

การควบคุมโรครากเน่าและโคนเน่าของทุเรียนโดยใช้ชีวภัณฑ์
 ที่ผลิตได้จากเชื้อ *Bacillus subtilis*
 Controlling Phytophthora Root Rot and Stem Rot of Durian
 by Biological Product from *Bacillus subtilis*

นลินี ศิวากรณ^{1/} พงนา ตระกูลสุขรัตน์^{1/} ศิริพร วรกุลดำรงชัย^{2/}
^{1/} กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
^{2/} ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 6

รายงานความก้าวหน้า

โรครากเน่าและโคนเน่าของทุเรียนนับเป็นปัญหาที่สำคัญมากต่อการปลูกทุเรียนซึ่งมีสาเหตุเกิดจากเชื้อรา *Phytophthora palmivora* Butler(1919) การค้นพบเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ที่มีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งและกำจัดเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าของทุเรียนในห้องปฏิบัติการโดยไม่ทำให้ทุเรียนเกิดโรค ได้แก่ เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* strain 5102 ผลิตภัณฑ์จากเชื้อ *Bacillus subtilis* 5102 สามารถรักษาโรครากเน่าโคนเน่าของทุเรียนได้โดยต้นที่ได้รับการรักษาด้วยการลอกเปลือกบริเวณที่เป็นโรคและทาด้วยผลิตภัณฑ์ผงเชื้อ *B. subtilis* 5102 จำนวน 4 ครั้งรวมทั้งใช้เข็มฉีดเชื้อ *B. subtilis* 5102 จำนวน 1 ครั้งต้นทุเรียนที่ได้รับการรักษาอาการโคนเน่าจะเริ่มหายเป็นปกติโดยเนื้อเยื่อส่วนที่เป็นโรคฟื้นตัวเป็นเนื้อไม้ปกติ ผลที่เป็นโรคแห้ง บริเวณที่เป็นแผลสีน้ำตาลเป็นจุดเล็กกระจายตัวไม่รวมตัวกันเนื้อเยื่อบางส่วนเริ่มกลับเป็นเนื้อเยื่อปกติมีสีขาว น้ำยางสีน้ำตาลหยุดไหล ต้นทุเรียนมีลักษณะสมบูรณ์ฟื้นตัวใบตั้งมีสีเขียวสดใส ส่วนต้นทุเรียนที่ทาและราดดินด้วยสารเคมีเมทาแลกซิลเนื้อเยื่อบริเวณแผลที่เป็นโรคมีย่นน้ำตาล ฉ่ำน้ำเป็นบริเวณกว้างตามรอยแผลที่เป็นโรค เนื้อเยื่อเปื่อยยุ่ยและมีน้ำยางสีน้ำตาลไหลตามแผลที่ทาด้วยสารเคมีจนเป็นแผลฉ่ำน้ำบริเวณกว้าง ต้นและใบไม่ฟื้นตัว ต้นทุเรียนมีคะแนนระดับการเป็นโรคบนต้นที่ใช้ผลิตภัณฑ์ผงเชื้อ *B. subtilis* 5102 ต่ำกว่าการใช้สารเคมีเมทาแลกซิล และปริมาณ sporangium ที่ตรวจพบในดินก่อนการทดลองในกรรมวิธีการใช้ผลิตภัณฑ์ผงเชื้อ *B. subtilis* 5102 พบปริมาณ sporangium ที่ระดับ 5.47 และก่อนการใช้สารเคมีเมทาแลกซิลพบปริมาณ sporangium ที่ระดับ 3.60 และหลังจากใส่ผลิตภัณฑ์ผงเชื้อ *B. subtilis* 5102 พบปริมาณ sporangium อยู่ในระดับเดียวกับการใช้สารเคมีเมทาแลกซิล โดยใช้ผลิตภัณฑ์ผงเชื้อ *B. subtilis* 5102 พบปริมาณ sporangium ที่ระดับ 2.65 ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีการใช้สารเคมีเมทาแลกซิล ตรวจพบปริมาณ sporangium ที่ระดับ 1.88

รหัสการทดลอง 01-21-54-02-03-00-03-54

คำนำ

ทุเรียน (Durian) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Durio zibethinus* Murr อยู่ในวงศ์ (Family) Bombacaceae เชื่อว่าทุเรียนมีถิ่นกำเนิดแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ทุเรียนในประเทศไทยเข้าใจว่าคงนำพันธุ์มาจากมาเลเซียเข้ามาปลูกในสมัยกรุงศรีอยุธยาและในระยะแรกคือทุเรียนพันธุ์พื้นเมือง (มนัส.2545) ในปัจจุบันทุเรียนจัดเป็นผลไม้ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ จนได้รับการยกย่องให้เป็น ”ราชาแห่งผลไม้” (นายดำ,2535) พันธุ์ที่ชาวสวนนิยมปลูกมากที่สุดคือหมอนทอง 53.98 % ชะนี 37.30 % ก้านยาว 5.75% กระดุม 2.97 % (นิรนาม, 2535)

โรครากเน่าและโคนเน่าเป็นโรคที่มีมานานมากกว่า 30 ปีและสร้างความเสียหายตั้งแต่ในอดีตจนถึงปัจจุบันมากกว่า 40,000 ไร่ (นิรนาม,2537) การป้องกันกำจัดมีหลายวิธี ถึงแม้จะใช้ต้นตอต้านทานโรคร่วมกับการใช้สารเคมี การระบาดของโรครากเน่าโคนเน่าของทุเรียนก็ยังคงเกิดขึ้นอยู่เป็นประจำ ซึ่งการใช้สารเคมีสามารถควบคุมโรคได้ในระยะสั้นๆ เท่านั้น การควบคุมโดยชีววิธีเป็นอีกทางเลือกหนึ่งซึ่งจะนำมาใช้ควบคุมโรครากเน่าโคนเน่า ซึ่งในปัจจุบันมีการจำหน่ายเชื้อราไตรโคเดอร์มาช่วยลดปริมาณเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าและโคนเน่า แต่การระบาดของโรคก็ยังคงมีอยู่และยังเป็นปัญหาที่สำคัญต่อการปลูกทุเรียน ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาเพื่อหาเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์อื่น ๆ ที่เฉพาะเจาะจงซึ่งมีประสิทธิภาพดีในการควบคุมโรครากเน่าโคนเน่าของทุเรียน เพื่อนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ให้เกษตรกรมีทางเลือกและวิธีการที่ดีในการป้องกันกำจัดโรครากเน่าและโคนเน่าของทุเรียนต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. แปลงปลูกทุเรียนอำเภอแก่งหางแมว จังหวัดจันทบุรี
2. อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA, PSA, PDB, PSB, น้ำนิ่งฆ่าเชื้อ, แอลกอฮอล์
3. ผงแป้งทัลคัม,แมกนีเซียมซัลเฟต, เมททิลเซลลูโลส
4. เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* strain 5102
5. กล้องจุลทรรศน์, เครื่องเขย่า, เครื่องกรองแบคทีเรีย, เครื่องดูดจ่ายสารละลาย, เครื่องชั่งและหม้อนึ่งความดัน
6. กล้องจุลทัศน์ และวัสดุอุปกรณ์วิทยาศาสตร์ในห้องปฏิบัติการ

วิธีการ

การศึกษาประสิทธิภาพของผงเชื้อ *Bacillus subtilis* 5102 ต่อโรครากเน่าโคนเน่าของทุเรียนในแปลงปลูก อำเภอแก่งหางแมว จังหวัดจันทบุรี

1 การผลิตผงเชื้อ *B. subtilis* 5102

1.1 เตรียมอาหารเหลว PDB จำนวน 1 ลิตร แล้วแบ่งใส่ขวดทดลองรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ขวดละ 250 มิลลิลิตรจำนวน 4 ขวด ปิดฝาขวดด้วยสำลี จากนั้นนำไปนึ่งด้วยหม้อนึ่งความดัน

1.2. นำเข็มเย็บที่มีหัวปลายลวดม้วนเป็นลูปวงกลมมาลนไฟเพื่อฆ่าเชื้อแล้วนำไปแตะลากเอาเชื้อ *B. subtilis* 5102 ที่เลี้ยงอยู่ในหลอดทดลองบนอาหาร PSA จากนั้นนำไปใส่ลงในขวดอาหารเหลว PDB ที่เตรียมไว้ในข้อ 1.1 โดยใส่ขวดละ 1-2 ลูป

1.3. นำขวดอาหาร PDB ที่ใส่เชื้อ *B. subtilis* 5102 มาเลี้ยงภายใต้เครื่องเขย่าด้วยความเร็วอัตรา 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 2-7 วัน

1.4. หลังจากนั้นนำสารแมกนีเซียมซัลเฟตจำนวน 3 กรัม ใส่ลงไปในแต่ละขวดทดลองที่เลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* 5102 ตามระยะเวลาที่กำหนดในข้อ 1.3 แล้วเขย่าต่อไปเพื่อให้สารแมกนีเซียมซัลเฟตละลายในอาหาร

1.5. ต่อมานำสารเมทิลเซลลูโลสจำนวน 25 กรัม ผสมกับน้ำร้อน 1 ลิตร โดยเทสารเมทิลเซลลูโลสทีละน้อยลงไปใต้น้ำร้อนพร้อมกับใช้ช้อนตักสารเคมีคนไปเรื่อย ๆ เพื่อให้สารเมทิลเซลลูโลสละลายใต้น้ำร้อนจนมีสีขาวใส

1.6. นำสารละลายเมทิลเซลลูโลสที่เย็นแล้วจำนวน 250 มิลลิลิตรไปผสมกับเชื้อ *B. subtilis* 5102 ที่เลี้ยงในอาหารเหลวในขวดทดลองแต่ละขวดในข้อ 1.4 โดยผสมอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร แล้วใช้ช้อนคนให้เป็นเนื้อเดียวกัน

1.7. นำผงทัลคัมที่อบฆ่าเชื้อแล้วจำนวน 1.2 กิโลกรัม ใส่ลงในภาชนะหม้อหรือกะละมัง แล้วนำเชื้อ *B. subtilis* 5102 ในข้อ 1.6 ค่อยๆ เทลงไปผสมกับผงทัลคัมที่เตรียมไว้ แล้วใช้ทัพพีคนให้เข้ากันกับเชื้อ *B. subtilis* 5102 จำนวน 1 ลิตร

1.8. นำส่วนผสมในข้อ 1.7 ตักใส่ในตะกร้าพลาสติกที่สะอาดที่มีกระดาษฟอยด์รองกันตะกร้า แล้วเกลี่ยให้เป็นแผ่นบาง ๆ ต่อมานำไปผึ่งให้แห้งในอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน

1.9. หลังจากแห้งแล้วหักให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ นำไปบดให้เป็นผงด้วยเครื่องปั่นแห้ง แล้วบรรจุใส่ถุงพลาสติกที่มีซิปปิดเก็บไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 18°C

1.10. ผลิตภัณฑ์ผงเชื้อ *B. subtilis* 5102 ที่ได้เป็นผลิตภัณฑ์พร้อมใช้สำหรับเกษตรกรในการป้องกันกำจัดโรคพืช

2. ศึกษาประสิทธิภาพของผงเชื้อ *B. subtilis* 5102 ต่อโรครากเน่าและโคนเน่าของทุเรียนในแปลงปลูกทุเรียนอำเภอแก่งหางแมว จังหวัดจันทบุรี วางแผนการทดลองจำนวน 2 กรรมวิธี 7 ไร่ ละ 1 ต้นดังนี้

1. ลอกเปลือกโคนต้นส้มทุเรียนบริเวณที่เป็นโรคแล้วทาด้วยผงเชื้ออัตรา 200 กรัม ต่อน้ำ 200 มล. ซึ่งผสมสารจับใบอัตรา 5 ซีซี/น้ำ 20 ลิตร และราดดินบริเวณโคนต้นด้วยผงเชื้ออัตรา 50 กรัม/น้ำ 5 ลิตร

2. ลอกเปลือกโคนต้นส้มโอบริเวณที่เป็นโรคแล้วทาด้วยผงเชื้ออัตรา 200 กรัม ต่อน้ำ 200 มล. ซึ่งผสมสารจับใบอัตรา 5 ซีซี/น้ำ 20 ลิตร และราดดินบริเวณโคนต้นด้วยน้ำหมักสูตรที่ 1 (กากน้ำตาล 1 กก.+น้ำ 25 ลิตร+ผงเชื้อ 180 กรัม)

3. เก็บตัวอย่างดินเพื่อตรวจหา sporangium ก่อนทำการทดลองและหลังทำการทดลองเมื่อใช้กรรมวิธีต่าง ๆ ไปแล้ว 4 ครั้ง จากนั้นนำตัวอย่างดินมาชั่ง 10 กรัม ใส่ในจานอาหารที่อบฆ่าเชื้อแล้วเติมน้ำนิ่งฆ่าเชื้อลงในจาน 20 มล. จากนั้นนำไปทุเรียนตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยมขนาด 0.5 ซม. มาลอยในจานจำนวน 10 ชิ้น/จาน แล้วบ่มทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน จึงนำไปแต่ละชิ้นมาตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (baiting technique) และประเมินปริมาณ sporangium ที่ตรวจพบดังนี้

1 = ไม่พบ sporangium

- 2 = พบ sporangium 1-10 sporangium/ชิ้น
 3 = พบ sporangium 11-20 sporangium/ชิ้น
 4 = พบ sporangium 21-30 sporangium/ชิ้น
 5 = พบ sporangium 31-50 sporangium/ชิ้น
 6 = พบ sporangium 51-70 sporangium/ชิ้น
 7 = พบ sporangium 71-100 sporangium/ชิ้น
 8 = พบมากกว่า sporangium 100 sporangium/ชิ้น

เวลาและสถานที่ ตุลาคม 2555 – กันยายน 2556

ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิทยาไมโค สอพ. กรมวิชาการเกษตร
 แปลงทุเรียนของเกษตรกร อ.แก่งหางแมว จังหวัดจันทบุรี

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาประสิทธิภาพของผงเชื้อ *Bacillus subtilis* 5102 ต่อโรครากเน่าโคนเน่าของทุเรียนในแปลงปลูก อำเภอแก่งหางแมว จังหวัดจันทบุรี พบว่า กรรมวิธีทาผลและราดดินด้วยผลิตภัณฑ์ผงเชื้อจากเชื้อ *B. subtilis* 5102 และฉีดด้วยสารละลายทำให้ต้นทุเรียนมีลักษณะสมบูรณ์ พื้นที่ใบตั้งมีสีเขียวสดใส เนื้อเยื่อบริเวณแผลที่เป็นโรคพื้นตัวเป็นเนื้อไม้ปกติ แผลที่เป็นโรคแห้ง บริเวณที่เป็นแผลสีน้ำตาลเป็นจุดเล็กกระจายตัวไม่รวมตัวกันเนื้อเยื่อบางส่วนเริ่มกลับเป็นเนื้อเยื่อปกติ มีสีขาว น้ำยางสีน้ำตาลหยุดไหล ส่วนต้นทุเรียนที่ทาและราดดินด้วยสารเคมีเมทาแลกซิลเนื้อเยื่อบริเวณแผลที่เป็นโรคมีสีน้ำตาลฉ่ำน้ำเป็นบริเวณกว้างตามรอยแผลที่เป็นโรค เนื้อเยื่อเปื่อยยุ่ยและมีน้ำยางสีน้ำตาลไหลตามแผลที่ทาด้วยสารเคมีจนเป็นแผลฉ่ำน้ำบริเวณกว้าง ต้นและใบไม้พื้นตัว และตรวจให้คะแนนต้นที่ทำการทดลองพบว่าต้นที่ใส่เชื้อ *B. subtilis* 5102 ให้คะแนนระดับ 2.8 ส่วนต้นที่ใช้สารเคมีเมทาแลกซิลให้คะแนนเฉลี่ย 3.33 ส่วนปริมาณ sporangium ที่ตรวจพบในดินก่อนใส่สารเคมีเมทาแลกซิลตรวจพบระดับ 3.60 และหลังใช้สารเคมีตรวจพบระดับ 1.88 ในกรรมวิธีใช้ผงเชื้อ *B. subtilis* 5102 ก่อนทำการทดลองตรวจพบปริมาณ sporangium ระดับ 5.47 และหลังจากใช้ผงเชื้อ *B. subtilis* 5102 ตรวจพบระดับ 2.65 (ตารางที่ 1)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ผลิตภัณฑ์จากเชื้อ *Bacillus subtilis* 5102 สามารถรักษาโรครากเน่าโคนเน่าของทุเรียนได้ โดยต้นที่ได้รับการรักษาด้วยการลอกเปลือกบริเวณที่เป็นโรคและทาด้วยผลิตภัณฑ์ผงเชื้อ *B. subtilis* 5102 จำนวน 4 ครั้งรวมทั้งใช้เข็มฉีดเชื้อ *B. subtilis* 5102 จำนวน 1 ครั้งต้นทุเรียนที่ได้รับการรักษาอาการโคนเน่าจะเริ่มหายเป็นปกติโดยเนื้อเยื่อส่วนที่เป็นโรคพื้นตัวเป็นเนื้อไม้ปกติ แผลที่เป็นโรคแห้ง บริเวณที่เป็นแผลสีน้ำตาลเป็นจุดเล็กกระจายตัวไม่รวมตัวกันเนื้อเยื่อบางส่วนเริ่มกลับเป็นเนื้อเยื่อปกติ มีสีขาว น้ำยางสีน้ำตาลหยุดไหล ต้นทุเรียนมีลักษณะสมบูรณ์พื้นที่ใบตั้งมีสีเขียวสดใส ซึ่งจากการตรวจ sporangium ของเชื้อสาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าของทุเรียน ต้นทุเรียนมีคะแนนระดับการเป็นโรคบนต้นจากการใช้ผงเชื้อ *B. subtilis* 5102 ต่ำกว่าการใช้สารเคมีเมทาแลกซิล และปริมาณ sporangium ที่ตรวจพบในดินของกรรมวิธีการใช้ผงเชื้อ *B. subtilis* 5102 อยู่ในระดับเดียวกับการใช้สารเคมีเมทา

แลกซิลโดยใช้ผงเชื้อ *B. subtilis* 5102 พบปริมาณ sporangium ที่ระดับ 2.65 ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับกรรมวิธีที่ใช้สารเคมีเมทาแลกซิลพบปริมาณ sporangium ที่ระดับ 1.8

เอกสารอ้างอิง

- มนัส ดาเกลียง. 2545. พันธุ์ทุเรียนเมืองลับแล. คณะเกษตรศาสตร์และสิ่งแวดล้อม สถาบันราชภัฏอุตรดิตถ์. 17 หน้า
- นายดำ ฉิงสุวรรณโรจน์. 2535. การผลิตผลไม้นอกฤดูและการบำรุงรักษา. สมาคมนักโรคพืชแห่งประเทศไทย. 128 หน้า.
- นิรนาม. 2535. การผลิตผลไม้นอกฤดูและการบำรุงรักษา. สมาคมนักโรคพืชแห่งประเทศไทย. 128 หน้า.
- นิรนาม. 2537. ทุเรียน. หน้า 38-39 ใน: กลุ่มไม้ผล. รายงานประจำปี 2537 สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์
- Tek Chand Bhalla, Nitya Nand Sharma and Monica Sharma, 2009. FOOD AND INDUSTRIAL MICROBIOLOGY: Production of Metabolites, Industrial enzymes, Amino acid, Organic acids, Antibiotics, Vitamins and Single Cell Proteins. Available Source: <http://www.pdfdocspace.com/docs/1511/food-and-industrial-microbiology-production-of-metabolites-industrial-enzymes-amino-acid-organic-acids-antibiotics-.html>. 6 Feb 2012.

ภาคผนวก

ตารางที่ 1 ปริมาณ sporangium ของเชื้อรา *Phytophthora palmivora* สาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าของทุเรียน

กรรมวิธี	ระดับ	ค่าเฉลี่ยปริมาณ sporangium/ ชิ้น
1. ก่อนใส่สารเคมีเมทาแลกซิล	3	3.60
2. ก่อนใส่ผลิตภัณฑ์ผงเชื้อ <i>B. subtilis</i> 5102	4	5.47
3. หลังจากใช้สารเคมีเมทาแลกซิล	1	1.88
4. หลังจากใช้ผลิตภัณฑ์ผงเชื้อ <i>B. subtilis</i> 5102	2	2.65
ค่าเฉลี่ย		3.40
CV.		46.9%**