased area (% on the fruit surface)*				
	3 days ¹	5 days	7 days	9 days	11 days
BM-3103	0.10	2.05	10.96	39.02 a	76.91 a
Water	2.32	9.19	23.04	50.47 b ^{1/}	90.08 b ^{1/}

* ข้อมูลบันทึกเมื่ออาการของโรคแอนแทรคโนสปรากฏเป็นครั้งแรก

¹ วันที่อาการของโรคแอนแทรคโนสปรากฏเป็นครั้งแรก

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

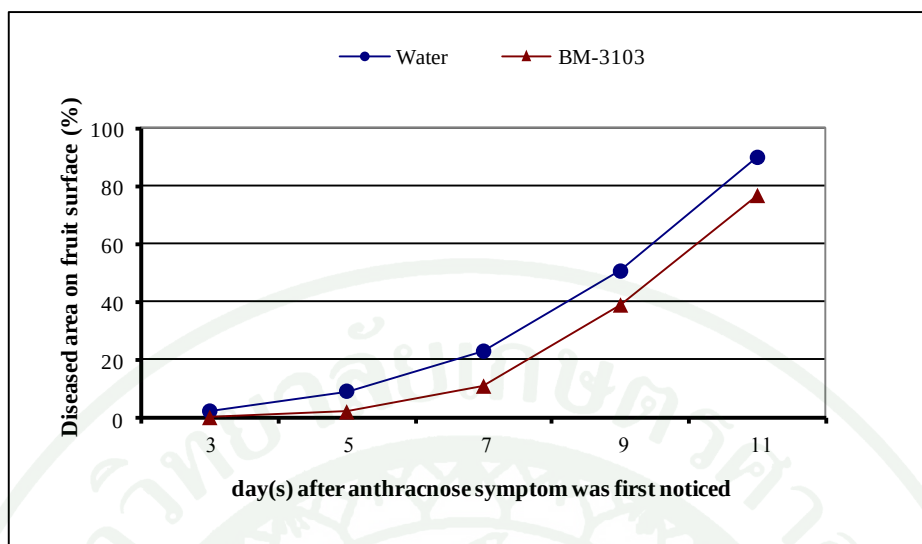
ตารางที่ 4 ผลของการฉีดพ่นทรงพุ่มด้วย BM-3103 ต่อจำนวนผลมะม่วงที่ปรากฏอาการของโรคแอนแทรคโนส แปลงทดลองที่ 5 (อ. บ้านแพ้ว จ.สมุทรสาคร) มะม่วงน้ำดอกไม้ ฤดูการเก็บเกี่ยวปี 2552

Applied	Total diseased fruit (%)*				
	3 days ¹	5 days	7 days	9 days	11 days
BM-3103	5.35	43.57	75.36	91.43 a	100 a
Water	18.96	69.69	96.21	100 b ^{1/}	100 a ^{1/}

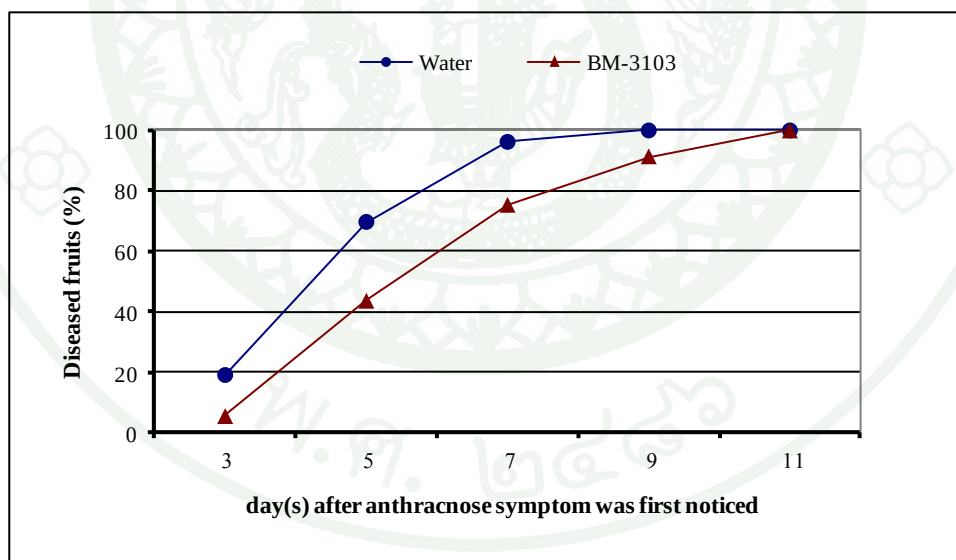
* ข้อมูลบันทึกเมื่ออาการของโรคแอนแทรคโนสปรากฏเป็นครั้งแรก

¹ วันที่อาการของโรคแอนแทรคโนสปรากฏเป็นครั้งแรก

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



ภาพที่ 9 ผลของการฉีดพ่นทรงพุ่มด้วย BM-3103 ต่อการปรากฏของโรคแอนแทรกโนสบนผลมะม่วงน้ำดอกไม้หลังเก็บเกี่ยว แปลงทดลองที่ 5 (อ. บ้านแพ้ว จ. สมุทรสาคร) ถัดการเก็บเกี่ยวปี 2552



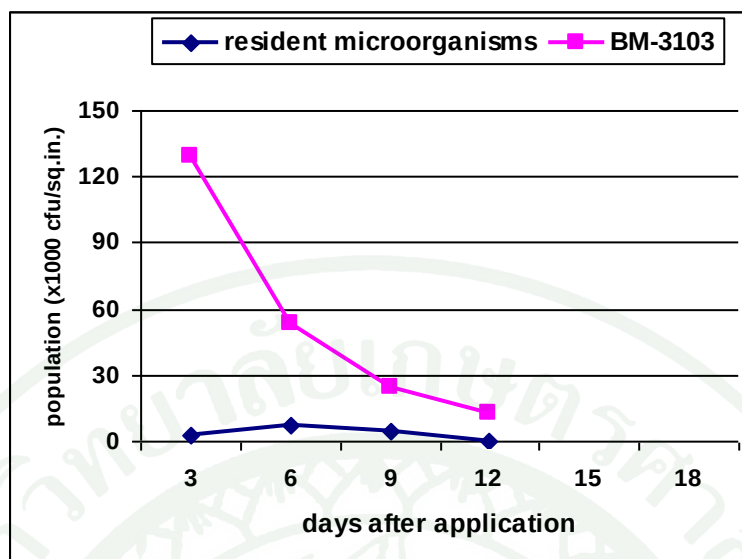
ภาพที่ 10 ผลของการฉีดพ่นทรงพุ่มด้วย BM-3103 ต่อจำนวนผลมะม่วงน้ำดอกไม้ที่ปรากฏอาการของโรคแอนแทรกโนส แปลงทดลองที่ 5 (อ. บ้านแพ้ว จ. สมุทรสาคร) ถัดการเก็บเกี่ยวปี 2552



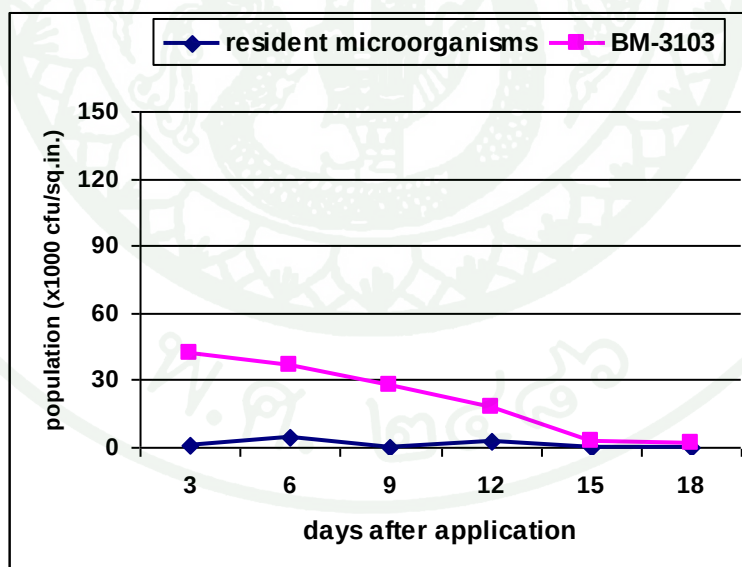
ภาพที่ 11 อาการของโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วงน้ำดอกไม้ที่เก็บเกี่ยวจากแปลงทดลองที่ 5 (อ. บ้านแพ้ว จ. สมุทรสาคร) หลังจากเก็บในสภาพชื้นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน
 ก. และ ข. ผลมะม่วงจากแปลงที่ฉีดพ่นด้วยน้ำ
 ค. และ ง. ผลมะม่วงจากแปลงที่ฉีดพ่นด้วย BM-3103

3. การศึกษาความอยู่รอดของประชากร *Bacillus megaterium* ไอโซเลต 3103 (BM-3103) ในทรงพุ่มมะม่วง

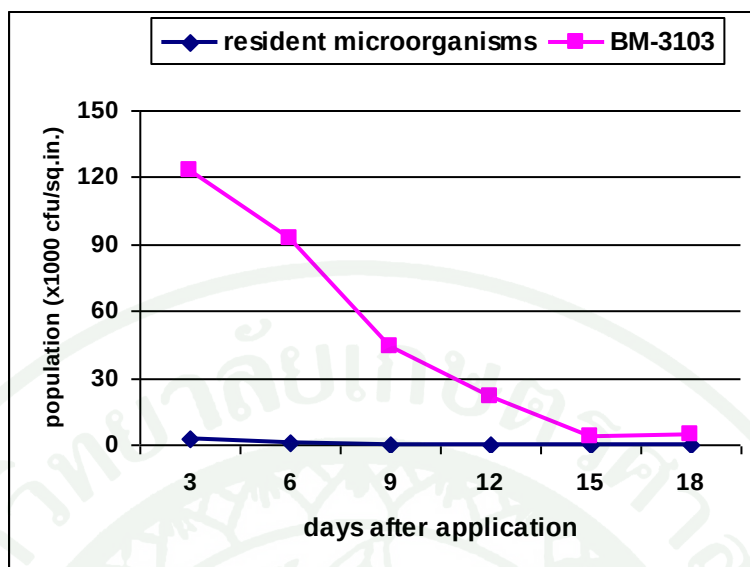
การสุ่มตัวอย่างใบหลังจากการฉีดพ่น BM-3103 ให้แก่ทรงพุ่มครั้งแรก พบการลดลงอย่างรวดเร็วของประชากรของ BM-3103 บนใบมะม่วงอยู่ในช่วง 3 วันหลังการตรวจนับครั้งแรก (ภาพที่ 12) โดยลดลงจากประมาณ 120×10^3 เหลือ 53.6×10^3 cfu/in.² leaf area ในวันที่ 6 หลังการฉีดพ่น และลดลงจนมีระดับต่ำกว่า 30×10^3 cfu/in.² leaf area ในวันที่ 9 หลังการฉีดพ่น หลังการฉีดพ่นซ้ำ ให้แก่ทรงพุ่มพบว่าประชากร BM-3103 ลดลงจนมีระดับต่ำกว่า 30×10^3 cfu/in.² leaf area ในวันที่ 12 และ 15 และระยะเวลาที่ประชากร BM-3103 ลดลงจนมีระดับเดียวกับจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่มีอยู่แล้วในทรงพุ่ม (resident microorganisms) คือ 15 และ 21 วันหลังการฉีดพ่นครั้งที่ 3 และ 4 ตามลำดับ (ภาพที่ 14 และ 15)



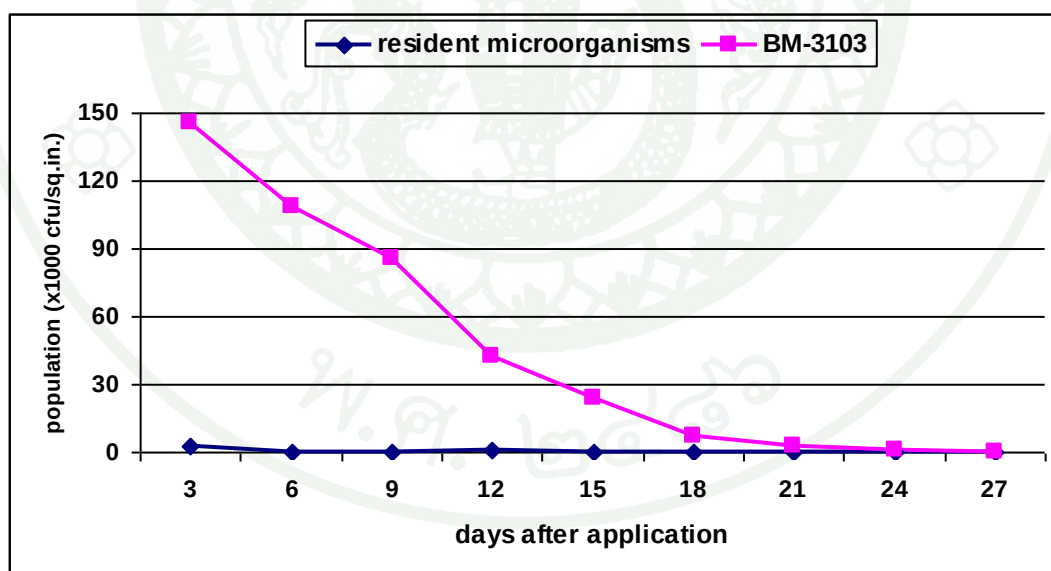
ภาพที่ 12 การเปลี่ยนแปลงระดับประชากร BM-3103 ในทรงพุ่ม หลังการฉีดพ่นครั้งที่ 1 (วันที่ 17 ตุลาคม 2551)



ภาพที่ 13 การลดลงของประชากร BM-3103 ในทรงพุ่ม เนื่องจากการชะล้างของฝน หลังการฉีดพ่นครั้งที่ 2 (วันที่ 31 ตุลาคม 2551)



ภาพที่ 14 การเปลี่ยนแปลงระดับประชากร BM-3103 ในทรงพุ่ม หลังการฉีดพ่นครั้งที่ 3
(วันที่ 21 พฤศจิกายน 2551)



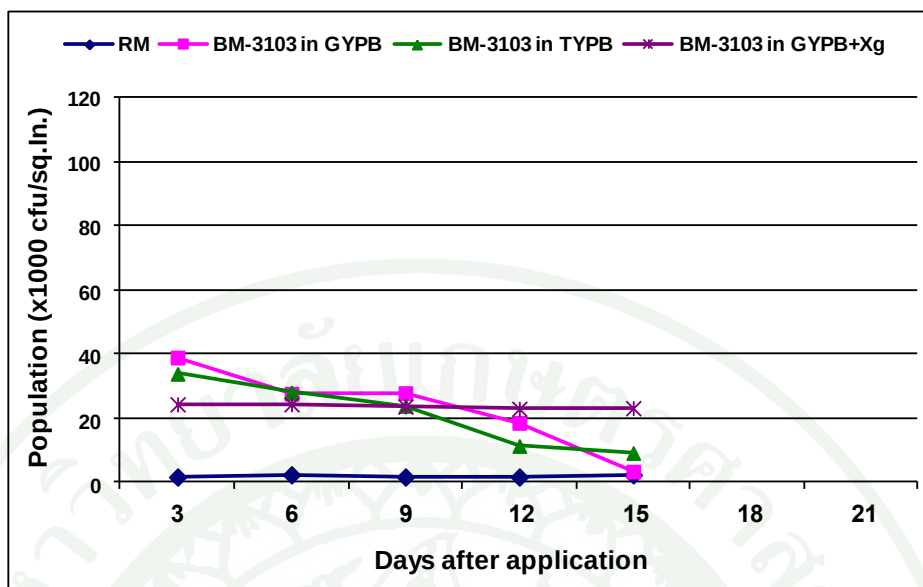
ภาพที่ 15 การเปลี่ยนแปลงระดับประชากร BM-3103 ในทรงพุ่ม หลังการฉีดพ่นครั้งที่ 4
(วันที่ 12 ธันวาคม 2551)

4. การทดลองเพิ่มความสามารถในยู่รอดของ *Bacillus megaterium* ไอโซเลต 3103 (BM-3103) ในทรงพุ่มมะม่วง โดยการดัดแปลงอาหารที่ใช้เลี้ยง

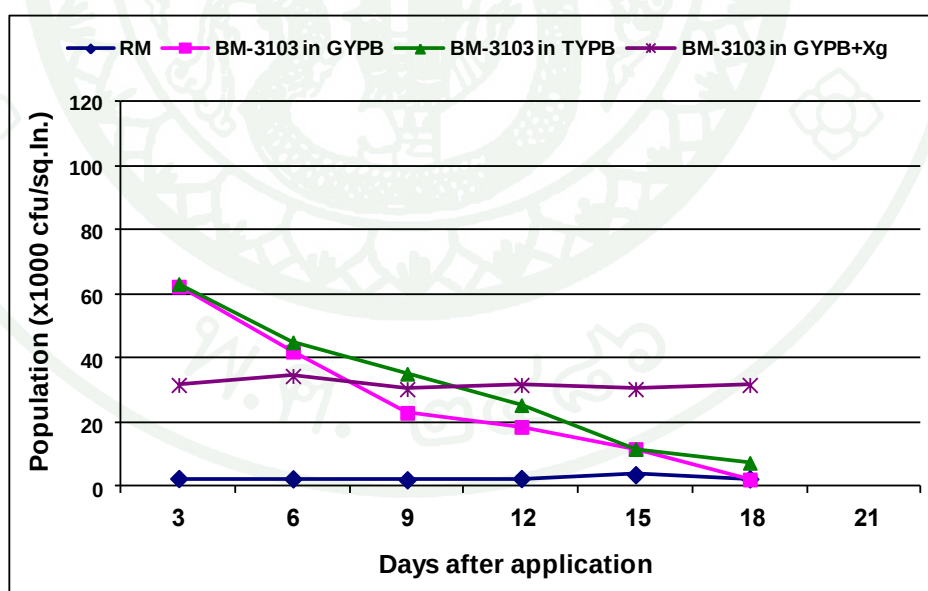
การสุ่มตัวอย่างใบหลังจากการฉีดพ่น BM-3103 ให้แก่ทรงพุ่มครั้งแรก 3 วัน พบว่าประชากรที่ตรวจนับได้ของ BM-3103 ที่เลี้ยงด้วยอาหาร GYPB, TYPB และ GYPB+Xg บนใบมะม่วงคือ 39.1, 34 และ 24.5 cfu/in.² leaf area ตามลำดับ ประชากรของ BM-3103 ที่เลี้ยงด้วยอาหาร GYPB และ TYPB มีแนวโน้มลดลงเมื่อเวลาผ่านไปจนมีระดับใกล้เคียงกับประชากรประจำถิ่นในทรงพุ่ม (resident microorganisms) เมื่อเวลา 15 วันหลังการฉีดพ่น ส่วนประชากรของ BM-3103 ที่เลี้ยงด้วยอาหาร GYPB+Xg ก่อนข้างคงที่คือประมาณ 23.8 cfu/in.² leaf area ตลอดระยะเวลา 15 วัน (ภาพที่ 16)

การตรวจนับครั้งแรกหลังการฉีดพ่นซ้ำให้แก่ทรงพุ่มครั้งที่ 2 พบว่าประชากร BM-3103 ที่เลี้ยงด้วยอาหาร GYPB และ TYPB เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับการฉีดพ่นครั้งแรก (ภาพที่ 16 และ 17) ความมีชีวิตของ BM-3103 ที่เลี้ยงด้วยอาหาร TYPB ดีขึ้นเล็กน้อยเมื่อเทียบกับ BM-3103 ที่เลี้ยงด้วยอาหาร GYPB แนวโน้มของประชากร BM-3103 ที่เลี้ยงด้วยอาหาร GYPB+Xg ก่อนข้างคงที่โดยมีประชากรเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อเทียบกับการฉีดพ่นครั้งแรก ระยะเวลาที่ประชากร BM-3103 ลดลงจนมีระดับเดียวกับจุลินทรีย์ประจำถิ่นในทรงพุ่มคือ 18 วัน (ภาพที่ 17) หลังการฉีดพ่น

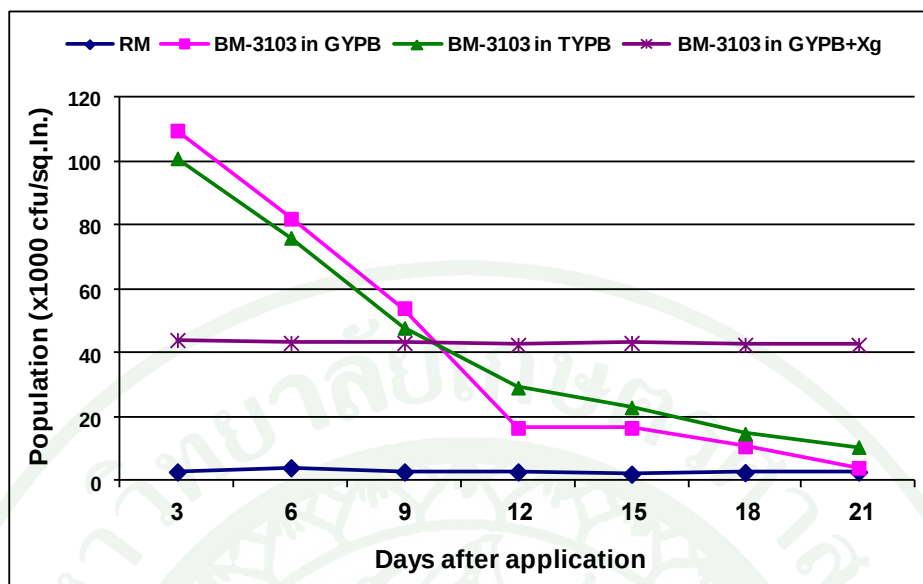
ประชากรตั้งต้นของ BM-3103 ในการตรวจนับหลังการฉีดพ่นทรงพุ่มครั้งที่ 3 สูงขึ้นสังเกตได้อย่างชัดเจนใน BM-3103 ที่เลี้ยงด้วยอาหาร GYPB และ TYPB โดยเพิ่มขึ้นจากระดับ 60 cfu/in.² leaf area ในการฉีดพ่นครั้งที่ 2 เป็น 109 และ 101 cfu/in.² leaf area โดยประมาณ ในการฉีดพ่นครั้งที่ 3 ที่เลี้ยงด้วยอาหาร GYPB+Xg เพิ่มขึ้นเล็กน้อยและมีแนวโน้มคงที่ (ภาพที่ 17 และ 18) ช่วงระยะเวลาที่ประชากร BM-3103 ที่เลี้ยงด้วยอาหาร GYPB และ TYPB ลดลงอย่างรวดเร็วคือ 12 วัน หลังการฉีดพ่น (ภาพที่ 18) และระยะเวลาที่ประชากร BM-3103 ลดลงจนมีระดับเดียวกับประชากรประจำถิ่นในทรงพุ่มเพิ่มขึ้นเป็น 21 วัน (ภาพที่ 16, 17 และ 18)



ภาพที่ 16 การเปลี่ยนแปลงระดับประชากรในทรงพุ่มของ BM-3103 ที่เลี้ยงด้วยอาหาร GYPB, TYPB และ GYPB+Xg หลังการฉีดพ่นทรงพุ่มต้นมะม่วง ครั้งที่ 1 (วันที่ 16 ธันวาคม 2555) เปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ประจำถิ่น (RM)



ภาพที่ 17 การเปลี่ยนแปลงระดับประชากรในทรงพุ่มของ BM-3103 ที่เลี้ยงด้วยอาหาร GYPB, TYPB และ GYPB+Xg หลังการฉีดพ่นทรงพุ่มต้นมะม่วง ครั้งที่ 2 (วันที่ 6 มกราคม 2556) เปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ประจำถิ่น (RM)



ภาพที่ 18 การเปลี่ยนแปลงระดับประชากรในทรงพุ่มของ BM-3103 ที่เลี้ยงด้วยอาหาร GYPB, TYPB และ GYPB+Xg หลังการฉีดพ่นทรงพุ่มต้นมะม่วง ครั้งที่ 3 (วันที่ 27 มกราคม 2556) เปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ประจำถิ่น (RM)

วิจารณ์

การฉีดพ่นทรงพุ่มต้นมะม่วงตั้งแต่ระยะดอกบานจนถึงเก็บเกี่ยวด้วย BM-3103 ในแปลงทดลองที่ 4 (อำเภอสามโก้ จังหวัดอ่างทอง) มีผลทำให้ความรุนแรงของโรคลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทั้งการประเมินการพัฒนาดของโรคด้วยพื้นที่แผลบนผล และจำนวนผลที่เป็นโรค (ตารางที่ 1 และตารางที่ 2) ทรงพุ่มที่ฉีดพ่น BM-3103 ความรุนแรงของโรคลดลง 25.51 % (จาก 75.75 เหลือ 50.24 %) ในขณะที่ทรงพุ่มฉีดพ่นธาตุอาหาร (GYPB) ที่ไม่ผสม BM-3103 ลดลง 6.18 % (จาก 75.75 เหลือ 69.57 %) การพัฒนาดของโรคบนผลที่เก็บจากทรงพุ่มที่พ่นด้วยน้ำเริ่มต้นช้ากว่าเล็กน้อยแต่มีอัตราการพัฒนาดสูงกว่าเห็นได้ชัดเจนในวันที่ 5 (ภาพที่ 8) เมื่อเทียบกับการพัฒนาดของโรคบนผลที่เก็บเกี่ยวจากทรงพุ่มที่พ่นด้วย BM-3103 และ GYPB ตามลำดับ (ตารางที่ 1 และภาพที่ 6) ร้อยละของจำนวนผลที่เป็นโรคในการทดลองที่พ่นด้วย BM-3103 ต่ำกว่าการทดลองอื่นอย่างชัดเจนตลอดการเก็บรักษา (ภาพที่ 6)

ในแปลงทดลองที่ 5 (อำเภอบ้านแพ้ว จังหวัดสมุทรสาคร) พบว่าการฉีดพ่น BM-3103 ทำให้ความรุนแรงของโรคระหว่างการเก็บรักษาลดลงจาก 90.08 เหลือ 76.91 % (ลดลง 13.17 %) การพัฒนาดของโรคแอนแทรคโนสบนผลที่เก็บเกี่ยวผลจากทรงพุ่มที่พ่นด้วยน้ำมีการพัฒนาดสูงกว่าตั้งแต่เริ่มบันทึกผลเมื่อเทียบกับการพัฒนาดของโรคบนผลที่เก็บเกี่ยวจากทรงพุ่มที่พ่นด้วย BM-3103 (ภาพที่ 9) อาการของโรคแอนแทรคโนสบนผลแสดงให้เห็นชัดเจนในวันที่ 7 (ภาพที่ 11) หลังจากการเก็บผลมะม่วงในสภาพชื้นที่อุณหภูมิห้อง ผลที่เป็นโรคในการทดลองที่พ่นด้วย BM-3103 มีจำนวนน้อยกว่าการทดลองที่พ่นด้วยน้ำอย่างชัดเจนจนกระทั่งถึงวันที่ 10 หลังจากปรากฏอาการของโรค (ภาพที่ 10)

การทดลองฉีดพ่นทรงพุ่มด้วย BM-3103 ในพื้นที่ทดลองที่ 4 และ 5 แสดงให้เห็นว่าสามารถลดการพัฒนาดของโรคแอนแทรคโนสหลังการเก็บเกี่ยวบนผลมะม่วงได้อย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 1 และ ตารางที่ 2) แม้ว่ามีความแตกต่างกันทางด้านพันธุ์มะม่วง และพื้นที่การฉีดพ่นธาตุอาหาร GYPB ให้ทรงพุ่ม ไม่มีผลต่อการควบคุมโรคแอนแทรคโนสหลังการเก็บเกี่ยวบนผลมะม่วงเมื่อเปรียบเทียบกับ การฉีดพ่นน้ำ อาจเนื่องจากอาหารที่ฉีดพ่นไม่มีผลต่อกิจกรรมของจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่มีอยู่ในทรงพุ่ม หรือจุลินทรีย์เหล่านั้นไม่มีคุณลักษณะในการควบคุมการเข้าทำลายโดยรา *C. gloeosporioides* ที่เป็นสาเหตุของโรคแอนแทรคโนส (Ippolito and Nigro, 2000) (ตารางที่ 1)

การติดผลของมะม่วง และการรบกวนของแมลงที่ทำความเสียหายต่อผลมะม่วง เป็นอุปสรรคสำคัญที่ทำให้ไม่สามารถประเมินผลการวิจัยหลังเก็บเกี่ยวที่เป็นผลของการนำ BM-3103 ไปใช้ในสภาพแปลงได้ ดังที่เกิดขึ้นกับการทดลองในพื้นที่ทดลองที่ 1 (อำเภอสามชุก จังหวัดสุพรรณบุรี) 2 (ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน) และ 3 (อำเภอสามโก้ จังหวัดอ่างทอง)

การศึกษาความอยู่รอดของประชากร BM-3103 ในทรงพุ่มต้นมะม่วง พบว่าจำนวนประชากรลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 9 วัน หลังการฉีดพ่น และเหลือน้อยมากหลังจากการพ่น 15 วัน การฉีดพ่น BM-3103 ซ้ำมีผลทำให้ประชากร BM-3103 มีเสถียรภาพดีขึ้น เห็นได้จากการฉีดพ่นครั้งแรกระยะ เวลาที่ประชากร BM-3103 ลดลงจนมีระดับเดียวกันกับจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่มีอยู่แล้วในทรงพุ่ม (resident microorganisms) ที่ไม่มีการฉีดพ่นมีระยะเวลาประมาณ 15 วัน เมื่อฉีดพ่นซ้ำระยะเวลาที่สามารถตรวจนับประชากร BM-3103 ได้เพิ่มขึ้นจาก 15 วัน เป็น 21 วัน หลังจากวันที่ฉีดพ่น การมีฝนตกหลังการฉีดพ่นในระยะเวลาสั้นๆ ทำให้เกิดการชะล้าง BM-3103 จากทรงพุ่ม เห็นได้จากการฉีดพ่นครั้งที่ 2 เนื่องจากประชากรที่ตรวจนับได้หลังการฉีดพ่นเป็นเวลา 3 วัน ลดลงจากประมาณ 120×10^3 cfu/in.² leaf area เหลือ 42.6×10^3 cfu/in.² leaf area (ภาพที่ 12 และ 13) แต่อย่างไรก็ตามประชากรของ BM-3103 สามารถตรวจวัดได้จนถึง 15 วันหลังการฉีดพ่น การชะล้างของฝนหลังการฉีดพ่น BM-3103 ให้แก่ทรงพุ่มในระยะเวลาสั้นๆ ทำให้ประชากรของ BM-3103 ลดลงอย่างรวดเร็ว (ภาพที่ 13)

ประสิทธิภาพของ antagonist ในการลดการเข้าทำลายโดยราที่เป็นสาเหตุของโรคในสภาพแปลงขึ้นอยู่กับปัจจัยที่มีผลต่อจำนวนประชากรและกิจกรรมของ antagonist โดยเฉพาะอย่างยิ่งการมีธาตุอาหารต่ำ รังสี UV อุณหภูมิสูง และความแห้ง ในสถานการณ์ที่ประชากรของ antagonist ไม่สามารถครอบครองพื้นที่หรือไม่สามารถดำเนินกิจกรรมบนผิวของผลได้ย่อมเป็นการเปิดโอกาสการเข้าทำลายของเชื้อโรค (Ippolito and Nigro, 2000) การปรากฏของโรคบนผลมะม่วงที่เก็บเกี่ยวจากทรงพุ่มที่ฉีดพ่น BM-3103 อาจเป็นผลของการเข้าทำลายโดยรา *C. gloeosporioides* ในขณะที่ระดับประชากรของ BM-3103 ลดลงหลังการฉีดพ่นให้แก่ทรงพุ่ม โดยเฉพาะอย่างยิ่งหลังการฉีดพ่นครั้งแรก (ภาพที่ 12)

การทดลองเพิ่มความอยู่รอดของ BM-3103 ในทรงพุ่มต้นมะม่วงโดยการปรับสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยง พบว่า ระดับประชากร BM-3103 ก่อนข้างสม่ำเสมอในทรงพุ่มต้นมะม่วงที่ฉีดพ่นด้วย cell culture ของ BM-3103 ที่เลี้ยงด้วยอาหาร GYPB ที่เติม xanthan gum 0.05% (GYPB+Xg) คือ

23.1-24.5 x 10³ cfu/in.² leaf area ตั้งแต่ 3 วันแรกหลังการฉีดพ่นจนถึงระยะเวลาที่ประชากรของ BM-3103 ที่เลี้ยงด้วยอาหาร GYPB และ TYPB มีระดับลดลงระดับเดียวกับจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่มีอยู่แล้วในทรงพุ่ม (ภาพที่ 16, 17 และ 18)

การเลี้ยง BM-3103 ด้วยอาหาร GYPB+Xg ช่วยให้ประชากรในทรงพุ่มสามารถอยู่ได้นาน และมีระดับประชากรค่อนข้างคงที่ได้ อาจเนื่องจากเซลล์ BM-3103 ได้รับการปกป้องจากคุณสมบัติของ xanthan gum ที่มีความหนืดสูง ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ มีความคงตัวสูงต่อความร้อนและการเปลี่ยนแปลง pH ความหนืดของ xanthan gum จะคงที่ถึงแม้อุณหภูมิจะเปลี่ยนแปลงในช่วง 0-100 °C หรือ pH จะเปลี่ยนแปลงในช่วง 1-13 ก็ตาม (Imeson, 1997; นิธิยา 2545) xanthan gum ใช้ประโยชน์ในผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิด ทำหน้าที่เป็นสารเพิ่มความหนืดเพิ่มความคงตัว และทำให้อนุภาคแขวนลอยได้ดี เช่น ใช้เป็นสารเพิ่มความคงตัวให้กับไอศกรีมและน้ำสลัด ถ้านำ xanthan gum มาผสมกับ Locust bean gum จะนิยมนำมาใช้กับอาหารประเภทขนมหวาน ซอสมะเขือเทศ สำหรับ พืชชา และ ไล้ขนมอบ เป็นต้น (Imeson, 1997)

trehalose คือ non-reducing sugar ประกอบด้วยกลูโคส 2 โมเลกุล ซึ่งจับกันด้วยพันธะ 1, 1-glucosidic ผลผลิตได้จากปฏิกิริยาการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์ ในธรรมชาติพบได้ทั้งในพืชและสัตว์ แบคทีเรีย ยีสต์ รา สาหร่ายทะเล แมลงหลายชนิด (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, 2548; Iturriaga *et al.*, 2009) มีคุณสมบัติช่วยคงสภาพ membrane ไว้ภายในสภาพที่ขาดน้ำหรือในสภาพอากาศที่แห้งแล้ง (Crowe *et al.*, 1984) ใน *Escherichia coli* ช่วยรักษาสภาพของ cell membrane ป้องกันการเสียสภาพของโปรตีน และสามารถปรับตัวให้อยู่ในสภาพที่เย็นได้ (Kandror *et al.* 2002) ช่วยให้ rhizobium ทนต่อสภาพความเค็ม (Fernandez-Aunio *et al.*, 2010; Sugawara *et al.*, 2010) นอกจากนี้การสะสม trehalose ภายในเซลล์ที่เกิดขึ้นภายใต้สภาวะเครียดหลายอย่าง เช่น อุณหภูมิต่ำ ความเข้มข้นของเกลือสูง และสภาวะอื่นที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญ ทำให้จุลินทรีย์สามารถเจริญและทนต่อสภาวะเครียดได้ (Hugenholtz *et al.*, 2002) Streeter (2003) พบว่าการเติม trehalose (3 mmol l⁻¹) ลงในอาหารที่เลี้ยง *Bradyrhizobium japonicum* strain USDA 110 ทำให้ trehalose ภายในเซลล์เพิ่มขึ้น 3 เท่า และสามารถอยู่รอดในสภาวะที่ทำให้แห้งเพิ่มขึ้น 2-4 เท่า ในงานวิจัยครั้งนี้พบว่าความอยู่รอดในทรงพุ่มต้นมะม่วงที่ดีขึ้นของ BM-3103 ที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มี trehalose 1% (TYPB) ยังไม่ชัดเจนเมื่อเทียบกับ BM-3103 ที่เลี้ยงด้วยอาหาร GYPB อย่างไรก็ตาม ระดับประชากร BM-3103 ในทรงพุ่มต้นมะม่วงเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนเมื่อมีการฉีดพ่น

ซ้ำ (ภาพที่ 16-19 และ 20-22) และระยะเวลาการลดลงของระดับประชากรจนเท่ากับประชากร
ประจำถิ่นในทรงพุ่มเพิ่มขึ้นประมาณ 3 วันหลังการฉีดพ่นแต่ละครั้ง (ภาพที่ 16-18)



สรุป

การนำ *Bacillus megaterium* ไอโซเลต 3103 (BM-3103) ไปฉีดพ่นให้ทรงพุ่มต้นมะม่วง ตั้งแต่ระยะออกดอกจนกระทั่งเก็บเกี่ยวผลแก่ (preharvest application) โดยเน้นที่ช่อดอกและผล สามารถลดความเสียหายจากความรุนแรงของโรคแอนแทรคโนสของผลิตผลมะม่วงหลังการเก็บเกี่ยวได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยแปลงทดลองที่ 4 ลดลง 25.51% (ลดลงจาก 75.75 เหลือ 50.24% เมื่อสิ้นสุดการทดลอง) และแปลงทดลองที่ 5 ลดลง 13.17% (ลดลงจาก 90.08 เหลือ 76.91% เมื่อสิ้นสุดการทดลอง) ประชากรของ BM-3103 ในทรงพุ่มต้นมะม่วงสามารถตรวจพบได้ในช่วง 12-18 วัน หลังการฉีดพ่น การชะล้างที่เกิดจากฝนมีผลต่อการดำรงอยู่ของ BM-3103 ในทรงพุ่ม การฉีดพ่นซ้ำ ทำให้เสถียรภาพของประชากร BM-3103 ในทรงพุ่มดีขึ้น การเติม xanthan gum 0.05% ลงในอาหารที่ใช้เลี้ยง มีผลทำให้ระดับประชากรของ BM-3103 ค่อนข้างคงที่ในสภาพทรงพุ่มต้นมะม่วง ที่ทำการทดลอง ผลของการใช้ trehalose ในสูตรอาหาร (TYPB) ที่ใช้เลี้ยง BM-3103 เพื่อเพิ่มความอยู่รอดของประชากรในทรงพุ่มต้นมะม่วงยังไม่ชัดเจนในการวิจัยครั้งนี้เมื่อเทียบกับการใช้ glucose (GYPB)

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 2010. ผลิตภัณฑ์เชื้อแบคทีเรียปฏิบัณ *Bacillus*

Megaterium สำหรับควบคุมโรคกาบใบแห้งในข้าว. แหล่งที่มา:

<http://www.most.go.th/portalweb/index.php/summary-technology/agriculture-technology/1273--bacillus-megaterium-.html>, 27 กันยายน 2553.

เฉลิมชัย แก้ววรชาติ. 2539. การปลูกมะม่วง. อักษรสยามการพิมพ์, กรุงเทพฯ.

ชวลา บุณศิริ. 2530. โรคพืชผลิตผลหลังการเก็บเกี่ยวและป้องกันกำจัด. ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ.

ชลอ ชำนาญพิทักษ์. 2539. โรคไม้ผลและการป้องกันกำจัด. บริษัทเกษตรสยามจำกัด, กรุงเทพฯ.

นิพนธ์ วิสารทนนท์. 2532. การป้องกันกำจัดโรคมะม่วงระยะแตกใบอ่อนและแทงช่อดอก. วารสารเกษตรเกษตร 13: 54-57.

นิพนธ์ วิสารทนนท์. 2542. โรคไม้ผลเขตร้อนและการป้องกันกำจัด. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. พิมพ์ครั้งที่ 2. บริษัทเจ.ฟิล์ม โปรเซส จำกัด, กรุงเทพฯ.

นิพนธ์ วิสารทนนท์, สกลวัฒน์ โอศิริ และระจิตร์ จุฑากรณ์. 2538. ผลของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* และความรุนแรงของโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วงน้ำดอกไม้, น. 44-51. ใน เอกสารการประชุมวิชาการ ครั้งที่ 34. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

นิธิยา รัตนานนท์. 2545. เหมื่ออาหาร. โอเดียนสโตร์. กรุงเทพฯ.

ผุสดี พันธุ์ประสิทธิ์. 2529. โรคข้าวผลเน่าของผลมะม่วงภายหลังการเก็บเกี่ยวที่เกิดจากเชื้อรา *Dothiorella dominicana* Pet. Et. Cif. และการควบคุม. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

มณฑาทิพย์ เสาร์ห้า. 2540. การควบคุมโรคข้าวผลเน่าโดยใช้ยีสต์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ทศพร ทองเที่ยง. 2537. โรคผลเน่าหลังการเก็บเกี่ยวของกล้วยหอมที่เกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum musae* (Berk & Curt) Arx. และการควบคุมโรคเพื่อการส่งออก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ทศวรรณ ศรีวะอุไร. 2547. การคัดเลือกจุลินทรีย์ผิวพืชเพื่อการควบคุมรา *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) สาเหตุโรคผลเน่าหลังการเก็บเกี่ยวของเงาะพันธุ์โรงเรียน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์, นิวัฒน์ เสนาะเมือง และ พิศาล ศิริธร. 2548. การใช้เชื้อราปฏิบักษ์ในการควบคุมโรคพืชผักที่สำคัญโดยชีววิธีในเชิงพาณิชย์. แหล่งที่มา: www.biotech.or.th/biotechnology-th/Redirect.asp?name=Megaterium, 27 กันยายน 2553.

ศิริรัตน์ ตรีกาญจน์วัฒนา. 2549. การคัดเลือกและศักยภาพของจุลินทรีย์บนผิวพืชในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงหลังการเก็บเกี่ยว. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศิริรัตน์ ตรีกาญจน์วัฒนา, นวลวรรณ ฟ้ารุ่งแสง, ชลิดา เล็กสมบุรณ์ และ อุดม ฟ้ารุ่งแสง. 2549. การลดความเสียหายที่เกิดจากโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงโดยจุลินทรีย์ที่แยกได้จากทรงพุ่ม. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 37 (2) (พิเศษ): 90-93.

คันสนีย์ ศิลปสุนทร, นวลวรรณ ฟ้างู๋สา, ชัยณรงค์ รัตนกริษากุล, เจริญ ขุนพรม และ อุดม ฟ้างู๋สา. 2553. ผลของการใช้ *Bacillus megaterium* ไอโซเลขที่ 3103 ในสภาพแปลงต่อการปรากฏของโรคแอนแทรกโนสภายหลังการเก็บเกี่ยวบนผลมะม่วง. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 42 (1) (พิเศษ): 209-212.

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย. 2548. น้ำตาล Trehalose. แหล่งที่มา: www.tistrfoodprocess.net/newsletter/jan05/page3_th.html, 19 กุมภาพันธ์ 2556.

สุชาติ วิจิตรานนท์, ขจรศักดิ์ ภวกุล และ ดารา ทางสุวรรณ. 2531. โรคของมะม่วง. ขาวเกษตร 11 (126): 65-68.

สุชาติ วิจิตรานนท์. 2541. สมุคภาพโรคมะม่วงและการป้องกันกำจัดโดยวิธีผสมผสาน. บริษัท วงตะวัน จำกัด, เขตดอนเมือง, กรุงเทพฯ.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2555. ข้อมูลพื้นฐานเศรษฐกิจการเกษตร. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2555. ข้อมูลพื้นฐานเศรษฐกิจการเกษตร. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ.

อังสุมา ชยสมบัติ. 2530. โรคหลังการเก็บเกี่ยวของผลมะม่วงที่เกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. และการควบคุม. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อุดม ฟ้างู๋สา และ นวลวรรณ ฟ้างู๋สา. 2544. ความอ่อนแอของผลมะม่วงรับประทานสุก 5 พันธุ์ ต่อการพัฒนาของโรคแอนแทรกโนส, น. 326-333 ใน การประชุมทางวิชาการ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 39, กรุงเทพฯ.

อุดม ฟุ้งแสง, นวลวรรณ ฟุ้งแสง, ลพ ภาณุตานนท์, ชัยณรงค์ รัตนกริฑากุล และ เจริญ ขุนพรม.
2551. การใช้ Mango-Leaf Assay ในการประเมินศักยภาพของ *Bacillus megaterium* ไอโซ
เลข 3103 ในการเป็นศัตรูธรรมชาติต่อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคลำ
การเก็บเกี่ยวของมะม่วง. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 39(3) (พิเศษ): 43-46.

เอียน ศิลาชัย. 2536. โรคพืชไม้ผล สมุนไพร และการป้องกันกำจัด. บริษัท ประชาชน จำกัด,
กรุงเทพฯ.

Andrews, J.H. 1992. Biological control in the phyllosphere. **Annu. Rev. Phytopatho** 30: 603-
635.

Andrews, J.H., R.F. Harris, R.N. Spear, G.W. Laun and E.V. Nordheim. 1994. Morphogenesis
and adhesion of *Aureobasidium pullulans*. **Can. J. Microbiol** 24: 1058-1072.

Anonymous. 2007a. *Bacillus megaterium*. Available Source: [www.thelabrat.com/restriction/
sources / Bacillusmegaterium.shtml](http://www.thelabrat.com/restriction/sources/Bacillusmegaterium.shtml), September 27, 2010.

Anonymous. 2007b. **Healthy Channel**. Available Source: [www.smelly-feet-no-more.com/
Bacillus_megaterium. html](http://www.smelly-feet-no-more.com/Bacillus_megaterium.html), September 27, 2010.

Arauz, L.F. 2000. Mango anthracnose: Economic impact and current options for integrated
management. **Plant Disease** 84(6): 600-611.

Atlas, R.M. and R. Bartha. 1987. **Microbial ecology: Fundamentals and Applications**.
Benjamin Cummings Publishing Company, California.

Bailey, J.A., J.R.O' Conell, R.J. Pring and C. Nash. 1992. Infection strategies of *Colletotrichum*
species, pp. 88-120. In Bailey, J.A. and M.J. Jeger, eds. **Colletotrichum: Biology,
Pathology and Control**. CAB international, Wallingford.

Baker, K. F. and R.J. Cook. 1974. **Biological control of plant pathogens**. Freeman, San Francisco.

Barkhi-Gilan, R. 2001. **Postharvest Disease of Fruits and Vegetable: Development and Control**. Elsevierscience B.V., Amsterdam.

Ben-Arie, R. S. Droby, J. Zutkhi, L. Cohen, B. Weiss, P. Sarig, M. Zeidman, A. Daus and E. Chalutz. 1991. Preharvest and postharvest biological control of Rhizopus and Botrytis bunch rots of table grapes with antagonistic Yeast extracts, pp. 14-19. *In* Wilson, C.L. and E. Chalutz. (Editors). 1991. **Biological Control of Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables**. ARS Rublication, USDA-ARS, Washington DC, USA.

Blakeman, J. P., Fokkema, N. J. 1982. Potential for biological control of plant diseases on the phylloplane. **Annual Review of Phytopathology** 20: 167-192.

Blakeman, J.P. 1985. Ecological succession of leaf surface microorganisms in relation to biological control, pp. 6-30. *In* C.E. Windels and S.E. Lindow., eds., **Biological control on the phylloplane**. St. Paul, Minnesota, The American Phytopathological society.

Brenner, D.J., N.R. Krieg, J.T. Staley (Volume Editors), and G.M. Garrity (Editor in Chief). 2004. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Vol 2: The Proteobacteria**. Springer, New York.

Cannon, P.F., U. Damm, P.R. Johnston and B.S. Weir. 2012. Colletotrichum current status and future directions. **Studies in Mycology** 73: 181-213.

Chuang, T. Y., and P. J. Ann. 1997. Biological control of mango anthracnose. **Plant Protection Bullet in Taipei**. 39: 227-240.

Crowe, JH.; Crowe, LM. & Chapman D. 1984. Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose. **Science** 223 (4637): 701-703.

Dickinson, D.H. 1986. Adaptation of microorganisms to climatic conditions affecting aerial plant surface, pp 77-100. *In* Fokkema, N.J. and Van den Heuvel, J. 1986. (eds).

Microbiology of the Phyllosphere. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

De Cal, A., E.M. Sagasta and P. Melgarejo. 1990. Biological control of peach twig blight (*Monilinia laxa*) with *Penicillium frequentans*. **Plant Pathology** 39: 612-618.

Dodd, J.C., A.B. Estrada, J. Matcham, P. Jeffries and M.J. Jeger. 1992. The effect of climatic factors on *Colletotrichum gloeosporioides* causal agent of mango anthracnose in the Philippines. **Plant Pathology** 40: 568-575.

Droby, S., E. Chalutz, R. Hofstein, C.L. Wilson, M.E. Wisniewski, B. Fridleder, L. Cohen, B. Weiss and A. Daus. 1993. Pilot testing of *Pichia guilliemondii*: a biocontrol agent of postharvest diseases of citrus fruit. **Biological Control** 3: 47-52.

Droby, S., C.L. Wilson, M.E. Wisniewski and A. El Ghaouth. 2000. Biologically based technology for the control of postharvest diseases of fruits and vegetables, pp. 187-206. *In* C. Wilson and S. Droby. 2000.(Editors). **Microbial Food Contamination**, CRC Press. Boca Raton, FL.

Droby, S., M. Wisniewski, D. Macarasin and C. Wilson. 2009. Twenty years of postharvest biological control research: Is it time for a new paradigm? **Postharvest Biology and Technology** 52:137-145.

Farr, D., G. F. Bills, G. P. Chamuris and A. V. Rossman. 1989. **Fungi on Plants and Plant Products in the United States**. The American Phytopathology Society, St. Pual, Minnesota.

- Farungsang, N., U. Farungsang, S. Sangchote. And F. Chantaniyom. 1997. Leaf disk assay for effective screening of antagonistic Yeast extract against *Greeneria* fruit rot of rambutan, pp. 345-350. *In Proceeding of the 35th Kasetsart University Annual Conference*, Bangkok.
- Farungsang, N., U. Farungsang and S. Sangchote. 1998. Biological control of postharvest rot (*Greeneria* sp.) in rambutan with phylloplane Yeast extracts, pp. 113-119. *In ACIAR Proceedings No. 81, Proceedings of an International Workshop on Disease Control and Storage life Extension in Fruit*. Chiang Mai, Thailand.
- Farungsang, U. and N. Farungsang. 1992. Resistance to benomyl of *Colletotrichum* spp. causing anthracnose of rambutan and mango. *Acta Horticulturae* 321: 891-897.
- Farungsang, U., S. Sinlapasunthorn, C. Rattanakreetakul, L. Phavaphutanon and N. Farungsang. 2013. *Bacillus megaterium* isolate 3103: antagonistic spectrum on *Collectotrichum gloeosporioides* diversity and impact of field application on postharvest incidence of mango fruit anthracnose. *Actahorticulturae* 873: 81-88.
- Fernandez, A.V. and L.F. Arauz. 1992. **Reduction of mango anthracnose by *Bacillus* sp. IV** **Int. Mango Symposium**. University of Florida & International Society for Horticultural Science, Miami Beach.
- Fernandez-Aunon, C., TB. Hamouda, F. Iglesias-Guerra, M. Argandona, M. Reina-Bueno, JJ. Nieto, ME. Aouani, and C. Vargas. 2010. Biosynthesis of compatible solutes in rhizobial strains isolated from *Phaseolus vulgaris* nodules in Tunisian fields. **BMS Microbiology** 10: 192.
- Fitzell, R.D. and C.M. Peak. 1984. The epidemiology of anthracnose disease of mango: inoculum sources spore production and dispersal . **Annals of Applied Biology** 104: 53-59.

- Flaishman, M.A., C.S. Hwang and R.E. Kdattukudy. 1995. Involvement of protein phosphorylation in the induction of appressorium formation in *Colletotrichum gloeosporioides* by its host surface wax and ethylene. **Physio. Mol. Plant Pathol** 47: 103-117.
- Fletcher, M. 1980. Adherence of marine microorganisms to smooth surfaces, pp. 143-161. *In* Beachey, E.H. (Editor) 1980. **Bacterial Adherence**. Ellis Horwood, Chichester, UK.
- Fokkema, N.J. 1993. Opportunities and problems of control of foliar pathogens with microorganisms. **Pestic. Sci** 37:411-416.
- Fokkema, N.J. and J.W. Lorbeer. 1974. Interaction between *Alternaria porri* and the saprophytic mycoflora of onion leaves. **Phytopathology** 64:1128-1133.
- Fokkema, N.J., J.G. Den Houter, Y.J.C. Kosterman and A.L. Nelis. 1979. Manipulation of Yeast extracts on field-grown wheat leaves and their antagonistic effect on *Cochliobolus sativus* and *Septoria nodorum*. **Trans.Br.Mycol.Soc** 72:19-29.
- Guetsky, R., D. Shtienberg, Y. Elad, E. Fischer and A. Dinoor. 2002. Improving biological control by combining biocontrol agents each with several mechanisms of disease suppression. **Phytopathology** 92: 976-985.
- Hawksworth, D.L., B.C. Sutton and G.C. Ainsworth. 1983. **Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi, 7th ed.** Commonwealth Mycological Institute, Kew Surrey, England.
- Hayden, R. 2013. **Bacillus megaterium**. Available Source: http://web.mst.edu/~microbio/BIO221_2000/Bacillus_megaterium.htm, February 12, 2013.

Hugenholtz, J. and E. J. Smid. 2002. Nutraceutical production with food-grade microorganisms. **Curr.Opin. Biotechnol** 13(5): 497-507.

Imeson, A. 1997. **Thickening and Gelling Agent for Food 2nd ed.** Blackie, London. 320 p.

Iordachescu, M. and R. Imai. 2011. Trehalose and Abiotic Stress in Biological Systems.

Abiotic Stress in Plants - Mechanisms and Adaptations 10: 215-234.

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

Iturriaga, G., R. Suárez and B.N. Franco. 2009. Trehalose Metabolism: From Osmoprotection to Signaling. **Int. J. Mol. Sci** 10: 3793-3810.

Janisiewicz, W. J. 1996. Ecological diversity, niche overlap, and coexistence of antagonists used in developing mixtures for biological control of postharvest disease of apples. **Phytopathology** 86: 473-479.

Jeffries, P., J. Dodd, M.J. Jeger and R.A. Plumbley. 1990. The biology and control of *Colletotrichum* species on tropical fruit crops. **Plant Pathology** 39: 343-366.

Jeffries, P. and I. Koomen. 1992. Strategies and Prospects for Biological Control of Diseases caused by *Colletotrichum*, pp. 337-357. In J.A. Bailey and M.J. Jeger. 1992. (Editors). *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. **British Society for Plant Pathology**. CAB International.

Jeger, M.J., R.A. Plumbley, C. Prior, and C. Persad. 1987. SS2-Post-harvest aspects of crop protection. **Agris. Accession no.** 90-086360.

Kandror, O., A. DeLeon and AL. Goldberg. 2002. Trehalose synthesis is induced upon exposure of *Escherichia coli* to cold and is essential for viability at low temperatures.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America
99(15): 9727-9732.

Kefialew, Y. and A. Ayalew. 2008. Postharvest biological control of anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) on mango (*Mangifera indica*). **Postharvest Biology and Technology** 50(1): 8-11.

Korsten, L., E.E. de Viliers, J.A. Duvenhage and J.M. Kotze. 1994. Control of avocado preharvest diseases with *Bacillus subtilis* and fungicides sprays. **S. Afr. Avocado Growers Assoc** 17: 32-34.

Koomen, I., and Jeffries, P. 1993. Effect of antagonistic microorganisms on the post-harvest development of *Colletotrichum gloeosporioides* on mango. **Plant Pathology** 42: 230-237.

Kuo, K.C. 1999. Germination and appressorium formation in *Colletotrichum gloeosporioides*. **Proc. Natl. Sci. ROC(B)** 23: 126-132.

Leibinger, W., B. Breuker, M. Hahn and K. Mendgen. 1997. Control of postharvest pathogens and colonization of the apple surface by antagonistic microorganisms in the field. **Phytopathology** 87: 1103-1110.

Lima, G., A. Ippolito, F. Nigro and M. Salerno. 1997. Effectiveness of *Aureobasidium pullulans* and *Candida oleophila* against postharvest strawberry rots. **Postharvest Biology and Technology** 10: 169-178.

McMillan, R.T., Jr. 1987. Effectiveness of various postharvest treatments for mango decay control. **Proc. Fla. State Hort. Soc** 100: 7-9.

- Miller, W.R., Spalding, D.H. and Hale P.W. 1986. Film wrapping mangoes at advancing stage of postharvest ripening. **Tropical Science** 26: 9-17.
- Peng, G. and J.C. Sutton. 1990. Biological methods to control gray mould of strawberry, pp. 233-240. *In Proceedings of Brighton Crop Protection Conference on Pest Diseases* Vol. 1. Brighton, UK.
- Peng, G., J.C. Sutton and P.G. Kevan. 1992. Effectiveness of honey bees for applying the biocontrol agent *Gliocladium roseum* to strawberry flowers to suppress *Botrytis cinerea*. Can. J. **Plant Pathology** 14: 117-129.
- Prior, C., F. Elango and A. Whitwell. 1992. Chemical control of *Colletotrichum* infection in Mangoes. pp. 326-336. *In* Bailey, J. A. and M. J. Jeger eds. **Colletotrichum: Biology, Pathology and Control**. CAB International, Wallingford.
- Pusky, P.L. and N.T. Keen. 1993. Involvement of preformed antifungal compounds in the resistance of subtropical fruits to fungal decay. **Plant Disease** 77: 114-119.
- Pusey, P. L. and C. L. Wilson. 1984. Postharvest biological control of stone fruit brown rot by *Bacillus subtilis*. **Plant Disease** 68: 753-756.
- Pusey, P. L. 1989. Use of *Bacillus subtilis* and related organisms as biofungicides. **Pesticide Science** 27: 133-140.
- Quimio, T.H. and A.J. Quimio. 1974. **Compendium of postharvest diseases of fruits in the Philippines**. UPLB Technical Bulletin (UPLB44).
- Sangchote, S. 1989. Relationship between the physiological state of mangoes and the incidence of anthracnose *Colletotrichum gloeosporioides*. (Penz.). **ASEAN Food Journal** 4: 123-124.

Sequeira, L. 1987. Biological control of plant pathogens: Present status and future prospects.

Rarasites 86: 217-235.

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.

Singh, V. and J.L. Faull. 1988. Antagonism and biological control, pp 167-178. *In* Mukerji, K.G.

and K.L. Garg. (eds.). **Biocontrol of plant diseases Vol 2**. Boca Raton, Florida, USA.

Son-Quang, D. 2002. **Post-harvest Loss of Mango due to Anthracnose and Its Infection**

Biology and Resistance of Mango to the Disease. M.S. thesis, Kasetsart University.

Streeter, JG. 2003. Effect of trehalose on survival of *Bradyrhizobium japonicum* during

desiccation. **Journal of Applied Microbiology** 95(3): 484-491.

Sugawara, M. EJ. Cytryn, and MJ. Sadowsky. 2010. Functional role of *Bradyrhizobium*

japonicum trehalose biosynthesis and metabolism genes during physiological stress and nodulation. **Applied Environmental Microbiology** 76(4): 1071-1081.

Sutton, B.C. 1980. **The Coelomycetes Imperfecti with Pycnidia Acervuli and Stromata**.

Commonwealth Mycological Institute, Kew, UK.

Sutton, B.C. 1980. The Genus *Glomerella* and its Anamorph *Colletotrichum*, pp. 1-26. *In*

Bailey, J.A. and M.J. Jeger, eds. **Colletotrichum: Biology, Pathology and Control**.

CAB international, Wallingford.

Tandon, J.W. and B.B. Singh. 1968. Control of mango anthracnose (*C. gloeosporioides*) by

fungicides. **Indian Phytopathology** 21: 212-216.

- Uhm, K. H., I. P. Ahn, S. Kim and Y. H. Lee. 2003. Effects of calcium on biocontrol activity of Yeast extract antagonists against the postharvest fungal pathogen, *Rhizopus stolonifer*. **Plant Pathology** 51: 352-358.
- Waller, J.M. 1992. *Colletotrichum* disease of perennial and cash crop, pp. 167-185. In Bailey, J.A. and M.J. Jeger, eds. **Colletotrichum: Biology, Pathology and Control**. CAB international, Wallingford.
- Webster, J. and R.W.S. Weber. 2007. **Introduction to Fungi**. Cambridge University Press. New York.
- Wilson, C.L. and M.E. Wisniewski. 1994. **Biological Control of Postharvest diseases – Theory and Practice** CRC Press. Boca Raton, FL, USA.
- Wisniewski, M.E., C. Wilson, A. El Ghaouth and S. Droby. 2001. Non-chemical approaches to postharvest disease control. **Acta Horticulturae** 553: 407-412.
- Wisniewski, M.E., C. Wilson, S. Droby, E. Chalutz, A. El Ghaouth and C. Stevens. 2007. Postharvest biocontrol: new concepts and applications, pp. 262-273. In Vincent, C., M.S. goettel and G. Lazarovits 2007 (Eds). **Biological Control A Global Perspective**. CABI. Cambridge, MA, USA.
- Wittig, H.P.P., K.B. Johnson and J.W. Pscheidt. 1997. Effect of epiphytic fungi on brown rot blossom blight and latent infections in sweet cherry. **Plant Disease** 81: 383-387.





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

1. Glucose Yeast extract Peptone Broth (GYPB)

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

2. Glucose Yeast extract Peptone Agar (GYPA)

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

3. Trehalose Yeast extract extractPeptone Broth (TYPB)

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

4. Starch Agar (Starch Hydrolysis)

Soluble Starch	2	กรัม
Beef agar	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Agar	15	กรัม

5. Hugh and Leifson medium (H-L medium)

Glucose	10	กรัม
Peptone	2	กรัม
NaCl	5	กรัม
KH_2PO_4	3	กรัม
Agar	3	กรัม
Bromthymol blue (1 % aqueous solution)	3	มิลลิลิตร



1. วิธีการและการเตรียมสารเคมีสำหรับการย้อมสีแกรม

1.1 การเตรียมสารเคมีสำหรับการย้อมสีแกรม

1.1.1 Ammonium oxalate crystal violet

Crystal violet	2	กรัม
95% ethanol	20	มิลลิลิตร

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

1.1.2 Gram's iodine

Crystal iodine	1	กรัม
Potassium iodine	2	กรัม
น้ำกลั่น	300	มิลลิลิตร

ละลาย crystal iodine ในสารละลาย potassium iodine ปริมาตร 300 มิลลิลิตร จนเป็นเนื้อเดียวกัน จะได้สารละลายสีน้ำตาลเข้ม เก็บไว้ในขวดสีชาเพื่อป้องกันแสง หากสารละลายเก่าจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ไม่ควรนำมาใช้ทดสอบ

1.1.3 Safranin water solution

Safranin O	2.5	กรัม
95% ethanol	100	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

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

1.2 วิธีการย้อมสีแกรม

smear แบคทีเรียที่มีอายุ 24-48 ชั่วโมง บนกระจกสไลด์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปล่อยให้แห้ง ตรึงเซลล์แบคทีเรียโดยการลนผ่านเปลวไฟไปมา 2-3 ครั้ง หยด crystal violet ให้ทั่วมรอย smear นาน 1 นาที ล้างด้วยน้ำ หยด gram's iodine ให้ทั่วมรอย 1 นาที ล้างด้วย 95% ethanol นาน 15 วินาที ล้างน้ำตามทันที ซับให้แห้ง ย้อมทับด้วย safranin O นาน 1 นาที ล้างด้วยน้ำแล้วซับให้แห้ง นำไปตรวจดูลักษณะเซลล์และการติดสีแกรมด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า

2. วิธีการและการเตรียมสารเคมีสำหรับการย้อมเอนโดสปอร์

2.1 การเตรียมสารเคมีสำหรับการย้อมเอนโดสปอร์

2.2.1 Malachite green solution

Malachite green	5	กรัม
น้ำกลั่น	95	มิลลิลิตร

ละลาย malachite green ในน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร จนเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่เหลือ นำสารละลายผ่านกระดาษกรอง (whatman No. 1) ไปใช้

2.2 วิธีการย้อมเอนโดสปอร์

Smear แบคทีเรียอายุ 72-96 ชั่วโมง บนกระจกสไลด์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปล่อยให้แห้ง ตรึงเซลล์แบคทีเรียโดยการลนผ่านเปลวไฟไปมา 2-3 ครั้ง หยด malachite green ให้ทั่วมรอย smear อังสไลด์บนไอน้ำเดือดหรือเปลวไฟ สลับกับปล่อยให้เย็น และคอยเติมสีย้อมให้แห้ง เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำ แล้วย้อมทับด้วย safranin O นาน 1 นาที ล้างด้วยน้ำซับให้แห้ง นำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า เซลล์แบคทีเรียจะติดสีแดงของ safranin O และสปอร์จะติดสีเขียวของ malachite green

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ นางสาวศันสนีย์ ศิลปสุนทร

เกิดวันที่ 24 เมษายน 2526

สถานที่เกิด อำเภอเมือง จังหวัดเพชรบุรี

ประวัติการศึกษา วท.บ. (เกษตรศาสตร์) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตำแหน่งปัจจุบัน -

สถานที่ทำงานปัจจุบัน -

ผลงานดีเด่นและ/หรือรางวัลทางวิชาการ -

ทุนการศึกษาที่ได้รับ -