การควบคุมโรครากเน่าและโคนเน่าของทุเรียนโดยใช้ชีวภัณฑ์ที่ผลิตได้จากเชื้อ *Bacillus subtilis*

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

นลินี ศิวากรณ์ พจนา ตระกูลสุขรัตน์

เพลินพิศ สงสังข์ ศิริพร วรกุลดำรงชัย

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

โรครากเน่าและโคนเน่าของทุเรียนนับเป็นปัญหาที่สำคัญมากต่อการปลูกทุเรียนซึ่งมีสาเหตุเกิดจากเชื้อรา *Phytophthora palmivora* Butler(1919) จากการค้นพบเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ที่มีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งและกำจัดเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าของทุเรียนโดยไม่ทำให้ทุเรียนเกิดโรค ได้แก่ เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* strainWD20 จากการนำสารกรองจากเชื้อ *B. subtilis* strain WD20 ไปทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าและโคนเน่าของทุเรียนพบว่าเชื้อ *B. subtilis* strain WD20ที่เลี้ยงในอาหารPDBสามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อรา*P. palmivora* ได้ 90.91% เป็นเวลานานถึง 30 วัน ส่วนเชื้อ *B. subtilis* WD20 ที่เลี้ยงในอาหารPSB สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อรา*P. palmivora* ได้ 90 % เป็นเวลาเพียง 10 วัน และต่อมาเชื้อ *P. palmivora* สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ทำให้การยับยั้งการเจริญเติบโตลดลงเป็น 88.57 และ87.25 %ที่ 14 และ 30 วันตามลำดับ

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) พันธุ์ที่ชาวสวนนิยมปลูกมากที่สุดคือหมอนทอง53.98 % ชะนี37.30 % ก้านยาว5.75% กระดุม2.97 % (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. ตัวอย่างโรครากเน่าและโคนเน่าของทุเรียน
2. อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA, PSA, PDB, PSB, น้ำนึ่งฆ่าเชื้อ, แอลกอฮอล์
3. เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* strain WD20
4. กล้องจุลทรรศน์, เครื่องเขย่า, เครื่องกรองแบคทีเรีย, เครื่องดูดจ่ายสารละลาย, เครื่องชั่งและหม้อนึ่งความดัน
5. กล้องจุลทัศน์ และวัสดุอุปกรณ์วิทยาศาสตร์ในห้องปฏิบัติการ

วิธีการ

ศึกษาประสิทธิภาพของสารกรอง(culture filtrate) จากเชื้อ *B. subtilis* WD20 เปรียบเทียบกับเชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์อื่นต่อเชื้อรา *P. palmivora*

1 นำเชื้อ *B. subtilis* WD20 และเชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์อื่นจำนวน 3 ไอโซเลท ที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง PSA มาเลี้ยงในอาหารเหลว PDBและPSB เป็นเวลา 2 และ 7 วัน

2 นำเชื้อที่เลี้ยงในข้อ1 ไปเข้าเครื่องเหวี่ยงโดยให้สารตกตะกอนที่ความเร็ว 7000 รอบ/วินาที อุณหภูมิ 20^0 ซ.

3 นำส่วนที่เป็นน้ำใสของเชื้อที่ผ่านเครื่องเหวี่ยงในข้อ 2 มากรองด้วยเครื่องกรองแบคทีเรีย

4 นำสารละลาย culture filtrate จากเชื้อที่ได้ในข้อ 3 จำนวน 20 มล.ไปผสมกับอาหาร PDA ที่หลอมเหลวซึ่งทิ้งให้เย็นลงจำนวน 80 มล. จากนั้นเทใส่จานอาหารที่อบฆ่าเชื้อ

5 นำ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.6 ซม.มาเจาะบนจานอาหารที่เลี้ยงเชื้อรา *P. palmivora*
ในข้อ 1 แล้วนำมาวางบนอาหารที่ผสมสารละลาย culture filtrate จากเชื้อในข้อ 4

6 ตรวจวัดการเจริญเติบโตของเชื้อรา *P. palmivora* ที่เลี้ยงบนอาหารในข้อ5 เป็นเวลา 7, 14, 21 และ 30 วัน

7 นำเชื้อราสาเหตุที่ไม่เจริญเติบโตในข้อ6 มาเลี้ยงบนจานอาหารPDA เพื่อตรวจสอบคุณสมบัติของการมีชีวิตอยู่ของเชื้อรา *P. palmivora* ภายหลังจากถูกยับยั้งการเจริญเติบโตเมื่อได้รับสารสกัดจากเชื้อ *B. subtilis* WD20

เวลาและสถานที่ ตุลาคม 2553 – กันยายน 2554

ห้องปฏิบัติงานกลุ่มงานวิทยาไมโค สอพ. กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ศึกษาประสิทธิภาพของสารกรอง(culture filtrate)จากเชื้อ *B. subtilis* WD20 ต่อเชื้อรา *P. palmivora* พบว่าสารกรองที่ได้จากเชื้อ *B. subtilis* WD20 ซึ่งเลี้ยงบนอาหารPDBเป็นเวลา 2, 5 และ7 วันสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *P. palmivora* โดยให้ขนาดโคโลนีเท่ากับที่วางเชื้อทดสอบ 0.60 ซม.เป็นเวลา 14 วันซึ่งคำนวณเป็นค่าเฉลี่ยการยับยั้งการเจริญเติบโตเท่ากับ90.91% โดยเชื้อรา *P. palmivora* ไม่สามารถเจริญเติบโตบนอาหารPDA ที่ผสมด้วยสารกรองจากเชื้อ *B. subtilis* WD20 ดังนั้นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจึงเป็นแบบยับยั้งการเจริญเติบโต(Fungistasis) และปฏิกิริยาการยับยั้งยังคงอยู่ต่อเนื่องไปบนอาหารเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน ส่วนสารกรองจากเชื้อ *B. subtilis* WD20 ที่เลี้ยงในอาหารPSB สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *P. palmivora* โดยให้โคโลนีขนาด 0.60 ซม. เป็นเวลา 10 วันคำนวณเป็นค่าเฉลี่ยการยับยั้งการเจริญเติบโตเท่ากับ 90 % และต่อมาเชื้อ *P. palmivora* สามารถเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารกรองจากเชื้อ *B. subtilis* WD20 โดยให้โคโลนีขนาด 0.80และ 1.02 ซม. เป็นเวลา 14 และ30 วันตามลำดับและคำนวณเป็นค่าเฉลี่ยการยับยั้งการเจริญเติบโตเท่ากับ 88.57 และ87.25 % ตามลำดับ จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *B. subtilis* WD20 ที่เลี้ยงในอาหารPDBสามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อรา*P. palmivora* และสารนี้สามารถปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ในอาหารที่เชื้ออาศัยอยู่(substrate) ส่วนเชื้อ *B. subtilis* WD20 ที่เลี้ยงในอาหารPSB สามารถสร้างสารยับยั้งได้แต่ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจากการเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* WD20แสดงปฏิกิริยาการยับยั้งเป็นเวลานานกว่า แสดงว่าเมื่อเชื้ออาศัยอยู่ในอาหารต่างชนิดกัน(substrate) ประสิทธิภาพของสารปฏิชีวนะที่เชื้อสร้างขึ้นจะมีความแตกต่างกันตามแหล่งอาหารที่เชื้ออาศัยอยู่ เนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อPDB เป็นอาหารที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อราซึ่งในสูตรอาหาร

มีเพียงน้ำตาลและมันฝรั่งจึงเป็นอาหารที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อPSB เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมสารโปรตีน คาร์บอนและไนโตรเจนเพื่อให้เป็นอาหารที่อุดมสมบูรณ์เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย(enriched media) ซึ่งขบวนการสันดาปที่ผลิตสารในขั้นทุติยภูมิ(secondary metabolite)ในการสร้างสารออกฤทธิ์ที่เกิดขึ้นจากการทดลองนี้ได้เกิดขึ้นในอาหารที่ไม่มีความอุดมสมบูรณ์ดีกว่าในอาหารที่มีความอุดมสมบูรณ์เช่นเดียวกับ Tek *et al.*(2009) ขบวนการสันดาปในขั้นปฐมภูมิ(primary metabolite)ของเชื้อจุลินทรีย์จะ สังเคราะห์สารที่มีความจำเป็นต่อการพัฒนาการเจริญเติบโตและการขยายพันธุ์เช่น กรดอะมิโน กรดอินทรีย์ แอลกอฮอล์ nucleotides และเอนไซม์บางชนิดของผลิตภัณฑ์จากการเผาผลาญอาหารในขั้นปฐมภูมิต่อมาจุลินทรีย์จะเข้าสู่ในระยะหยุดนิ่ง เนื่องจากสารอาหารลดลงเชื้อจุลินทรีย์จะหยุดการเจริญเติบโตและการขยายพันธุ์ เชื้อจุลินทรีย์บางชนิดจะสร้างสารที่ไม่จะเป็นต่อการเจริญเติบโตในขั้นตอนทุติยภูมิของขบวนการสันดาปเช่น สารปฏิชีวนะ ท็อกซิน และสารที่มีมูลค่าทางการค้า

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

เชื้อ *B. subtilis* WD20 ที่เลี้ยงในอาหารPDB สามารถผลิตปฏิชีวนสารออกมาภายนอกเซลล์ในขบวนการสันดาปในขั้นทุติยภูมิให้สารออกฤทธิ์นานถึง 30 วันในการยับยั้งเชื้อรา *P. palmivora* ได้ 90.91% เป็นเวลานานถึง 30 วัน และเชื้อ *B. subtilis* WD20 ที่เลี้ยงในอาหารPSBให้ปฏิกิริยาการยับยั้งการเจริญเติบโตเท่ากับ 90 %เป็นเวลา 10 วัน และต่อมาเชื้อรา *P. palmivora* สามารถเจริญเติบโตต่อไปทำให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตต่อเชื้อราสาเหตุลดลง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพของสารปฏิชีวนะที่ได้จากเชื้อ*B. subtilis* WD20 มีประสิทธิภาพที่แตกต่างกันตามแหล่งอาหารที่เชื้ออาศัยอยู่และในแหล่งอาหารที่ไม่มีความอุดมสมบูรณ์ต่อการเจริญเติบโตเชื้อจะสร้างปฏิชีวนสารได้ดีกว่าในแหล่งอาหารที่มีความอุดมสมบูรณ์

เอกสารอ้างอิง

มนัส ดาเกลี้ยง. 2545. พันธุ์ทุเรียนเมืองลับแล. คณะ เกษตรศาสตร์และสิ่งแวดล้อม สถาบันราชภัฏอุตรดิตถ์. 17 หน้า

นายดำ ฉิ่งสุวรรณโรจน์. 2535. การผลิตผลไม้นอกฤดูกาลและการบำรุงรักษา.สมาคมนักโรคพืชแห่งประเทศไทย.128 หน้า.

นิรนาม. 2535.การผลิตผลไม้นอกฤดูกาลและการบำรุงรักษา.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.