



## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

# โครงการ “การขยายผลการใช้จุลินทรีย์ *Bacillus subtilis* สำหรับการควบคุมโรคไม้ผล”

I ควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคโคนและรากเน่า  
และกลุ่มราโรคผลเน่าของทุเรียน

โดย ผศ.ดร. วิจิตรา ลีละสุภกุล และคณะ

1 พฤศจิกายน 2543 ถึงวันที่ 31 ธันวาคม 2544

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

### โครงการ “การขยายผลการใช้จุลินทรีย์ *Bacillus subtilis* สำหรับการควบคุมโรคไม้ผล”

I ควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคโคนและรากเน่า  
และกลุ่มโรคผลเน่าของทุเรียน

#### คณะผู้วิจัย

- |                                 |                                                                             |
|---------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| 1. ผศ.ดร. วิจิตรา สีสะตุกุล     | ภาควิชาชีวเคมี                                                              |
| 2. รศ.ดร. เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร | ภาควิชาจุลชีววิทยา<br>คณะวิทยาศาสตร์                                        |
| 3. ผศ. เสมอใจ ชื่นจิตต์         | ภาควิชาการจัดการศัตรูพืช<br>คณะทรัพยากรธรรมชาติ<br>มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ |

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย  
ชุดโครงการไม้ผลและผลิตภัณฑ์จากผลไม้

## หน้าสรุปโครงการ

1. ชื่อโครงการ การขยายผลการใช้จุลินทรีย์ *B. subtilis* ในการควบคุมโรคไม้ผล
  - (I) ควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคโคนและรากเน่าและกลุ่มราโรคผลเน่าของทุเรียน
2. ชื่อหัวหน้าโครงการ ผศ.ดร. วิจิตรา ลีละสุกุล  
 ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์  
 มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ. สงขลา 90112  
 โทรศัพท์/โทรสาร 074 – 446420, 074-446656  
 e-mail : jwichitr@ratree.psu.ac.th
3. หลักการและเหตุผล  
 การผลิตผลไม้ตั้งแต่ระยะการปลูกตลอดจนหลังการเก็บเกี่ยว เกษตรกรของประเทศไทยยังนิยมใช้สารเคมีในการแก้ปัญหาเรื่องโรคโดยเฉพาะในทุเรียนซึ่งมีปัญหาหลักก็คือโรคโคนและรากเน่าจากเชื้อราสาเหตุหลักคือ *Phytophthora palmivora* (Butler) และในช่วงระยะหลังการเก็บเกี่ยวมีการรักษาผลทุเรียนให้ปลอดจากราก่อโรคผลเน่า คือ *Lasiodiplodia theobromae*, *Phomopsis* sp., และ *Collectotrichum gloeosporioides* สารเคมีที่ใช้มีหลากหลายชนิด ซึ่งทำให้เพิ่มต้นทุนการผลิต และมีผลเสียทั้งในด้านฤทธิ์ตกค้าง เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและมีโอกาสที่จะเกิดผลข้างเคียงต่อผู้บริโภคได้ และเป็นปัญหาหลักที่จะเกิดการกีดกันในการส่งทุเรียนออกไปยังตลาดต่างประเทศ ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาการควบคุมโรคโคนและรากเน่าในทุเรียนด้วยชีววิธี คือใช้เชื้อ *B. subtilis* ที่คัดแยกจากธรรมชาติซึ่งไม่มีผลอันตรายต่อมนุษย์และสัตว์ มาป้องกันโรคชนิดนี้ในสวนทุเรียน ขณะเดียวกันก็สามารถใช้สารออกฤทธิ์ที่ผลิตโดยเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้มาทดแทนสารเคมีที่ใช้ในการป้องกันโรคผลเน่าของทุเรียนเมื่อออกสู่ท้องตลาด ทำให้ผู้บริโภคมีความปลอดภัยจากสารเคมีอันตรายและไร้กังวล
4. วัตถุประสงค์
  - 4.1 คัดเลือกสายพันธุ์ *B. subtilis* ปฏิบัติต่อเชื้อราสาเหตุโรคโคนและรากเน่า และรากกลุ่มสาเหตุโรคผลเน่าบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ
  - 4.2 ทดสอบประสิทธิภาพทั้งจากตัวเชื้อและน้ำเลี้ยงเชื้อและสารสกัดหยาบของจุลินทรีย์ ปฏิบัติดังกล่าว ต่อราทั้ง 2 กลุ่มโรค บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ
  - 4.3 ทดสอบประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อของจุลินทรีย์ปฏิบัติต่อราโรคผลเน่าบนผลทุเรียนที่ติดเชื้อตามธรรมชาติและที่ปลูกเชื้อ เปรียบเทียบกับชุดควบคุม
5. ขอบเขตและวิธีการศึกษา
  - 5.1 แยกสายพันธุ์ *B. subtilis* จากจุลินทรีย์สายพันธุ์อื่นๆจากตัวอย่างดินที่เก็บได้จากสวนทุเรียนในภาคใต้ให้บริสุทธิ์

- 5.2 ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งของ *B. subtilis* สายพันธุ์ที่มีแนวโน้มประสิทธิภาพดี จำนวน 25 สายพันธุ์ต่อเชื้อราโรโคนและรากเน่า (*P.palmivora*) ที่แยกได้จากเปลือกต้นทุเรียนจากสวนภาคตะวันออก(จันทบุรี) จำนวน 1 สายพันธุ์ และจากภาคใต้(ชุมพร) จำนวน 2 สายพันธุ์บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ
- 5.3 ทดสอบการออกฤทธิ์ของตัวเชื้อ *B. subtilis* ทั้ง 25 สายพันธุ์ต่อเชื้อรา 3 ชนิดอย่างละ 2 สายพันธุ์ (*L. theobromae*, *Phomopsis sp.* และ *C.gloeosporioides*) ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคผลเน่าที่แยกได้จากผลทุเรียนบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ
- 5.4 คัดเลือกกลุ่ม *B.subtilis* ที่มีศักยภาพสูงสุดจำนวน 5 สายพันธุ์ในการยับยั้งราสาเหตุโรโคนและรากเน่า และกลุ่มราโรคผลเน่าในทุเรียนดังกล่าว โดยทดสอบน้ำเลี้ยงเชื้อ *B.subtilis* จำนวน 20 สายพันธุ์ บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ
- 5.5 สกัดสารออกฤทธิ์อย่างหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *B.subtilis* สายพันธุ์ที่คัดเลือกแล้วทั้ง 5 สายพันธุ์ ที่เพาะเลี้ยงนาน 3 วัน
- 5.6 ทดสอบปฏิกิริยาการยับยั้งการเจริญของเส้นใยราโดยน้ำเลี้ยงเชื้อและสารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* ทั้ง 5 สายพันธุ์
- 5.7 ทดสอบความรุนแรงของเชื้อ *L.theobromae* ที่ทำให้เกิดโรคผลเน่าบนเปลือกผลทุเรียน
- 5.8 ทดสอบการยับยั้งของสารออกฤทธิ์จาก *B.subtilis*สายพันธุ์ที่ดีที่สุด ต่อการเจริญของเชื้อราโรคผลเน่าบนผลทุเรียนซึ่งติดเชื้อ *L.theobromae* โดยวิธีปลูกเชื้อและผลทุเรียนที่ติดเชื้อรานี้ตามธรรมชาติ
6. ผลที่เกิดขึ้นจากโครงการ ผลที่เกิดขึ้นแบ่งออกเป็น 2 ระยะ ๆ ละ 7 เดือน  
ผลที่คาดว่าจะได้รับในช่วง 7 เดือนแรก
  - 6.1 เชื้อ *B.subtilis* จากตัวอย่างดินและจากโครงการ ABS/TRF จำนวนไม่ต่ำกว่า 100 สายพันธุ์ และเชื้อราโรโคนและรากเน่าจากเปลือกทุเรียนที่แยกได้จากสวนทุเรียน จ. จันทบุรี และ จ. ชุมพร จำนวนไม่ต่ำกว่า 3 สายพันธุ์
  - 6.2 เชื้อ *B.subtilis* จำนวนไม่ต่ำกว่า 25 สายพันธุ์ที่มีแนวโน้มประสิทธิภาพดีในด้านการยับยั้งเชื้อราโรโคนและรากเน่า, ราโรคผลเน่าทั้ง 3 ชนิด หลังจากทดสอบบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ
  - 6.3 ได้สายพันธุ์ *B.subtilis* ที่ประสิทธิภาพดีที่สุดคัดเลือกจากเชื้อจำนวน 20 สายพันธุ์ เมื่อทดสอบจากสารออกฤทธิ์ที่ผลิตและปล่อยออกมาในน้ำเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญของสายราโรคทุเรียนทั้ง 2 กลุ่ม เมื่อเจือจางความเข้มข้น 1:2 เป็นลำดับ
  - 6.4 ได้ *B.subtilis* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ปริมาณ 10 ลิตร จำนวน 1 สายพันธุ์  
ผลที่คาดว่าจะได้รับในช่วง 7 เดือนหลัง
    - 6.5 ได้ culture ของ *B.subtilis* 5 สายพันธุ์ซึ่งเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB อย่างละ 10 ลิตร

- 6.6 ได้สารออกฤทธิ์สกัดอย่างหยาบ ความเข้มข้นเป็น 50 mg/ml ได้ค่า  $EC_{50}$  ของสารสกัดจาก *B.subtilis* ทั้ง 5 สายพันธุ์ต่อเชื้อราทั้ง 2 กลุ่ม
- 6.7 ทราบค่าความรุนแรงของราโรคผลเน่า (*L.theobromae*; L.t.) ต่อผลทุเรียนจริงๆ
- 6.8 ทราบผลการยับยั้งราโรคผลเน่า (L.t.) ที่ความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์บนผลทุเรียนที่ปลูกเชื้อเปรียบเทียบกับเมื่อใช้สารเคมี และผลทุเรียนที่ไม่ควบคุมเชื้อ
- 6.9 ผลเปรียบเทียบประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อ *B.subtilis* ต่อการยับยั้งราโรคผลเน่าบนทุเรียนที่ปลูกเชื้อและที่ติดเชื้อโดยธรรมชาติเมื่อทุเรียนสุก และค่าวิเคราะห์ทางสถิติ
7. ระยะเวลา 14 เดือน
8. งบประมาณ
- |           |         |     |
|-----------|---------|-----|
| รวม       | 682,000 | บาท |
| ค่าตอบแทน | 175,000 | บาท |
| ค่าจ้าง   | 154,000 | บาท |
| ค่าวัสดุ  | 245,000 | บาท |
| ค่าใช้สอย | 108,000 | บาท |
9. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับหลังจากสิ้นสุดโครงการแล้ว
1. ได้สายพันธุ์ *B.subtilis* (BS) ที่มีแนวโน้มในการนำไปประยุกต์ใช้ควบคุมโรคเชื้อรา ในทุเรียนตั้งแต่ระยะการปลูกตลอดจนถึงการเก็บรักษาผลทุเรียนให้ปลอดเชื้อราในช่วงหลังการเก็บเกี่ยว จนกระทั่งออกสู่ตลาดเพื่อทดแทนการใช้สารเคมีฆ่ารา
  2. สามารถทำการวิจัยและพัฒนาต่อไปในเรื่องการผลิตผลิตภัณฑ์สูตรเชื้อ *B.subtilis* สายพันธุ์ที่มีศักยภาพดังกล่าว ในระดับที่จะนำไปสู่การผลิตภาคอุตสาหกรรม โดยมุ่งเน้นศึกษาเรื่องความคุ้มค่าของผู้ใช้ต่อราคาผลผลิตของผลิตภัณฑ์ที่นำไปใช้
  3. การประยุกต์ใช้สารออกฤทธิ์ของ *B.subtilis* ในการควบคุมโรคที่จะเป็นสาเหตุของการสูญเสียมูลค่าของกลุ่มผลไม้ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจในระยะหลังการเก็บเกี่ยว และส่งออกยังตลาดต่างประเทศ

## กิตติกรรมประกาศ

คณะวิจัยขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยที่ให้การสนับสนุนงบประมาณและอำนวยความสะดวกให้ศึกษาโครงการนี้โดยเริ่มต้นตั้งแต่หาข้อมูลเพื่อรับรู้ปัญหา เห็นสภาพที่เกิดขึ้นจริงจากสวนทุเรียนและหลังจากการเก็บเกี่ยวพบปะรวมทั้งนักวิชาการที่เกี่ยวข้องเกษตรกรชาวสวนและกลุ่มพ่อค้าคนกลางจึงทำให้กลุ่มผู้วิจัยสามารถตระหนักถึงแนวทางการพัฒนาวิจัยเพื่อให้เกิดประสิทธิผลที่เป็นประโยชน์แท้จริงแก่เกษตรกรซึ่งมีผลกระทบถึงเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทยด้วย

ผลงานวิจัยนี้จะไม่สามารถประสบความสำเร็จได้โดยถ้าไม่ได้รับการอนุเคราะห์และมิตรภาพอันดีจากบุคคลดังต่อไปนี้ รศ. ดร.พีรเดช ทองอำไพ ผู้อำนวยการฝ่ายเกษตร สกว. รศ.ดร. จริ่งแท้ ศิริพานิช ผู้จัดการเครือข่ายวิจัยและพัฒนาพืชสวน สกว. รศ.ดร.สมสรี แสงโชติ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรมหาวิทยาลัยเกษตร บางเขน ผู้อำนวยการ ดร. สุวัฒน์ จันทรปรณิก และคุณสุณี ศรีสิงห์ ศูนย์วิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร จันทบุรี

สุดท้ายนี้มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ คณะวิทยาศาสตร์และคณะทรัพยากรธรรมชาติได้สนับสนุนการทำวิจัยของคณะฯเป็นอย่างดีมาโดยตลอด

คณะผู้วิจัย

## บทคัดย่อ

การศึกษาเพื่อการขยายผลการใช้จุลินทรีย์ *B.subtilis* ในการควบคุมโรคที่สำคัญของทุเรียน คือโรคโคนและรากเน่าและโรคผลเน่า จำเป็นต้องทราบข้อมูลจากห้องปฏิบัติการแล้วจึงประยุกต์ สำหรับทดสอบในระดับแปลงทดลองเพื่อยืนยันผลที่ชัดเจน จึงเริ่มต้นจากเชื้อ *B.subtilis* ที่แยกจาก ดินให้บริสุทธิ์ จำนวน 23 สายพันธุ์แสดงปฏิกิริยาปฏิปักษ์ชัดเจนบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อต่อเชื้อรา *Phytophthora palmivora* ที่แยกได้จาก จ. ชุมพร (T1และ T2) จาก จ. จันทบุรี และเชื้อ *Lasiodiplodia theobromae*, *Phomopsis* sp., และ *Colletotrichum gloeosporioides* อย่างละ 2 สายพันธุ์ ประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อ *B.subtilis* ต่อการยับยั้งเชื้อราทั้งสองกลุ่มแตกต่างกัน โดย *P.palmivora* ด้านทาน ได้สูงกว่า *L.theobromae*, *Phomopsis* sp. และ *C.gloeosporioides* เมื่อพิจารณาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง สำหรับ *P.palmivora* ทั้ง 3 ไอโซเลต ต้องใช้น้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในระดับความเข้มข้นที่เจือจางไป 4 เท่า ในขณะที่ *L.theobromae*, *Phomopsis* sp. และ *C.gloeosporioides* ใช้ระดับที่เจือจางไปถึง 32-64 เท่า ค่า  $EC_{50}$  ของสารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *B.subtilis* แต่ละสายพันธุ์ (ABS-D01, ABS-D02, ABS-D03, ABS-D11 และ ABS-D12) มีค่าแตกต่างกันต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราทั้งสองกลุ่ม จำนวน 9 ไอโซเลตที่ทดสอบ ค่าเฉลี่ย  $EC_{50}$  ของ *B.subtilis* สายพันธุ์ ABS-D12 มีค่าต่ำที่สุดคือ 115.9  $\mu\text{g/ml}$  และ *B.subtilis* ทั้งห้าสายพันธุ์ดังกล่าวไม่แสดงปฏิกิริยาปฏิปักษ์ระหว่างกันบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อจึงใช้ผสมรวมสำหรับทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งโรคที่เกิดจากเชื้อราโรคผลเน่า โดยใช้ *L.theobromae* 2-03 ซึ่งก่อโรครุนแรงสูงเมื่อปลูกเชืบบนผลทุเรียนและที่เกิดตามธรรมชาติ ผลวิเคราะห์ทางสถิติเปรียบเทียบในแต่ละกรรมวิธีพบว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคเมื่อทำการปลูกเชื้อก่อนแล้วจึงจุ่มสารไม่แตกต่างจากชุดควบคุม ในขณะที่หากจุ่มสารแต่ละชนิดก่อนแล้วจึงปลูกเชื้อพบว่าแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญโดยสารซึ่งมีคุณสมบัติที่ดีที่สุดคือ imazalil 500 pm. รองลงมาคือสารผสมที่สกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อของ *B.subtilis* 5 สายพันธุ์ในอัตราส่วนเท่ากัน และเชื้อผสม *B.subtilis* 5 สายพันธุ์ ( $10^9$  cfu/ml) ซึ่งสอดคล้องกับผลระดับความรุนแรงของการเกิดโรค การเกิดโรคผลเน่าที่เกิดตามธรรมชาติพบว่ายับยั้งได้ระดับหนึ่ง โดยน้ำเลี้ยงเชื้อมีประสิทธิภาพสูงสุดสามารถลดการเกิดโรคได้ 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม รองลงมาคือสาร imazalil และสารสกัดซึ่งให้ผลไม่แตกต่างในทางสถิติกับชุดควบคุมซึ่งจุ่มแช่ในน้ำ โดยสรุปเชื้อ *B.subtilis* ทั้ง 5 สายพันธุ์และสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อมีศักยภาพที่ใช้ควบคุมโรคที่สำคัญของทุเรียนคือโรคโคนและรากเน่าและโรคผลเน่าได้

## Abstract

A study of the application of *B.subtilis* in the control of root rot and fruit rot diseases in Durian, using information obtained from laboratory tests and from experimental testing in the field, is reported. First *B.subtilis* was obtained from the field and screened on agar plates. Twenty-three strains of the *B.subtilis* showed strong antagonistic activity against two groups of fungi; the root rot disease caused by *Phytophthora palmivora* isolated from the field in Chumporn (T1 and T2), in Chantabury province, and the fruit rot diseases caused by *Lasiodiplodia theobromae*, *Phomopsis* sp. and *Colletotrichum gloeosporioides*. Significant differences in the efficiency of the culture filtrates of those strains of *B.subtilis* tested among the two groups of fungi were observed. *P.palmivora* was more resistant to *B.subtilis* than *L.theobromae*, *Phomopsis* sp. and *C.gloeosporioides*. Four-x dilutions of the culture filtrates were able to inhibit all three isolates of *P.palmivora*, and thirty-two to sixty-four-x for *L.theobromae*, *Phomopsis* sp. and *C.gloeosporioides*. Variations in  $EC_{50}$  of the crude extracts of each strain of *B.subtilis* (ABS-D01, ABS-D02, ABS-D03, ABS-D11 and ABS-D12) against nine isolates of those fungi were obtained. *B.subtilis* ABS-D12 showed the lowest  $EC_{50}$  of 115.9  $\mu\text{g/ml}$ . All five strains of *B.subtilis* were non-competitive to each other on the agar plates. Consequently, mixtures of the five cultures of *B.subtilis* were used cooperatively to control the diseases on the durian fruits. Inoculation of *L.theobromae* 2-03 appeared to be the most virulent among the fungal isolates causing a rot disease on the durian fruits. The efficiency of *B.subtilis* in controlling the disease of both artificially and naturally infected fruits was also tested. Dipping in various substances illustrated that the efficacy of the *B.subtilis* as a preventative was greater than as a curative. Significant differences of disease occurrence from the control set were demonstrated in the treatment with imazalil 500 ppm and mixtures of the extract from culture filtrates of *B.subtilis* and *B.subtilis* 5 strains ( $10^9$  cfu/ml). The incidence of the natural fungal infected disease treated with the culture filtrates was lowest at 50 %. Dipping in water and others showed no inhibition. In conclusion, *B.subtilis* and their filtrates were potent in controlling of the root rot and fruit rot diseases of durian.



## สารบัญ

|                                        | หน้า |
|----------------------------------------|------|
| หน้าสรุปโครงการ                        | i    |
| กิตติกรรมประกาศ                        | iv   |
| บทคัดย่อ                               | v    |
| Abstract                               | vi   |
| สารบัญ                                 | vii  |
| สารบัญเรื่อง                           | viii |
| รายการตาราง                            | ix   |
| รายการรูป                              | xi   |
| ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย | 1    |
| วัตถุประสงค์                           | 3    |
| วิธีการทดลอง                           | 4    |
| ผลการทดลองและวิจารณ์                   | 12   |
| สรุปผลการวิจัย                         | 35   |
| เอกสารอ้างอิง                          | 37   |
| ภาคผนวก                                | 39   |
| บทความสำหรับเผยแพร่                    | 41   |

## สารบัญเรื่อง

## หน้า

### วิธีการทดลอง

|                                                                                                                                                                                                           |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. การคัดแยกสายพันธุ์เชื้อราสาเหตุโรค และ การคัดแยกสายพันธุ์ <i>B.subtilis</i> ที่มีแนวโน้มดีจากตัวอย่างดินและที่ได้จากโครงการ ABS/TRF                                                                    | 4  |
| 2. ปฏิกริยาปฏิสัมพันธ์ของ <i>B. subtilis</i> ต่อเชื้อราโรคทุเรียนบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ                                                                                                                    | 5  |
| 3. การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียต่อการยับยั้งการเจริญของสายรา                                                                                                                             | 6  |
| 4. การทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่มีศักยภาพสูงต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา                                                                                                | 7  |
| 5. การทดสอบปฏิกริยาปฏิสัมพันธ์ระหว่างเชื้อแบคทีเรีย <i>B.subtilis</i> ทั้ง 5 สายพันธุ์                                                                                                                    | 9  |
| 6. การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเกิดโรคผลเน่าบนผลทุเรียนจากเชื้อรา <i>L.theobromae</i> (2-03) โดยเชื้อแบคทีเรีย <i>B.subtilis</i> และสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเปรียบเทียบกับสารเคมี (imazalil) | 9  |
| 7. ทดสอบประสิทธิภาพของสารในการยับยั้งการเกิดโรคผลเน่าจากเชื้อ <i>L.theobromae</i> (2-03) ที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ                                                                                           | 11 |

### ผลการทดลองและวิจารณ์

|                                                                                                                                                                                                            |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. ปฏิกริยาปฏิสัมพันธ์ของ <i>B.subtilis</i> ต่อเชื้อราโรคทุเรียนบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ                                                                                                                      | 12 |
| 2. ประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา                                                                                                                                   | 15 |
| 3. การทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่มีศักยภาพสูงต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา                                                                                                 | 29 |
| 4. การทดสอบปฏิกริยาปฏิสัมพันธ์ระหว่างเชื้อแบคทีเรีย <i>B.subtilis</i> ทั้ง 5 สายพันธุ์                                                                                                                     | 30 |
| 5. การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเกิดโรคผลเน่าบนผลทุเรียนจากเชื้อรา <i>L.theobromae</i> (2-03) โดยเชื้อแบคทีเรีย <i>B.subtilis</i> และสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย เปรียบเทียบกับสารเคมี (imazalil) | 31 |
| 6. ประสิทธิภาพของสารในการยับยั้งการเกิดโรคผลเน่าจากเชื้อรา <i>L.theobromae</i> ที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ                                                                                                      | 34 |

## รายการตาราง

| ตารางที่                                                                                                                                   | หน้า |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 1. ผลการยับยั้งราก่อโรคในทุเรียน โดย <i>B. subtilis</i> ด้วยวิธี<br>dual culture technique                                                 | 13   |
| 2. ผลของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียต่อการเจริญของเชื้อรา <i>P.palmivora</i> (จันทบุรี)                                                         | 16   |
| 3. ผลของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียต่อการเจริญของเชื้อรา <i>P.palmivora</i> (T1)                                                               | 17   |
| 4. ผลของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียต่อการเจริญของเชื้อรา <i>P.palmivora</i> (T2)                                                               | 18   |
| 5. ผลของน้ำเลี้ยงเชื้อ <i>B.subtilis</i> 5 สายพันธุ์ ที่ระดับความเข้มข้น 1:4<br>ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>P.palmivora</i>         | 19   |
| 6. ผลของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียต่อการเจริญของเชื้อรา <i>L.theobromae</i> (2-01)                                                            | 20   |
| 7. ผลของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียต่อการเจริญของเชื้อรา <i>L.theobromae</i> (2-03)                                                            | 21   |
| 8. ผลของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียต่อการเจริญของเชื้อรา <i>Phomopsis</i> sp.(1-01)                                                            | 22   |
| 9. ผลของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียต่อการเจริญของเชื้อรา <i>Phomopsis</i> sp.(1-02)                                                            | 23   |
| 10. ผลของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียต่อการเจริญของเชื้อรา <i>C.gloeosporioides</i> (3-03)                                                      | 24   |
| 11. ผลของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียต่อการเจริญของเชื้อรา <i>C.gloeosporioides</i> (3-05)                                                      | 25   |
| 12. ผลของน้ำเลี้ยงเชื้อ <i>B.subtilis</i> 5 สายพันธุ์ ที่ระดับความเข้มข้น 1:32<br>ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>L.theobromae</i>      | 26   |
| 13. ผลของน้ำเลี้ยงเชื้อ <i>B.subtilis</i> 5 สายพันธุ์ ที่ระดับความเข้มข้น 1:64<br>ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>Phomopsis</i> sp      | 27   |
| 14. ผลของน้ำเลี้ยงเชื้อ <i>B.subtilis</i> 5 สายพันธุ์ ที่ระดับความเข้มข้น 1:64<br>ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>C.gloeosporioides</i> | 28   |
| 15. ค่า $EC_{50}$ ของสารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียต่อการเจริญของสาขาร                                                              | 29   |
| 16. ผลการทดสอบปฏิกิริยาปฏิกิริยาระหว่างเชื้อแบคทีเรีย <i>B.subtilis</i> ทั้ง 5 สายพันธุ์                                                   | 30   |
| 17. ค่าเฉลี่ยของผลการผลเน่าจากการปลูกเชื้อ <i>L.theobromae</i> (2-03)<br>และจุ่มด้วยสารต่าง ๆ                                              | 32   |
| 18. ค่าวิเคราะห์เปรียบเทียบความรุนแรงของอาการผลเน่าจากการปลูกเชื้อ<br><i>L.theobromae</i> (2-03) และจุ่มด้วยสารต่าง ๆ                      | 33   |

## รายการตาราง (ต่อ)

| ตารางที่                                                                                                                               | หน้า |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 19. เปอร์เซ็นต์ของการเกิดโรคผลเน่าของทุเรียนจากการปลูกเชื้อ<br><i>L.theobromae</i> (2-03) และจุ่มด้วยสารต่าง ๆ                         | 33   |
| 20. ค่าวิเคราะห์เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ของการเกิดโรคผลเน่าของทุเรียน<br>จากการปลูกเชื้อ <i>L.theobromae</i> (2-03) และจุ่มด้วยสารต่าง ๆ | 33   |
| 21. ร้อยละของการเกิดโรคผลเน่าของทุเรียนจากเชื้อรา <i>L.theobromae</i><br>ตามธรรมชาติหลังจากจุ่มในสารต่าง ๆ                             | 34   |
| <br><b>ภาคผนวก</b>                                                                                                                     |      |
| 1. ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคโคนและรากเน่าบนผลทุเรียนใน<br>ชุดการทดลองกลุ่มต่างๆ                                                | 40   |
| <br><b>บทความสำหรับเผยแพร่</b>                                                                                                         |      |
| 1. การยับยั้งการเจริญของเชื้อราจากน้ำเลี้ยงเชื้อ <i>B.subtilis</i> ที่เจือจางความเข้มข้น                                               | 44   |
| 2. ค่า EC <sub>50</sub> ของสารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียต่อการเจริญของสาหร่าย                                                  | 45   |
| 3. ค่าเฉลี่ยของแผลผลเน่าของทุเรียนจากการปลูกเชื้อ <i>L. theobromae</i> (2-03)<br>และจุ่มสารต่าง ๆ                                      | 45   |
| 4. เปอร์เซ็นต์ของการเกิดโรคผลเน่าของทุเรียนจากการปลูกเชื้อ <i>L. theobromae</i> (2-03)<br>และจุ่มสารต่าง ๆ                             | 46   |

## รายการรูป

| รูปที่                                                                                                                                                                                                                   | หน้า |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 1. เปลือกต้นทุเรียนที่เกิดแผลจากเชื้อราก่อโรคโคนและรากเน่า ( <i>P.palmivora</i> )                                                                                                                                        | 4    |
| 2. การทดสอบฤทธิ์การต้านราของของสารบนสไลด์หลุมซึ่งประกอบด้วย<br>จานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 14 cm. กระดาษกรองและ<br>สไลด์หลุมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 cm. วางเชื้อราขนาด 1.0 mm.<br>ตรงกลางหลุมบนอาหารทดสอบ | 8    |
| 3. การยับยั้งของ <i>B. subtilis</i> ต่อการเจริญของเส้นใยราที่เป็นสาเหตุของ<br>โรคทุเรียน (A= <i>P.palmivora</i> , B= <i>L.theobromae</i> , C= <i>Phomopsis</i> sp.,<br>D= <i>C.gloeosporioides</i> )                     | 14   |
| 4. แผนภูมิเปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา<br><i>P.palmivora</i> (จันทบุรี, T1 และ T2) ของน้ำเลี้ยงเชื้อ <i>B.subtilis</i><br>5 สายพันธุ์ (ABS-D01, D02, D03, D11, และ D12) ที่เจือจาง 4 เท่า          | 19   |
| 5. แผนภูมิเปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา<br><i>L.theobromae</i> (2-01, 2-03) ของน้ำเลี้ยงเชื้อ <i>B.subtilis</i> 5 สายพันธุ์<br>(ABS-D01, D02, D03, D11, และ D12) ที่เจือจาง 32 เท่า                 | 26   |
| 6. แผนภูมิเปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา<br><i>Phomopsis</i> sp. (1-01, 1-02) ของน้ำเลี้ยงเชื้อ <i>B.subtilis</i> 5 สายพันธุ์<br>(ABS-D01, D02, D03, D11, และ D12) ที่เจือจาง 64 เท่า                | 27   |
| 7. แผนภูมิเปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา<br><i>C.gloeosporioides</i> (3-03, 3-05) ของน้ำเลี้ยงเชื้อ <i>B.subtilis</i> 5 สายพันธุ์<br>(ABS-D01, D02, D03, D11, และ D12) ที่เจือจาง 64 เท่า            | 28   |

## ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ประชากรโลกในปัจจุบันนี้ได้คำนึงถึงความปลอดภัยจากการใช้สารเคมีในชีวิตประจำวันเป็นอย่างสูง ผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ความเป็นอยู่และสุขอนามัยของทั้งผู้ผลิตและผู้ใช้การผลิตผลไม้ในประเทศไทยได้มีการใช้สารเคมีในการจัดการศัตรูพืชโดยเฉพาะด้านโรคที่มีสาเหตุจากเชื้อราเป็นจำนวนมากมาอย่างช้านานและแพร่หลาย ซึ่งเป็นการเพิ่มต้นทุนการผลิตและปัญหาที่ตามมาคือ การเกิดผลข้างเคียง เช่น การดื้อยา หรือการปนเปื้อนที่ก่อให้เกิดมลภาวะในสิ่งแวดล้อม และการตกค้างของสารเคมีในผลิตผลที่ออกไปสู่ผู้บริโภคทั้งในและต่างประเทศ โดยเฉพาะผู้บริโภคในต่างประเทศมีความตื่นตัวในการบริโภคผลิตภัณฑ์ที่ปลอดภัยจากสารพิษ ดังนั้นในหลายประเทศที่เป็นผู้บริโภคจึงได้มีมาตรการกำหนดมาตรฐานการปนเปื้อนของสารเคมีในผลิตภัณฑ์ที่นำเข้า โดยเฉพาะผลไม้จากประเทศผู้ผลิต ดังนั้นผู้ผลิตซึ่งเป็นเกษตรกรและผู้ส่งออก จึงต้องมีการพัฒนาการจัดการศัตรูพืช โดยลดการใช้สารเคมีให้มากที่สุด และหันมา สนใจการใช้วิธีการควบคุมโรคทางชีวภาพ โดยใช้สารที่ได้จากธรรมชาติ เช่น สมุนไพร หรือ วิธีการที่ศึกษากันอย่างแพร่หลาย คือ การใช้จุลินทรีย์ที่ไม่ก่อโรค (Van Driesche, and Bellows, 1996 ; สมคิด ดิสถาพร, 2540)มาทำการวิจัยและพัฒนาการประยุกต์ใช้ตั้งแต่กระบวนการผลิตและการส่งออกต่างประเทศ

จุลินทรีย์ *B.subtilis* เป็นสารควบคุมชีวภาพชนิดหนึ่งที่ได้มีผู้นำมาศึกษาเพื่อใช้ในการทดแทนสารเคมีป้องกันและกำจัดโรค ในโครงการ “ การพัฒนา Antagonist *B.subtilis* สำหรับการควบคุมโรคข้าว ” ได้รวบรวมจุลินทรีย์ *B.subtilis* หลายสายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการควบคุมโรคสาเหตุจากทั้งเชื้อราและแบคทีเรียของพืช ผู้วิจัยจึงมีจุดมุ่งหมายในการนำจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่เก็บรวบรวมไว้ และสายพันธุ์ที่ค้นหาเพิ่มเติมมาขยายผล เพื่อใช้ประโยชน์ในการควบคุมโรคจากสาเหตุเชื้อราของพืชเศรษฐกิจ โดยเฉพาะทุเรียน ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มผลไม้ 5 ชนิดที่ทำรายได้สูงสุดของประเทศในปัจจุบันนี้

การจัดการโรคเชื้อราในทุเรียนเป็นปัญหาใหญ่ตั้งแต่การปลูกจนกระทั่งการส่งผลผลิตออกสู่ตลาด โรคสำคัญที่พบได้มากที่สุดในการทำสวนทุเรียนคือ โรคโคนและรากเน่า อันเกิดจากเชื้อรา *Phytophthora palmivora* (Butler) มีผลทำให้ต้นแสดงอาการเหี่ยวระดับต้นชัดเจนคือ ใบเหี่ยวเหลืองทั้งต้น และร่วงไปหมด ในกรณีที่เกิดโรครุนแรงจะเกิดอาการเน่าที่ราก และลูกกลมที่เปลือกบริเวณโคนต้นทำให้ทุเรียนตาย *P.palmivora* สามารถสร้างสปอร์หลายชนิดทั้งผนังบางและหนา (Erwin and Ribeiro, 1996) ซึ่งอาศัยอยู่ในดินเป็นเวลานานๆ เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสม โดยเฉพาะในฤดูฝนหรือขณะที่มีความชุ่มชื้นสูง ซึ่งภูมิอากาศดังกล่าวนั้นก็เหมาะปลูกทุเรียนได้ดีอยู่แล้วจึงเป็นสภาพที่พร้อมที่จะให้เชื้อรางอกเข้าทำลายตามบริเวณโคนลำต้น กิ่ง ราก โดยสปอร์สามารถแพร่ระบาดไปกับน้ำและงอกเข้าทำลายต้นอื่นให้เกิดได้อีก นอกจากนี้ในบางครั้งลมและแมลงเป็นพาหะนำเชื้อโรคได้อีกเหมือนกันด้วย การป้องกันและกำจัดสามารถทำได้โดยการใช้สารเคมีฉีดพ่นเพื่อป้องกันและกำจัดเชื้อราซึ่งให้ผลดีในเร็วเริ่มแรก คือ metalaxyl หรือ phosphethylaluminum

โดยผสมหรือสลับกับสาร mancocep ให้ทั่วทั้งต้นถึงใบและผล ซึ่งสามารถควบคุมโรคในทุเรียนได้ระยะหนึ่ง (เอียน ศิลาชัย, 2536) แต่เมื่อใช้ซ้ำหลายครั้ง ก็พบว่าไม่สามารถควบคุมโรคได้อีกต่อไป (ข้อมูลจากทั้งเกษตรกรและกรมวิชาการเกษตร) ในระยะหลังมีผู้สนใจและนำชีววิธีมาใช้ในการควบคุมโรคดังกล่าวของทุเรียน เช่น ใช้เชื้อรา *Trichoderma* spp. แพร่พันธุ์ขยายเข้าทำลายเชื้อราสาเหตุของโรคก็เป็นการช่วยลดปริมาณเชื้อโรค (inoculum) ได้อย่างมาก แต่อย่างไรก็ตามเชื้อราควบคุมโรคดังกล่าวมีข้อจำกัดในการใช้คืออายุของเชื้อราที่มีประสิทธิภาพในระยะเพียง 6 เดือน จำเป็นต้องใช้บ่อยขึ้น และสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มจำนวนของเชื้อรา *Trichoderma* spp. และสภาวะของการแพร่ของเชื้อราสาเหตุโรคโคนและรากเน่าของทุเรียนเกิดขึ้นในช่วงที่ต่างกัน ทำให้ผลการควบคุมไม่สอดคล้องกัน จึงเห็นผลไม่ดีเท่าที่ควรและรูปแบบของการใช้ก็จำกัดเพราะกำจัดเชื้อราที่อยู่ในบริเวณรากและดินเท่านั้น ไม่สามารถครอบคลุมถึงบริเวณที่เกิดโรคตรงส่วนอื่นๆของต้นได้ ขณะเดียวกันปัญหาโรคผลเน่าของทุเรียนที่พบอยู่เสมอ คือ โรคที่เกิดจากเชื้อราจำพวก *L. theobromae*, *Phomopsis* sp. และ *C.gloeosporioides* ก่อให้เกิดการสูญเสียของผลทุเรียนเป็นอย่างมากถึง 40, 40 และ 8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เชื้อสาเหตุเหล่านี้จะเข้าทำลายผลทุเรียนตั้งแต่วัยที่อยู่ในสวนและหลังจากเก็บเกี่ยวมาแล้ว เชื้อรา *L.theobromae* และ *Phomopsis* sp. สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้บนผลทุเรียนที่ถูกตัดแต่งและหล่นอยู่บนพื้นดิน สำหรับ *C.gloeosporioides* เป็นเชื้อที่พบได้จากใบทุเรียนและดิน ซึ่งจะก่อให้เกิดโรคกับผลทุเรียนที่อยู่ในระดับต่ำ การกำจัดโรคสามารถทำได้โดยการจุ่มผลทุเรียนในสารเคมี เช่น imazalil เป็นต้น อย่างไรก็ตามการกำจัดแหล่งของเชื้อที่ติดอยู่บนผลทุเรียนที่ร่วงหล่นและเน่าอยู่ตามบริเวณโคนต้นทำได้ยากซึ่งโดยปกติชาวสวนมักจะปล่อยให้ทิ้งไว้ให้ผลทุเรียนที่ใช้ไม่ได้ย่อยสลายไปตามธรรมชาติ จึงทำให้เกิดเป็นแหล่งกำเนิดเชื้อในรอบต่อไป (สมศิริแสงโชติ, 2539 ; Pongpisutta and Sangchote, 1994)

การแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นนี้โดยการใช้สารเคมี จะมีผลต่อการกีดกันทางการค้าในแง่มาตรฐานของสารเคมีตกค้างในผลิตภัณฑ์โดยประเทศผู้ส่งออกซึ่งจะเกิดอันตรายต่อผู้บริโภค ดังนั้นในงานส่วนนี้คณะวิจัยจึงได้สนใจที่จะประยุกต์การใช้สารออกฤทธิ์ควบคุมเชื้อรา ซึ่งผลิตโดยจุลินทรีย์ *B.subtilis* มาใช้ผสมเป็นสารเคลือบผิวของเปลือกทุเรียนดังกล่าว ทั้งนี้โดยความรู้พื้นฐานที่ทราบกันแพร่หลายว่า *B.subtilis* สามารถสร้างสารหลายชนิดในการกำจัดหรือควบคุมการเจริญของเชื้อราและแบคทีเรีย (Sandrin *et.al.*, 1990, Sinclair, 1989) โดยเฉพาะข้อมูลที่ได้จากโครงการ “ การพัฒนา Antagonist *B.subtilis* สำหรับการควบคุมโรคข้าว ” (Jutidamrongphan, *et.al.*, 1994, 1996, วิจิตรา จุติดำรงพันธ์ และคณะ, 2542) พบว่ากลุ่มสารออกฤทธิ์ดังกล่าว คือ สารจำพวก Iturin A, Surfactin และ piplastatin A ซึ่งสามารถสกัดได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ *B.subtilis* โดยวิธีการที่ไม่ยุ่งยากและให้ผลการออกฤทธิ์ที่มีประสิทธิภาพสูง เนื่องจากเชื้อ *B.subtilis* เป็นเชื้อที่พบได้ตามดินไม่ก่อให้เกิดโรคหรือทำอันตรายต่อคนและสิ่งแวดล้อมและสามารถสร้างสารปฏิชีวนะจำนวนมาก

สำหรับการยับยั้งการเจริญของเชื้ออื่นๆ ได้เป็นอย่างดี อีกทั้งเชื้อ *B.subtilis* สามารถเพาะเลี้ยงขยายจำนวนได้ง่ายและทนทานอยู่ในรูปเอนโดสปอร์เมื่อสิ่งแวดล้อมไม่เหมาะสม เพื่อการพัฒนาไปถึงเป้าหมายของการใช้เป็นสารชีวอินทรีย์ควบคุมโรค จึงจำเป็นต้องศึกษาตั้งแต่ระดับเบื้องต้นของการควบคุมหรือยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรค กลไกการออกฤทธิ์ ตลอดจนการหาสูตรเหมาะสมสำหรับการใช้และการทดสอบประสิทธิภาพ ทั้งในสภาพห้องปฏิบัติการและสภาพที่ใกล้เคียงกับธรรมชาติที่สุด

### วัตถุประสงค์

- 1) หาสายพันธุ์ *B.subtilis* ที่เป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโคนและรากเน่า และกลุ่มเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าในทุเรียน ในระดับห้องปฏิบัติการ
- 2) หาข้อมูลการออกฤทธิ์และประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *B.subtilis* ต่อเชื้อราสาเหตุโคนและรากเน่าและกลุ่มเชื้อราสาเหตุผลเน่าของทุเรียนในระดับห้องปฏิบัติการ
- 3) ทดสอบฤทธิ์ของน้ำเลี้ยงเชื้อต่อการยับยั้งเชื้อราสาเหตุสำคัญของโรคผลเน่ากับผลทุเรียน



## วิธีการทดลอง

### I การคัดแยกสายพันธุ์เชื้อราสาเหตุโรค และ การคัดแยกสายพันธุ์ *B.subtilis* ที่มีแนวโน้มดี จากตัวอย่างดินและที่ได้จากโครงการ ABS/TRF

#### 1. การคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อราสาเหตุโรค

##### 1.1 เชื้อรา *P.palmivora* โรคโคนและรากเน่า ได้จาก 2 แหล่ง คือ

1.1.1 สอนทุเรียน จ. ชุมพร ทำการเก็บเปลือกลำต้นทุเรียนบริเวณแผลที่เกิดโรคโคนและรากเน่า เหนือจากบริเวณพื้นดินขึ้นไปประมาณ 50 เซนติเมตร เก็บตัวอย่างขนาด 1 ตารางนิ้ว นำตัวอย่างเปลือกทุเรียนจากทุเรียน (รูปที่ 1 ) ต้นที่ 1 และต้นที่ 2 มาลอกเปลือกและตัดเป็นชิ้นเล็กๆนำไปวางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Modified Carrot Agar (MCA) ป้อนในตู้บ่มเชื้อราอุณหภูมิ 20 °C ทิ้งไว้จนกระทั่งเห็นเส้นใยเชื้อราเจริญบนอาหาร แล้วจึงถ่ายเชื้อราลงบนจานอาหาร MCA จานใหม่ จนได้เชื้อราที่บริสุทธิ์ ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเส้นใยและรูปร่างของ sporangium ว่าเป็นชนิดของเชื้อรา *P.palmivora* ที่ถูกต้อง คัดเลือกได้ 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ชุมพร-01 (T1) และชุมพร-02 (T2)

1.1.2 สอนทุเรียน จ. จันทบุรี ได้รับความอนุเคราะห์จากคุณสุนี ศรีสิงห์ ศูนย์วิจัยพืชสวนกรมวิชาการเกษตร อ. ชลบุรี จ. จันทบุรี

##### 1.2 เชื้อราสาเหตุโรคผลเน่า (*L.theobromae*, *Phomopsis* sp. และ *C.gloeosporioides*)

ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร. สมศิริ แสงโชติ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร ม.เกษตรศาสตร์ บางเขน



รูปที่ 1 เปลือกต้นทุเรียนที่เกิดแผลจากเชื้อราก่อโรคโคนและรากเน่า (*P.palmivora*)

## 2.การคัดแยกสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรีย *B subtilis*

### 2.1 การคัดเลือกตัวอย่างดิน

ทำการเก็บตัวอย่างดินในสวนเกษตรจำพวกผลไม้ เช่น ทุเรียน มังคุดและส้ม เป็นต้น ในบริเวณจังหวัดทางภาคใต้ โดยสุ่มเก็บจากบริเวณต้นที่เป็นโรคต่อต้นปกติในอัตราส่วน 1:4 เก็บดินบริเวณผิวน้ำดิน ห่างจากโคนต้น 1 เมตร จำนวนตัวอย่างละ 250 กรัม

### 2.2 การแยกเชื้อแบคทีเรียให้บริสุทธิ์

ใช้วิธี dilution plate count บนอาหาร Nutrient agar โดยทำการเจือจางตัวอย่างดินด้วยสารละลาย 0.85% NaCl นำไปแช่ในอ่างน้ำอุ่นอุณหภูมิ 80 °C นาน 30 นาที เพื่อกำจัดเชื้ออื่นทั่วไปในดิน แล้วจึงนำมาเจือจางและแยกบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่ 37 °C นาน 24 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีโดยการย้อมติดสีแกรมบวก ย้ายเชื้อไปเลี้ยงแยกให้เป็นโคโลนีเดี่ยวจำนวน 120 โคโลนี ทำการจำแนกชนิดของเชื้อ *B.subtilis* ตามปฏิกิริยาชีวเคมีในหลอดทดลองและนำไปทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคต่อไป

## II ปฏิบัติการปฏิบัติของ *B. subtilis* ต่อเชื้อราโรคทุเรียนบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

### 1. เชื้อราที่นำมาทดสอบ มี 4 ชนิด รวม 9 ไอโซเลต ดังนี้

1. *P.palmivora* จำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ จันทบุรี, T1 และ T2
2. *L.theobromae* 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *L.theobromae* 2-01 และ *L.theobromae* (2-03)
3. *Phomopsis* sp. 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Phomopsis* sp (1-01) และ *Phomopsis* sp. (1-02)
4. *C.gloeosporioides* 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *C.gloeosporioides*(3-03) และ *C.gloeosporioides*(3-05)

### 2. เชื้อแบคทีเรีย

*B.subtilis* จำนวน 140 สายพันธุ์ เป็นสายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากดินจำนวน 120 สายพันธุ์ และจำนวน 20 สายพันธุ์เป็น *B.subtilis* ที่มีประสิทธิภาพสูงสำหรับยับยั้งราโรคข้าวจากโครงการ “การพัฒนา Antagonist *Bacillus subtilis* สำหรับการควบคุมโรคข้าว” ซึ่งสนับสนุนโดย สกว. ปี 2538-2543

#### วิธีการทดสอบ

ทำการทดสอบโดยวิธี dual culture technique (Tuite, 1969) โดยเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Phomopsis* และ *C.gloeosporioides* บนอาหาร PDA (จานเพาะเลี้ยงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 ซม.) เป็นเวลา 1 วัน ส่วนเชื้อราโรคโคนและรากเน่า คือ *P.palmivora* เพาะเลี้ยงบนอาหาร MCA เป็นเวลา 1 วันก่อนเช่นกัน แล้วใช้ห้วงถ่ายเชื้อแต่ละแบคทีเรียที่จะทดสอบที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาแต่ละเป็นจุด หรือขีดเป็นแนวยาว ให้ห่างจากขอบโคโลนี

เชื้อรา 1 ซม. สำหรับเชื้อราโรคผลเน่าคือ *L.theobromae* ต้องเพาะเลี้ยงเชื้อราและแบคทีเรียในวันเดียวกัน ทำการทดสอบชุดละ 2 ซ้ำ นำจานเพาะเชื้อไปบ่มเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 วัน สังเกตผลทุกวัน โดยวัดรัศมีของราด้านที่อยู่ใกล้กับแบคทีเรีย เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้เพาะแบคทีเรีย ถ้าแบคทีเรียสามารถยับยั้งเชื้อราได้ จะพบ inhibition zone หรือบริเวณเชื้อราเจริญมาชนแนวแบคทีเรีย แต่ไม่สามารถเจริญข้ามแบคทีเรียไปได้

### III การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียต่อการยับยั้งการเจริญของสาหร่าย

#### 1. การเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *B.subtilis*

เพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *B.subtilis* 23 สายพันธุ์ที่แสดงศักยภาพการยับยั้งราก่อโรคโคนและรากเน่าที่คัดเลือกจากจำนวน 140 สายพันธุ์ในอาหารเหลว Luria-Bertani broth (LB) จำนวน 100 มล. (10% inoculum) บนเครื่องเขย่า 200 rpm ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 3 วัน บั่นแยกเซลล์แบคทีเรียที่ 8,000 rpm 20 นาที แยกน้ำเลี้ยงเชื้อไว้

#### . อาหารเลี้ยงเชื้อ

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria Bertani (LB) (ต่อ 1 ลิตร)

10 g. Sodium Chloride

5 g. Bacto-yeast extract

10 g. Bacto-tryptone

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria Bertani (LA) (ต่อ 1 ลิตร)

10 g. Sodium Chloride

5 g. Bacto-yeast extract

10 g. Bacto-tryptone

15 g Bacto- agar

#### 2. การทดสอบการยับยั้งการเจริญของสาหร่าย

นำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้มาเจือจางแบบลำดับสอง (serial 2-fold dilution) ได้เป็นน้ำเลี้ยงเชื้อไม่เจือจาง และน้ำเลี้ยงเชื้อเจือจาง 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 และ 1:32 แล้วผสมกับอาหารวุ้นอาหาร PDA (double strength) ยกเว้นการทดสอบกับเชื้อรา *P.palmivora* ใช้อาหารวุ้น MCA โดยผสมในอัตราส่วน 1:2 ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 และ 1:64 ตามลำดับนำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที และเทในจานไร้เชื้อ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 cm ปล่อยให้เย็น จากนั้นนำก้อนเชื้อราที่เจาะจากบริเวณขอบโคโลนี (1 วันสำหรับ *L. theobromae*, 2 วันสำหรับ *P. palmivora* และ *Phomopsis*

sp. และ 3 วันสำหรับ *C. gloeosporioides*) ได้ก้อนเชื้อราขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 mm. มาเพาะเลี้ยงบนกึ่งกลางวุ้นอาหารนี้ (ความเข้มข้นละ 3 ขั้ว) สำหรับชุดควบคุมใช้อาหารเหลว LB ที่ไม่ได้เพาะเลี้ยงแบคทีเรียแทนน้ำเลี้ยงเชื้อ นำจานทั้งหมดบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 25 °C จนกว่าเชื้อในชุดควบคุมจะเจริญจนเกือบเต็มจาน วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีราชุดทดสอบและชุดควบคุม โดยวัด 2 แนวตั้งฉากกัน นำค่าเฉลี่ยมาคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง

### 3. การคำนวณ

ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งคำนวณจากสูตร (Gamliel *et.al.*, 1989)

$$\text{ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง} = 100 - \frac{(R^2 \times 100)}{r^2}$$

R และ r เป็นค่าเฉลี่ยของรัศมีโคโลนีชุดทดสอบและชุดควบคุมตามลำดับ

## IV การทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่มีศักยภาพสูงต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา

### 1. การเตรียมสารสกัดหยาบ

นำน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่แสดงประสิทธิภาพดีที่สุดในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยราจำนวน 5 สายพันธุ์ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหาร LB ชนิดละ 10 ลิตร ตามวิธีในข้อ III (1) มาทำการสกัดตามวิธีของ McKeen *et.al.* (1986) นำสารสกัดหยาบมาละลายใน 80 % ethanol ให้ได้ความเข้มข้น 50 mg/ml ทำการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบต่อการยับยั้งการเจริญของสายราบนสไลด์หลุมตามวิธีของ Picman *et.al.*, (1990)

### 2. การทดสอบการยับยั้งการเจริญของสายรา

นำสารสกัดหยาบมาผสมกับ PDA ในอัตราส่วน 1:10 (สำหรับการทดสอบกับเชื้อ *P. palmivora* ใช้อาหาร MCA) ให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ 7-8 ความเข้มข้น และทำการทดสอบเช่นเดียวกับข้อ 2 แต่ทำในสไลด์หลุมโดยใช้ micro haematocrit capillary tubes เจาะเชื้อราได้ก้อนเชื้อราขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 mm (รูปที่ 2) ปริมาตรหลุมละ 100 µl ความเข้มข้นละ 8 ขั้ว แทนการทดสอบในจานเพาะเชื้อ สำหรับชุดควบคุมใช้ 80% ethanol ที่ไม่มีสารสกัด วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีราชุดทดสอบและชุดควบคุมในแต่ละหลุม ด้วย micrometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereozoom หลังจากวางเชื้อรา 16-24 ชั่วโมง ยกเว้น *L. theobromae* ใช้เวลา 6 ชั่วโมง นำค่าความเข้มข้นของสารสกัดหยาบและค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งไปเขียนกราฟ

### 3. การคำนวณ

หาค่า EC<sub>50</sub> จากสมการ regression จากเส้นกราฟการตอบสนอง (dosage response curve หรือ toxicity curve) เพื่อหาค่า Effective concentration 50 (EC<sub>50</sub>) หรือค่าความเข้มข้นของ

สารที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ 50% โดยการคำนวณจากกราฟ กราฟที่ได้จะถูกดัดแปลงให้เป็นกราฟเส้นตรง โดยค่าความชันของกราฟจะขึ้นอยู่กับค่า  $R^2$  ที่เหมาะสมซึ่งควรมีค่าอยู่ในช่วง 0.8-1.0 และจากกราฟที่ได้นี้สามารถคำนวณหาค่า  $EC_{50}$  ของสารได้จากสมการ linear regression

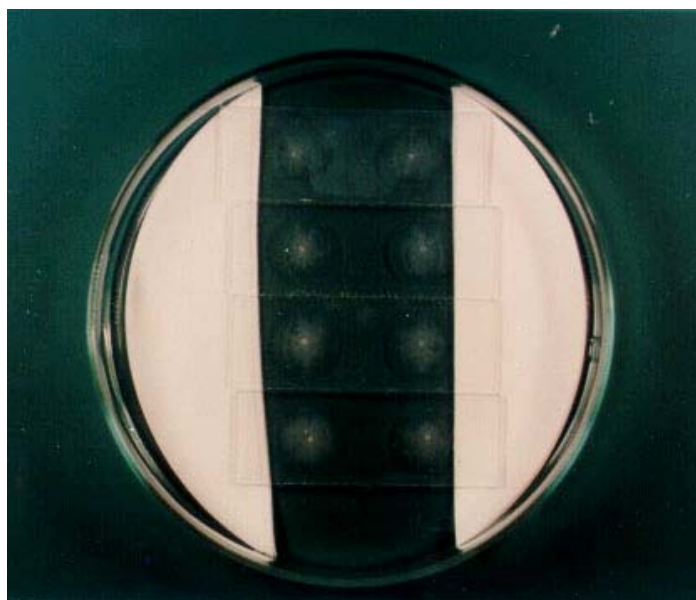
$$y = ax + b$$

โดย  $y$  = เปอร์เซ็นต์ของการยับยั้งเชื้อรา มีค่าเท่ากับ 50

$a$  = ค่าความชันของกราฟ

$b$  = จุดตัดบนแกน  $y$

$x$  = ค่าความเข้มข้นของสาร



รูปที่ 2 การทดสอบฤทธิ์การต้านราของของสารบนสไลด์หลุม ซึ่งประกอบด้วยจานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 14 cm. กระดาษกรองและสไลด์หลุมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 cm. วางเชื้อราขนาด 1.0 mm. ตรงกลางหลุมบนอาหารทดสอบ

V การทดสอบปฏิกิริยาปฏิสัมพันธ์ระหว่างเชื้อแบคทีเรีย *B.subtilis* ทั้ง 5 สายพันธุ์

เลี้ยงเชื้อ *B.subtilis* ทั้ง 5 สายพันธุ์ในอาหารเหลว LB ปริมาตร 2 ml เขย่าที่ 200 rpm อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชม แล้วนำเชื้อ *B.subtilis* แต่ละสายพันธุ์ มาเจือจางด้วยสารละลาย 0.85% NaCl ประมาณ 10 เท่า 0.1 ml แล้วเกลี่ย (spread) บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ LA จานละ สายพันธุ์จากนั้นนำใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 ซม. เจาะหลุมบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่เกลี่ยเชื้อ *B.subtilis* แต่ละสายพันธุ์ไว้แล้ว โดยเจาะจานละ 4 หลุมให้ห่างกันพอสมควร นำเชื้อ *B.subtilis* ที่เลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่เหลือมาใส่ในหลุมที่เจาะไว้หลุมละ 10 µl โดยเชื้อ *B.subtilis* ที่นำมาหยอดหลุมเป็นสายพันธุ์ต่างจากที่เกลี่ย ทำ 2 ซ้ำแล้วนำไปบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 24 ชม. ดูการเกิดวงใสรอบหลุมที่ใส่เชื้อ *B.subtilis*

VI การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเกิดโรคผลเน่าบนผลทุเรียนจากเชื้อรา *L.theobromae* (2-03) โดยเชื้อแบคทีเรีย *B.subtilis* และสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเปรียบเทียบกับ สารเคมี (imazalil)

1. เตรียมเชื้อแบคทีเรียและสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *B.subtilis*

1.1 สารสกัดชุดที่ 1 (สารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อ *B.subtilis* 5 สายพันธุ์)

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *B.subtilis* สายพันธุ์ที่ให้ผลการยับยั้งเชื้อราก่อโรคผลเน่าทุเรียนได้ดี จากการทดลองบนอาหารวุ้น ได้แก่เชื้อ ABS-D01, ABS-D02, ABS-D03, ABS-D11 และ ABS-D12 โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ในอาหารเหลว (3% molasses + 0.5% NaCl + 0.1% trace element ( $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) ปรับ pH เป็น 7.5 ด้วย 5N NaOH ปริมาตรเชื้อละ 10 ลิตร ในสภาวะเขย่าด้วยความเร็ว 200 rpm อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 3 วัน แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วต่ำแยกเซลล์และน้ำเลี้ยงเชื้อ

1.2 นำส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อมาตกตะกอนด้วยการเติม 5 N HCl ให้มีค่า pH อยู่ในช่วง 2.0-2.5 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้สารตกตะกอนนอนก้นจนหมด เทส่วนใสทิ้งไปเหลือส่วนที่เป็น ตะกอนนำมาละลายกลับโดยปรับ pH ด้วย 5 N NaOH ให้มีค่า pH ประมาณ 7.0 นำสาร จากน้ำเลี้ยงที่ได้ของเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิด (ชนิดละประมาณ 1 ลิตร) มาผสมรวมกันได้ สารผสมของสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ปริมาตร 5 ลิตร ผสมสารจับใบลง ไปก่อนนำไปใช้

1.3 สารชุดที่ 2 (เซลล์ของ *B.subtilis* 5 สายพันธุ์)

ส่วนของเซลล์แบคทีเรีย *B.subtilis* แต่ละสายพันธุ์ (ABS-D01, ABS-D02, ABS-D03, ABS-D11 และ BAS-D12) ที่ได้จากข้อ 1.1 นำมาใส่รวมกับเชื้อแบคทีเรีย ABS-D11 ที่ เลี้ยงในอาหารเหลวข้อ 1.1 ปริมาตร 5 ลิตร โดยคำนวณเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดที่ใส่

เมื่อผสมแล้วความเข้มข้นของเชื้อแต่ละชนิดประมาณ  $5.0 \times 10^8$  cfu/ml ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น  $10^9$  cfu/ml แล้วผสมสารจับใบก่อนใช้

2. เตรียมสารละลาย imazalil ความเข้มข้น 500 ppm. จำนวน 5 ลิตร
3. ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราก่อโรคผลเน่าทุเรียน (*L.theobromae*2-03) บนผลทุเรียน

### 3.1 การเตรียมผล

คัดเลือกผลทุเรียนหมอนทองน้ำหนักเฉลี่ยผลละ 1.5-2 กิโลกรัม จากสวนเกษตรกร อ. เมือง จ.ชุมพร ซึ่งไม่มีการใช้สารเคมีกำจัดโรคพืชหรือแมลง แต่ละผลมีความสุกประมาณ 70% จำนวน 120 ผล วางแผนการทดลองแบบ CRD 8 กรรมวิธี ๆ ละ 15 ผล

### 3.2 การดำเนินงานทดลอง แบ่งการทดลองเป็น 2 กลุ่ม

กลุ่มที่ 1 ทำการปลูกเชื้อราให้ติดผลก่อนเป็นเวลา 9 ชั่วโมง แล้วจึงจุ่มสารคือชุดการทดลองที่ 1, 3, 5 และ 7

กลุ่มที่ 2 ทำการจุ่มสารแต่ละชนิดได้แก่ น้ำ, สารเคมี imazalil ความเข้มข้น 500 ppm, เซลล์ของ *B.subtilis* 5 สายพันธุ์ (น้ำเชื้อ) และสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *B.subtilis* 5 สายพันธุ์ ผึ่งให้แห้งแล้วจึงทำการปลูกเชื้อคือ ชุดการทดลองที่ 2, 4, 6 และ 8

3.2.1 นำผลทุเรียนทำแผลด้วยกลุ่มเข็มซึ่งเตรียมโดยใช้เข็มหมุด 5 อัน เลียบที่จุกยางให้เป็นวงกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ปลายแหลมยาวประมาณ 0.5 เซนติเมตรเช่นกัน ทำแผลผลละ 2 แผล ที่พู่ตรงกันข้าม จากนั้นใช้เข็มเย็บ ๆ เชื้อรา *L.theobromae* (2-03) ซึ่งเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 5 วัน เจาะให้ขาดจากกันด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร วางบนรอยแผลให้ด้านที่มีเส้นใยสัมผัสกับรอยแผล ปิดทับด้วยเทปใสเบา ๆ เพื่อมิให้ชื้นวันหลุดร่วงขณะเคลื่อนย้าย ให้ความชื้นโดยบรรจุแต่ละผลในถุงพลาสติกที่พรมน้ำเล็กน้อย มัดปากถุงพลาสติกบ่มเชื้อไว้เป็นเวลา 9 ชั่วโมง ใช้เข็มเย็บเย็บก่อนเชื้อออกจากผล จากนั้นนำไปจุ่มในน้ำสะอาด (ชุดทดลองที่ 1) จุ่มสารเคมี imazalil (ชุดการทดลองที่ 3) จุ่มเชื้อ *B.subtilis* 5 สายพันธุ์ (ชุดการทดลองที่ 5) และจุ่มสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *B.subtilis* 5 สายพันธุ์ (ชุดการทดลองที่ 7) โดยจุ่มเป็นเวลา 3 นาทีในทุกการทดลอง ผึ่งให้แห้ง รอการบ่มให้สุก

3.2.2 นำผลทุเรียนที่คัดเลือกแล้วจุ่มในสารแต่ละชนิดคือ จุ่มในน้ำสะอาด (ชุดการทดลองที่ 2, จุ่มในสารเคมี imazalil (ชุดการทดลองที่ 4) จุ่มเชื้อ *B.subtilis* 5 สายพันธุ์ (ชุดการทดลองที่ 6) และจุ่มในสารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อ *B.subtilis* 5 สายพันธุ์ (ชุดการทดลองที่ 8) เป็นเวลา 3 นาที ผึ่งให้แห้ง จากนั้นจึงทำการปลูกเชื้อ *L. theobromae* (2-03) วิธีการเช่นเดียวกับการทดลองข้อ 3.2.1 บ่มเชื้อไว้และให้ความชื้นในถุงพลาสติกเป็นเวลา 9 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดนำออกจากถุงเย็บก่อนเชื้อออกและนำมาบ่มให้สุก

### 3.3 การบ่ม

นำผลในแต่ละชุดการทดลองที่ทำการทดลองและติดเครื่องหมายเรียบร้อยแล้วมากองรวมกันแบบสุ่มจนครบทุกชุดการทดลอง ปิดด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์จากนั้นฉีดพ่นด้วย ethrel ความเข้มข้น 2,000 ppm. จำนวน 5 มิลลิลิตร ปิดกระดาษอีกครั้งให้มิดชิด บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3-4 วัน เมื่อผลสุกจึงเปิดออกเพื่อทำการตรวจผล

### 3.4 การตรวจผล

วัดขนาดของผลทั้งแนวตั้งและแนวนอนของผลที่สุก บันทึกภาพและวิเคราะห์ผลทางสถิติและเปรียบเทียบเฉพาะกลุ่ม (orthogonal contrast analysis) ในขณะเดียวกันนับจำนวนผลและผลที่แสดงอาการโรคเพื่อวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ของการเกิดโรค

## (VII) ทดสอบประสิทธิภาพของสารในการยับยั้งการเกิดโรคผลเน่าจากเชื้อ *L.theobromae* ที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ

- 1.1 ทำการทดลองโดยใช้ผลทุเรียนหมอนทองจากสวนเกษตรกร อ.เมือง จ.ชุมพร ซึ่งไม่มีการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืช จุ่มในสารเคมี imazalil 500 ppm. น้ำเลี้ยงเชื้อของ *B. subtilis* 5 สายพันธุ์และสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อของ *B. subtilis* 5 สายพันธุ์ ส่วนชุดควบคุมจุ่มในน้ำเป็นเวลา 1 นาทีทุกกรรมวิธี ผึ่งให้แห้งจากนั้นทำการบ่มด้วย ethrel ความเข้มข้น 2,000 ppm ปิดคลุมทุเรียนด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์หลาย ๆ ชั้น ทั้งนี้วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอดกรรมวิธีละ 30 ผล
- 1.2 เมื่อผลสุก ทำการนับผลที่เป็นโรคผลเน่าจากเชื้อ *L.theobromae* บันทึกภาพและวิเคราะห์ข้อมูล



## ผลการทดลองและวิจารณ์

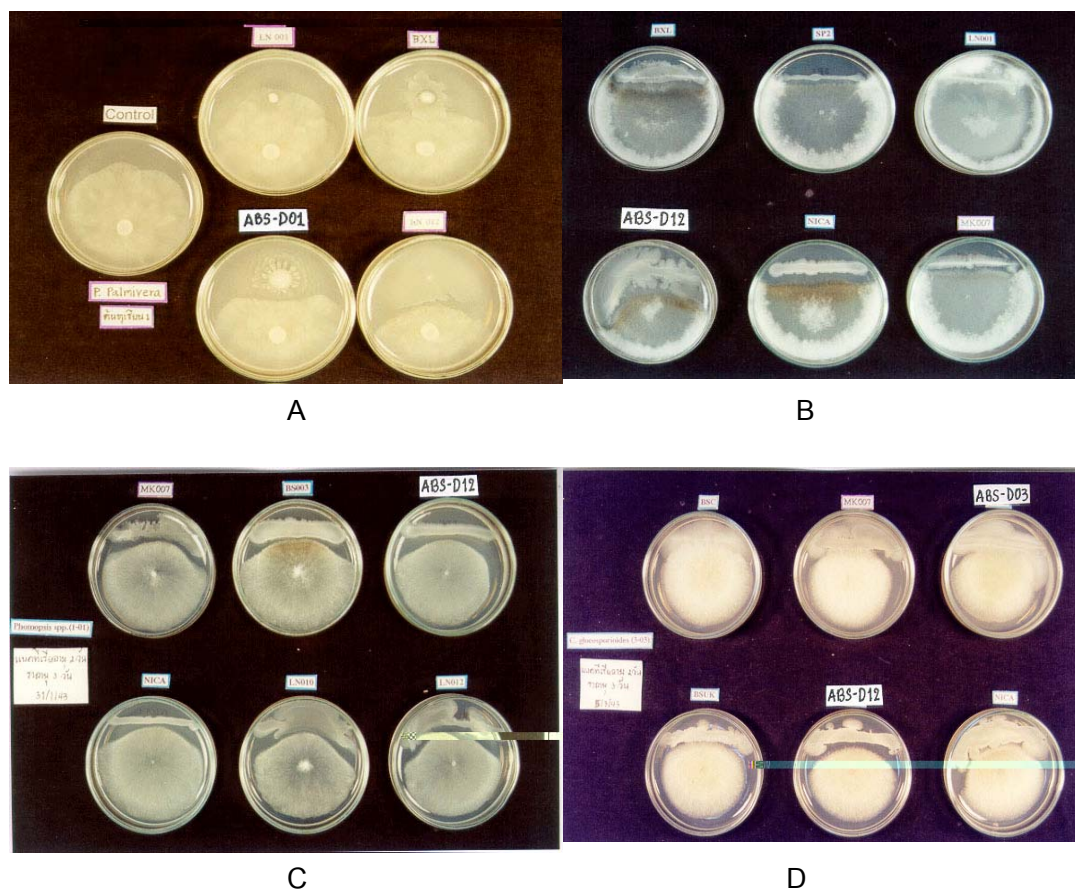
### 1. ปฏิกิริยาปฏิปักษ์ของ *B.subtilis* ต่อเชื้อราโรคทุเรียนบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

เชื้อ *B.subtilis* ส่วนใหญ่ที่นำมาทดสอบฤทธิ์ต้านราก่อโรคในทุเรียนโดยวิธี dual culture technique แยกสายพันธุ์ที่มีฤทธิ์ต้านหรือครอบคลุมการเจริญของราก่อโรคในทุเรียนได้มากที่สุด ได้จำนวน 23 สายพันธุ์ (ตารางที่ 1) ซึ่งแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆเหล่านี้อาจสร้างสารออกมายับยั้งเส้นใยรา ทำให้เห็น inhibition zone หรือกันไม่ให้เชื้อราเจริญข้ามแบคทีเรียไปได้ แบคทีเรียบางชนิดเจริญเร็วสามารถเจริญโอบล้อมเชื้อราได้ (รูปที่ 3) มีเพียง ABS-D14 ที่ไม่ยับยั้งเชื้อรา อย่างไรก็ตามวิธีการนี้เป็นเพียงการทดสอบเบื้องต้นเท่านั้น ไม่สามารถเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านราได้อย่างชัดเจน จึงได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

ตารางที่ 1 ผลการยับยั้งราก่อโรคในทุเรียนโดย *B. subtilis* ด้วยวิธี dual culture technique

| แบคทีเรีย | Pp<br>(จันทบุรี) | Pp<br>(T1) | Pp<br>(T2) | Lt<br>(2-01) | Lt<br>(2-03) | Ps<br>(1-01) | Ps<br>(1-02) | Cg<br>(3-03) | Cg<br>(3-05) |
|-----------|------------------|------------|------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| ABS-D01   | ++               | ++         | ++         | ++           | ++           | ++           | ++           | +            | +            |
| ABS-D02   | ++               | ++         | ++         | ++           | ++           | ++           | ++           | ++           | ++           |
| ABS-D03   | ND               | ND         | ND         | +            | +            | ND           | ND           | ++           | +            |
| ABS-D04*  | ++               | +          | ++         | +            | +            | +            | +            | +            | +            |
| ABS-D05*  | ++               | +          | ++         | +            | +            | ++           | +            | +            | +            |
| ABS-D06   | ND               | ND         | ++         | ND           | +            | ++           | ++           | +            | ND           |
| ABS-D07   | ++               | +          | ++         | +            | +            | ++           | ++           | +            | ++           |
| ABS-D08   | ND               | ND         | ++         | ++           | +            | ++           | ++           | +            | ++           |
| ABS-D09   | ND               | ND         | -          | +            | +            | ++           | ++           | ND           | +            |
| ABS-D10   | ++               | +          | ++         | ++           | ++           | ++           | ++           | ++           | ++           |
| ABS-D11   | ++               | ++         | ++         | ++           | ++           | ++           | ++           | ++           | +            |
| ABS-D12   | +++              | ++         | ++         | ++           | ++           | ++           | ++           | ++           | ++           |
| ABS-D13   | ND               | ND         | ++         | ++           | +            | +            | ++           | ND           | ND           |
| ABS-D14*  | ND               | ND         | +/-        | +/-          | +/-          | +/-          | +/-          | +/-          | -            |
| ABS-D15*  | ND               | ND         | ++         | ++           | +            | ++           | ++           | ++           | ++           |
| ABS-D16*  | ND               | ND         | ++         | ++           | +            | ++           | ++           | ++           | ++           |
| ABS-D17*  | ND               | ND         | ++         | ++           | +            | ++           | ++           | ++           | ++           |
| ABS-D18*  | ++               | ++         | ++         | ++           | +            | ++           | ++           | ++           | ++           |
| ABS-D19   | ++               | ++         | ++         | ++           | +            | ++           | ++           | ++           | ++           |
| ABS-D20   | +++              | ++         | ++         | +            | +            | ++           | +            | +            | +            |
| ABS-D21   | ++               | ++         | ++         | +            | +            | ++           | +            | +            | +            |
| ABS-D22   | ++               | ++         | ++         | +            | +            | ++           | ++           | +            | +            |
| ABS-D23   | ND               | ND         | ++         | +            | +            | ++           | +            | ++           | ++           |

Pp = *P. palmivora*, Lt = *L. theobromae*, Cg = *C. gloeosporioides*, Ps = *phomopsis* sp. , +/- trace inhibition, + มีฤทธิ์ยับยั้ง เชื้อราเจริญไปติดแบคทีเรีย แต่ไม่เจริญข้ามแบคทีเรีย, ++ มีฤทธิ์ยับยั้ง เกิด inhibition zone 0.1-0.9 ซม., +++ มีฤทธิ์ยับยั้ง เกิด inhibition zone  $\geq 1.0$  ซม. \*= เชื้อจากโครงการ ABS/TRF



รูปที่ 3 การยับยั้งของ *B. subtilis* ต่อกาการเจริญของเส้นใยราที่เป็นสาเหตุของโรคทุเรียน  
(A=*P. palmivora*, B=*L. theobromae*, C=*Phomopsis* sp., D=*C. gloeosporioides*)

## 2. ประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา

จากการทดสอบพบว่า น้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ระดับความเข้มข้น 1:2 สามารถยับยั้งการเจริญของราก่อโรคในทุเรียนทั้ง 9 ไอโซเลตได้ 25–100 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2-10) น้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย 11-13 สายพันธุ์ จาก 19 สายพันธุ์ คิดเป็น 57.9–68.4 เปอร์เซ็นต์ที่ระดับความเข้มข้น 1:2 สามารถยับยั้ง *P.palmivora* ได้ดี โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งมากกว่า 70 (ตารางที่ 2-4) โดยมีน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย 6 ชนิดที่ยับยั้ง *P.palmivora* ทั้ง 3 สายพันธุ์ได้ดีที่ระดับความเข้มข้น 1:4 ได้แก่ ABS-D01, ABS-D02, ABS-D03, ABS-D11, ABS-D20 และ ABS-D12 (ตารางที่ 5 และรูปที่ 4)

สำหรับเชื้อ *L.theobromae*, *Phomopsis* sp. และ *C.gloeosporioides* นั้นไวต่อน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียมากกว่า *P.palmivora* โดยที่น้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย 17-20 สายพันธุ์ที่ระดับความเข้มข้น 1:2 สามารถยับยั้งการเจริญได้มากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 6-11) และมีบางชนิดที่ระดับความเข้มข้น 1: 64 ยังสามารถยับยั้งเชื้อราได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ น้ำเลี้ยงเชื้อ ABS-D01, ABS-D03, ABS-D11 และ ABS-D12 กับเชื้อรา *L.theobromae* น้ำเลี้ยงเชื้อ ABS-D01, ABS-D03 และ ABS-D22 กับเชื้อรา *Phomopsis* sp. และ น้ำเลี้ยงเชื้อ ABS-D01, ABS-D03, ABS-D11 และ ABS-D22 กับเชื้อรา *C.gloeosporioides*

เมื่อพิจารณาผลของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียต่อราทั้ง 9 ไอโซเลต พบว่า มีน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราทั้งหมดที่ทดสอบ (ตารางที่ 12-14 และรูปที่ 5-7) ได้แก่ ABS-D01, ABS-D02, ABS-D03, ABS-D11 และ ABS-D12 จึงได้นำแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์นี้มาทำการเพาะเลี้ยงเพิ่มในอาหารเหลวเพื่อสกัดสารและทดสอบหาค่า  $EC_{50}$  ต่อไป

ตารางที่ 2 ผลของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียต่อการเจริญของเชื้อรา *P.palmivora* (จันทบุรี)

| แบคทีเรีย | เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ความเข้มข้นต่างๆ |       |       |      |      |      |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------|-------|-------|------|------|------|
|           | 1:2                                                                       | 1:4   | 1:8   | 1:16 | 1:32 | 1:64 |
| ABS-D01   | 100.00                                                                    | 92.39 | 10.07 | 0    | 0    | 0    |
| ABS-D02   | 100.00                                                                    | 77.52 | 13.32 | 3.42 | 0    | 0    |
| ABS-D03   | 100.00                                                                    | 92.39 | 14.91 | 0    | 0    | 0    |
| ABS-D04   | 59.50                                                                     | 2.41  | 0     | 0    | 0    | 0    |
| ABS-D05   | 79.88                                                                     | 30.05 | 0     | 0    | 0    | 0    |
| ABS-D06   | 52.26                                                                     | 9.46  | 0     | 0    | 0    | 0    |
| ABS-D07   | 56.36                                                                     | 23.83 | 2.41  | 0    | 0    | 0    |
| ABS-D08   | 70.25                                                                     | 24.89 | 2.41  | 0    | 0    | 0    |
| ABS-D09   | 47.56                                                                     | 17.13 | 9.42  | 0    | 0    | 0    |
| ABS-D10   | 58.73                                                                     | 28.01 | 1.21  | 0    | 0    | 0    |
| ABS-D11   | 100.00                                                                    | 91.90 | 31.51 | 0    | 0    | 0    |
| ABS-D12   | 96.72                                                                     | 34.33 | 10.08 | 0    | 0    | 0    |
| ABS-D13   | 99.82                                                                     | 23.28 | 9.42  | 0    | 0    | 0    |
| ABS-D17   | 85.88                                                                     | 28.01 | 8.30  | 0    | 0    | 0    |
| ABS-D18   | 47.10                                                                     | 22.77 | 2.41  | 0    | 0    | 0    |
| ABS-D19   | 66.15                                                                     | 30.05 | 7.14  | 0    | 0    | 0    |
| ABS-D20   | 99.69                                                                     | 48.55 | 8.10  | 0    | 0    | 0    |
| ABS-D22   | 60.27                                                                     | 12.89 | 0     | 0    | 0    | 0    |
| ABS-D23   | 82.00                                                                     | 34.04 | 14.01 | 0    | 0    | 0    |
| ABS-D20   | 99.69                                                                     | 48.55 | 8.10  | 0    | 0    | 0    |
| ABS-D22   | 60.27                                                                     | 12.89 | 0     | 0    | 0    | 0    |
| ABS-D23   | 82.00                                                                     | 34.04 | 14.01 | 0    | 0    | 0    |

ตารางที่ 3 ผลของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียต่อการเจริญของเชื้อรา *P.palmivora* (T1)

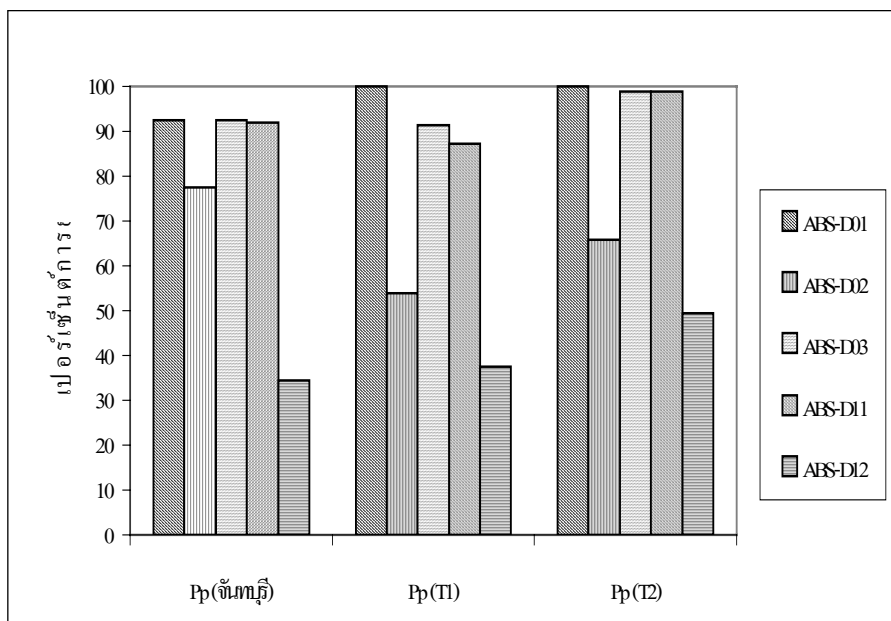
| แบคทีเรีย | เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ความเข้มข้นต่างๆ |        |       |       |      |      |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------|--------|-------|-------|------|------|
|           | 1:2                                                                       | 1:4    | 1:8   | 1:16  | 1:32 | 1:64 |
| ABS-D01   | 100.00                                                                    | 100.00 | 40.10 | 16.63 | 5.15 | 3.45 |
| ABS-D02   | 100.00                                                                    | 54.00  | 22.86 | 3.45  | 1.73 | 0    |
| ABS-D03   | 100.00                                                                    | 91.26  | 28.85 | 6.83  | 6.83 | 1.73 |
| ABS-D04   | 56.39                                                                     | 8.61   | 1.25  | 0     | 0    | 0    |
| ABS-D05   | 77.15                                                                     | 28.97  | 9.81  | 0     | 0    | 0    |
| ABS-D06   | 48.59                                                                     | 4.97   | 0     | 0     | 0    | 0    |
| ABS-D07   | 57.21                                                                     | 19.11  | 7.40  | 0     | 0    | 0    |
| ABS-D08   | 85.28                                                                     | 24.67  | 7.40  | 4.96  | 0    | 0    |
| ABS-D09   | 44.82                                                                     | 20.28  | 1.42  | 0     | 0    | 0    |
| ABS-D10   | 74.68                                                                     | 33.15  | 4.97  | 0     | 0    | 0    |
| ABS-D11   | 100.00                                                                    | 87.29  | 22.86 | 0     | 0    | 0    |
| ABS-D12   | 100.00                                                                    | 37.38  | 27.37 | 13.43 | 5.15 | 0    |
| ABS-D13   | 99.67                                                                     | 27.75  | 17.71 | 0     | 0    | 0    |
| ABS-D17   | 94.58                                                                     | 39.20  | 12.18 | 2.50  | 0    | 0    |
| ABS-D18   | 63.54                                                                     | 24.66  | 9.81  | 0     | 0    | 0    |
| ABS-D19   | 90.88                                                                     | 46.77  | 10.99 | 0     | 0    | 0    |
| ABS-D20   | 99.98                                                                     | 64.00  | 8.38  | 0     | 0    | 0    |
| ABS-D22   | 42.08                                                                     | 24.67  | 2.49  | 0     | 0    | 0    |
| ABS-D23   | 70.74                                                                     | 60.44  | 15.68 | 4.97  | 0    | 0    |

ตารางที่ 4 ผลของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียต่อการเจริญของเชื้อรา *P.palmivora* (T2)

| แบคทีเรีย | เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ความเข้มข้นต่างๆ |       |       |       |       |      |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|------|
|           | 1:2                                                                       | 1:4   | 1:8   | 1:16  | 1:32  | 1:64 |
| ABS-D01   | 100                                                                       | 100   | 23.80 | 9.91  | 8.29  | 3.36 |
| ABS-D02   | 100                                                                       | 65.80 | 16.23 | 6.66  | 3.36  | 0    |
| ABS-D03   | 100                                                                       | 98.96 | 22.32 | 5.02  | 0     | 0    |
| ABS-D04   | 71.55                                                                     | 29.91 | 11.00 | 7.40  | 0     | 0    |
| ABS-D05   | 86.69                                                                     | 46.77 | 15.68 | 15.68 | 9.81  | 0    |
| ABS-D06   | 60.44                                                                     | 27.91 | 21.36 | 6.19  | 0     | 0    |
| ABS-D07   | 67.24                                                                     | 40.15 | 21.35 | 6.19  | 0     | 0    |
| ABS-D08   | 69.37                                                                     | 34.17 | 20.24 | 17.97 | 16.83 | 0    |
| ABS-D09   | 46.93                                                                     | 23.58 | 9.05  | 0     | 0     | 0    |
| ABS-D10   | 74.05                                                                     | 41.12 | 14.52 | 4.97  | 0     | 0    |
| ABS-D11   | 100                                                                       | 98.96 | 31.02 | 5.02  | 3.36  | 0    |
| ABS-D12   | 99.13                                                                     | 49.32 | 31.02 | 14.67 | 3.36  | 0    |
| ABS-D13   | 98.06                                                                     | 32.56 | 17.68 | 0     | 0     | 0    |
| ABS-D17   | 80.06                                                                     | 41.12 | 14.52 | 8.61  | 3.73  | 0    |
| ABS-D18   | 65.05                                                                     | 44.92 | 19.11 | 8.61  | 0     | 0    |
| ABS-D19   | 93.35                                                                     | 46.77 | 15.68 | 4.97  | 0     | 0    |
| ABS-D20   | 99.37                                                                     | 50.72 | 10.31 | 0     | 0     | 0    |
| ABS-D22   | 69.36                                                                     | 32.12 | 13.35 | 8.61  | 0     | 0    |
| ABS-D23   | 81.71                                                                     | 65.05 | 20.24 | 9.81  | 0     | 0    |

ตารางที่ 5 ผลของน้ำเลี้ยงเชื้อ *B.subtilis* 5 สายพันธุ์ ที่ระดับความเข้มข้น 1:4 ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P.palmivora*

| เชื้อรา                       | เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อราจากน้ำเลี้ยงเชื้อ <i>B.subtilis</i> ที่เจือจาง 4 เท่า |         |         |         |         |
|-------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|---------|---------|---------|---------|
|                               | ABS-D01                                                                                      | ABS-D02 | ABS-D03 | ABS-D11 | ABS-D12 |
| <i>P.palmivora</i> (จันทบุรี) | 92.39                                                                                        | 77.52   | 92.39   | 91.90   | 34.33   |
| <i>P.palmivora</i> (T1)       | 100.00                                                                                       | 54.00   | 91.26   | 87.29   | 37.38   |
| <i>P.palmivora</i> (T2)       | 100.00                                                                                       | 65.80   | 98.96   | 98.96   | 49.32   |



รูปที่ 4 แผนภูมิเปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P.palmivora* (จันทบุรี, T1 และ T2) ของน้ำเลี้ยงเชื้อ *B.subtilis* 5 สายพันธุ์ (ABS-D01, D02, D03, D11, และ D12) ที่เจือจาง 4 เท่า



ตารางที่ 6 ผลของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียต่อการเจริญของเชื้อรา *L.theobromae* (2-01)

| แบคทีเรีย | เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ความเข้มข้นต่างๆ |       |       |       |       |       |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
|           | 1:2                                                                       | 1:4   | 1:8   | 1:16  | 1:32  | 1:64  |
| ABS-D01   | 93.93                                                                     | 92.78 | 88.72 | 88.21 | 76.47 | 53.88 |
| ABS-D02   | 100                                                                       | 100   | 97.96 | 75.79 | 69.13 | 34.46 |
| ABS-D03   | 97.77                                                                     | 94.65 | 87.70 | 81.26 | 79.95 | 70.32 |
| ABS-D04   | 42.83                                                                     | 39.08 | 27.12 | 16.34 | 16.34 | 0     |
| ABS-D05   | 62.81                                                                     | 44.66 | 33.24 | 25.03 | 18.56 | 11.82 |
| ABS-D06   | 100                                                                       | 94.80 | 96.25 | 70.37 | 67.55 | 16.93 |
| ABS-D07   | 100                                                                       | 100   | 61.47 | 42.45 | 31.51 | 8.43  |
| ABS-D08   | 99.63                                                                     | 94.63 | 88.34 | 88.34 | 81.78 | -     |
| ABS-D09   | 99.46                                                                     | 97.08 | 94.05 | 85.71 | 78.52 | 67.14 |
| ABS-D10   | 99.37                                                                     | 98.08 | 96.08 | 92.85 | 61.09 | 9.65  |
| ABS-D11   | 100                                                                       | 100   | 100   | 97.34 | 71.63 | 61.61 |
| ABS-D12   | 100                                                                       | 100   | 100   | 99.93 | 81.42 | 54.78 |
| ABS-D13   | 79.95                                                                     | 71.13 | 47.60 | 27.62 | 11.58 | 0     |
| ABS-D15   | 100                                                                       | 99.85 | 90.77 | 21.48 | 0     | 0     |
| ABS-D16   | 88.34                                                                     | 71.21 | 40.97 | 33.24 | 31.23 | 22.90 |
| ABS-D17   | 100                                                                       | 100   | 100   | 100   | 73.25 | 57.07 |
| ABS-D18   | 100                                                                       | 100   | 92.72 | 59.67 | 57.63 | 31.85 |
| ABS-D19   | 100                                                                       | 100   | 100   | 99.94 | 61.77 | 46.68 |
| ABS-D20   | 91.24                                                                     | 87.24 | 68.50 | 61.25 | 39.86 | 38.26 |
| ABS-D21   | 90.00                                                                     | 70.75 | 50.43 | 41.43 | 24.77 | -     |
| ABS-D22   | 99.04                                                                     | 97.75 | 94.79 | 93.19 | 90.74 | 66.81 |
| ABS-D23   | 94.35                                                                     | 77.41 | 46.32 | 40.36 | 24.08 | 15.21 |

ตารางที่ 7 ผลของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียต่อการเจริญของเชื้อรา *L.theobromae* (2-03)

| แบคทีเรีย | เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ความเข้มข้นต่างๆ |       |       |       |       |       |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
|           | 1:2                                                                       | 1:4   | 1:8   | 1:16  | 1:32  | 1:64  |
| ABS-D01   | 92.28                                                                     | 85.59 | 73.11 | 72.14 | 60.36 | 58.00 |
| ABS-D02   | 100                                                                       | 100   | 96.95 | 63.62 | 15.24 | 0     |
| ABS-D03   | 91.22                                                                     | 86.96 | 84.87 | 77.70 | 72.14 | 68.10 |
| ABS-D04   | 62.82                                                                     | 44.66 | 33.24 | 25.03 | 18.56 | 11.82 |
| ABS-D05   | 62.59                                                                     | 51.13 | 42.65 | 39.67 | 18.47 | 1.93  |
| ABS-D06   | 100                                                                       | 95.32 | 94.72 | 92.69 | 80.11 | 33.75 |
| ABS-D07   | 100                                                                       | 100   | 74.01 | 55.55 | 50.17 | 1.95  |
| ABS-D08   | 93.13                                                                     | 85.66 | 76.43 | 73.52 | 51.13 | -     |
| ABS-D09   | 94.11                                                                     | 87.09 | 80.91 | 63.76 | 49.77 | 20.21 |
| ABS-D10   | 98.58                                                                     | 98.76 | 85.49 | 73.39 | 50.10 | 45.52 |
| ABS-D11   | 100                                                                       | 100   | 98.92 | 81.94 | 66.88 | 56.38 |
| ABS-D12   | 100                                                                       | 100   | 100   | 100   | 83.04 | 44.48 |
| ABS-D13   | 87.62                                                                     | 65.97 | 33.61 | 12.54 | 5.48  | 0     |
| ABS-D15   | 100                                                                       | 100   | 93.41 | 46.75 | 36.43 | 20.45 |
| ABS-D16   | 87.78                                                                     | 57.68 | 44.11 | 33.48 | 27.00 | 0     |
| ABS-D17   | 100                                                                       | 100   | 100   | 99.04 | 69.86 | 45.93 |
| ABS-D18   | 100                                                                       | 100   | 91.34 | 58.13 | 5.79  | 11.42 |
| ABS-D19   | 100                                                                       | 100   | 100   | 89.53 | 39.25 | 11.42 |
| ABS-D20   | 87.98                                                                     | 84.00 | 67.13 | 50.06 | 31.16 | 0     |
| ABS-D21   | 87.98                                                                     | 60.73 | 50.06 | 44.25 | 24.89 | -     |
| ABS-D22   | ND                                                                        | ND    | ND    | ND    | ND    | ND    |
| ABS-D23   | 95.74                                                                     | 90.90 | 67.35 | 59.69 | 54.49 | 16.50 |

หมายเหตุ: ND = not determined

ตารางที่ 8 ผลของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียต่อการเจริญของเชื้อรา *Phomopsis* sp.(1-01)

| แบคทีเรีย | เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ความเข้มข้นต่างๆ |       |       |       |       |       |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
|           | 1:2                                                                       | 1:4   | 1:8   | 1:16  | 1:32  | 1:64  |
| ABS-D01   | 83.42                                                                     | 70.41 | 80.19 | 92.15 | 95.17 | 83.91 |
| ABS-D02   | 100                                                                       | 100   | 96.20 | 82.73 | 30.91 | 0     |
| ABS-D03   | 82.10                                                                     | 80.68 | 85.62 | 94.42 | 95.64 | 91.19 |
| ABS-D04   | 55.29                                                                     | 45.09 | 38.67 | 35.80 | 34.84 | 26.82 |
| ABS-D05   | 75.60                                                                     | 70.60 | 45.09 | 33.86 | 23.70 | 15.05 |
| ABS-D06   | 78.26                                                                     | 58.50 | 51.94 | 47.59 | 24.10 | 7.57  |
| ABS-D07   | 100                                                                       | 100   | 89.59 | 48.72 | 16.07 | 0     |
| ABS-D08   | 86.59                                                                     | 80.41 | 89.60 | 90.30 | 81.36 | -     |
| ABS-D09   | 81.83                                                                     | 65.17 | 63.20 | 55.55 | 53.34 | 36.35 |
| ABS-D10   | 90.28                                                                     | 87.90 | 82.00 | 72.33 | 52.62 | 20.86 |
| ABS-D11   | 100                                                                       | 99.82 | 98.78 | 94.56 | 71.51 | 43.98 |
| ABS-D12   | 100                                                                       | 100   | 100   | 100   | 98.85 | 66.28 |
| ABS-D13   | 67.35                                                                     | 39.12 | 52.07 | 15.80 | 27.47 | 22.71 |
| ABS-D15   | 100                                                                       | 94.56 | 93.04 | 76.51 | 20.86 | 17.56 |
| ABS-D16   | 93.40                                                                     | 81.83 | 54.08 | 35.47 | 10.63 | 9.59  |
| ABS-D17   | 100                                                                       | 100   | 100   | 100   | 75.32 | 16.07 |
| ABS-D18   | 100                                                                       | 100   | 100   | 85.81 | 59.50 | 24.74 |
| ABS-D19   | 100                                                                       | 100   | 100   | 99.73 | 76.90 | 12.56 |
| ABS-D20   | 58.08                                                                     | 54.27 | 36.23 | 24.22 | 17.83 | 16.52 |
| ABS-D21   | 79.46                                                                     | 74.64 | 70.10 | 70.10 | 66.04 | -     |
| ABS-D22   | 82.08                                                                     | 76.51 | 90.96 | 92.03 | 86.90 | 51.08 |
| ABS-D23   | 75.64                                                                     | 73.01 | 47.11 | 30.91 | 26.53 | 14.98 |

ตารางที่ 9 ผลของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียต่อการเจริญของเชื้อรา *Phomopsis* sp.(1-02)

| แบคทีเรีย | เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ความเข้มข้นต่างๆ |       |       |       |       |       |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
|           | 1:2                                                                       | 1:4   | 1:8   | 1:16  | 1:32  | 1:64  |
| ABS-D01   | 92.38                                                                     | 92.03 | 91.68 | 91.33 | 90.59 | 87.33 |
| ABS-D02   | 100                                                                       | 100   | 91.00 | 65.48 | 53.12 | 4.94  |
| ABS-D03   | 93.98                                                                     | 91.68 | 90.21 | 90.21 | 89.02 | 87.34 |
| ABS-D04   | 25.79                                                                     | 19.43 | 10.55 | 3.58  | 0     | 0     |
| ABS-D05   | 46.87                                                                     | 23.70 | 19.43 | 16.15 | 10.55 | 7.10  |
| ABS-D06   | 83.49                                                                     | 74.21 | 71.78 | 65.67 | 40.18 | 24.80 |
| ABS-D07   | 99.98                                                                     | 91.25 | 76.39 | 18.74 | 9.41  | 5.55  |
| ABS-D08   | 92.65                                                                     | 91.98 | 91.28 | 89.02 | 87.79 | -     |
| ABS-D09   | 89.42                                                                     | 87.37 | 83.22 | 80.13 | 66.55 | 45.98 |
| ABS-D10   | 99.81                                                                     | 98.29 | 95.88 | 76.43 | 72.78 | 39.88 |
| ABS-D11   | 100                                                                       | 98.67 | 94.96 | 91.17 | 76.47 | 65.23 |
| ABS-D12   | 100                                                                       | 100   | 100   | 97.37 | 83.32 | 48.40 |
| ABS-D13   | 72.80                                                                     | 62.36 | 57.71 | 33.42 | 26.23 | 14.18 |
| ABS-D15   | 96.18                                                                     | 93.75 | 89.23 | 54.86 | 13.57 | 10.64 |
| ABS-D16   | 90.56                                                                     | 80.13 | 45.98 | 29.88 | 10.55 | 8.25  |
| ABS-D17   | 100                                                                       | 100   | 99.76 | 92.06 | 66.65 | 13.58 |
| ABS-D18   | 100                                                                       | 100   | 84.98 | 52.73 | 0     | 0     |
| ABS-D19   | 100                                                                       | 100   | 100   | 80.86 | 51.00 | 4.93  |
| ABS-D20   | 79.60                                                                     | 74.02 | 59.20 | 37.03 | 25.26 | 21.88 |
| ABS-D21   | 59.20                                                                     | 36.00 | 34.90 | 33.92 | 23.01 | -     |
| ABS-D22   | 90.44                                                                     | 88.88 | 84.94 | 88.87 | 85.86 | 70.20 |
| ABS-D23   | 95.27                                                                     | 77.81 | 54.58 | 34.88 | 34.13 | 20.56 |

ตารางที่ 10 ผลของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียต่อการเจริญของเชื้อรา *C.gloeosporioides* (3-03)

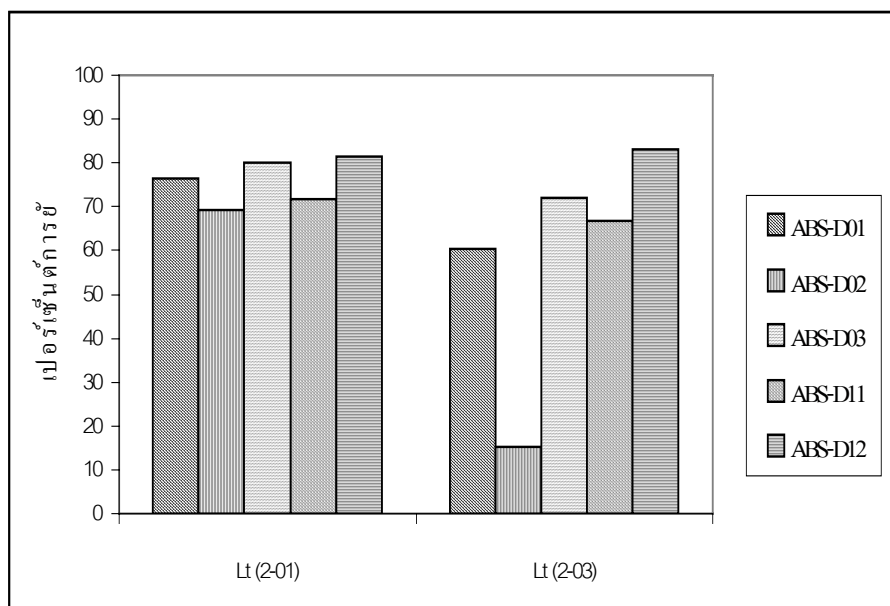
| แบคทีเรีย | เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ความเข้มข้นต่างๆ |       |       |       |       |       |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
|           | 1:2                                                                       | 1:4   | 1:8   | 1:16  | 1:32  | 1:64  |
| ABS-D01   | 86.42                                                                     | 84.42 | 83.57 | 82.71 | 82.27 | 78.06 |
| ABS-D02   | 100                                                                       | 95.00 | 81.05 | 50.17 | 35.99 | 20.05 |
| ABS-D03   | 87.56                                                                     | 85.64 | 83.14 | 82.71 | 82.27 | 79.51 |
| ABS-D04   | 35.51                                                                     | 32.23 | 26.28 | 21.88 | 20.08 | 10.80 |
| ABS-D05   | 64.48                                                                     | 62.65 | 52.12 | 40.29 | 31.39 | 29.71 |
| ABS-D06   | 93.31                                                                     | 90.37 | 85.61 | 77.79 | 62.89 | 38.91 |
| ABS-D07   | 91.0                                                                      | 80.31 | 51.00 | 18.73 | 16.73 | 6.15  |
| ABS-D08   | 91.35                                                                     | 90.46 | 88.56 | 87.54 | 80.53 | -     |
| ABS-D09   | 96.06                                                                     | 94.80 | 91.77 | 87.54 | 83.64 | 57.17 |
| ABS-D10   | 80.57                                                                     | 79.39 | 68.73 | 58.18 | 57.76 | 29.97 |
| ABS-D11   | 100                                                                       | 98.81 | 93.12 | 87.38 | 69.54 | 50.13 |
| ABS-D12   | 100                                                                       | 100   | 93.75 | 91.37 | 71.78 | 31.94 |
| ABS-D13   | 76.04                                                                     | 60.11 | 51.00 | 26.40 | 8.24  | 0     |
| ABS-D15   | 99.73                                                                     | 95.23 | 81.91 | 58.57 | 35.26 | 32.46 |
| ABS-D16   | 81.18                                                                     | 67.10 | 49.13 | 40.30 | 39.25 | 33.38 |
| ABS-D17   | 100                                                                       | 100   | 91.73 | 77.44 | 43.75 | 16.73 |
| ABS-D18   | 100                                                                       | 98.62 | 75.58 | 41.52 | 26.24 | 11.42 |
| ABS-D19   | 100                                                                       | 100   | 92.03 | 74.41 | 48.50 | 20.05 |
| ABS-D20   | 60.19                                                                     | 58.67 | 57.90 | 49.82 | 46.39 | 44.64 |
| ABS-D21   | 50.97                                                                     | 29.56 | 48.13 | 48.98 | 37.33 | -     |
| ABS-D22   | 86.19                                                                     | 86.59 | 87.38 | 86.99 | 79.92 | 56.28 |
| ABS-D23   | 56.72                                                                     | 36.63 | 18.76 | 11.49 | 0     | 0     |

ตารางที่ 11 ผลของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียต่อการเจริญของเชื้อรา *C.gloeosporioides* (3-05)

| แบคทีเรีย | เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ความเข้มข้นต่างๆ |       |       |       |       |       |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
|           | 1:2                                                                       | 1:4   | 1:8   | 1:16  | 1:32  | 1:64  |
| ABS-D01   | 85.26                                                                     | 74.10 | 73.18 | 72.25 | 70.33 | 65.27 |
| ABS-D02   | 100                                                                       | 100   | 97.38 | 68.77 | 36.94 | 22.14 |
| ABS-D03   | 85.94                                                                     | 83.13 | 80.86 | 80.86 | 77.60 | 73.18 |
| ABS-D04   | 46.43                                                                     | 41.00 | 32.95 | 30.55 | 16.63 | 8.50  |
| ABS-D05   | 70.46                                                                     | 69.67 | 68.87 | 62.95 | 47.49 | 43.20 |
| ABS-D06   | 81.38                                                                     | 77.01 | 66.89 | 53.08 | 30.17 | 10.66 |
| ABS-D07   | 98.22                                                                     | 96.00 | 88.89 | 41.11 | 15.97 | 6.56  |
| ABS-D08   | 91.94                                                                     | 89.17 | 82.41 | 75.96 | 73.36 | -     |
| ABS-D09   | 85.01                                                                     | 84.51 | 77.21 | 67.76 | 54.98 | 29.65 |
| ABS-D10   | 75.00                                                                     | 71.20 | 68.25 | 59.69 | 59.69 | 48.98 |
| ABS-D11   | 100                                                                       | 100   | 100   | 91.20 | 73.27 | 55.18 |
| ABS-D12   | 100                                                                       | 100   | 100   | 96.00 | 88.89 | 48.64 |
| ABS-D13   | 63.14                                                                     | 45.08 | 42.40 | 29.56 | 28.05 | 13.77 |
| ABS-D15   | 96.83                                                                     | 96.05 | 93.22 | 69.97 | 37.96 | 31.31 |
| ABS-D16   | 75.96                                                                     | 70.63 | 65.53 | 61.64 | 60.83 | 56.69 |
| ABS-D17   | 100                                                                       | 100   | 99.16 | 91.00 | 84.00 | 48.64 |
| ABS-D18   | 98.94                                                                     | 97.61 | 93.75 | 52.22 | 19.52 | 2.92  |
| ABS-D19   | 99.65                                                                     | 99.65 | 98.25 | 96.34 | 75.00 | 22.14 |
| ABS-D20   | 35.40                                                                     | 44.10 | 55.27 | 41.27 | 32.36 | 30.81 |
| ABS-D21   | 45.49                                                                     | 24.46 | 27.67 | 50.58 | 10.90 | -     |
| ABS-D22   | 77.47                                                                     | 70.58 | 68.71 | 68.71 | 57.42 | 52.88 |
| ABS-D23   | 70.01                                                                     | 68.25 | 69.13 | 55.55 | 57.65 | 53.41 |

ตารางที่ 12 ผลของน้ำเลี้ยงเชื้อ *B.subtilis* 5 สายพันธุ์ ที่ระดับความเข้มข้น 1:32 ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *L.theobromae*

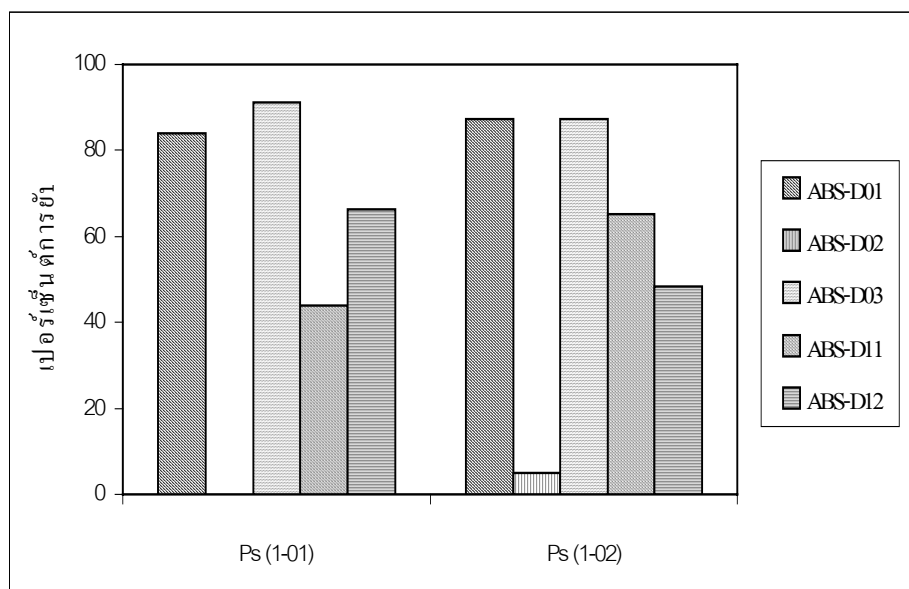
| เชื้อรา                    | เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อราจากน้ำเลี้ยงเชื้อ <i>B.subtilis</i> ที่เจือจาง 32 เท่า |         |         |         |         |
|----------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|---------|---------|---------|---------|
|                            | ABS-D01                                                                                       | ABS-D02 | ABS-D03 | ABS-D11 | ABS-D12 |
| <i>L.theobromae</i> (2-01) | 76.47                                                                                         | 69.13   | 79.95   | 71.63   | 81.42   |
| <i>L.theobromae</i> (2-03) | 60.36                                                                                         | 15.24   | 72.14   | 66.88   | 83.04   |



รูปที่ 5 แผนภูมิเปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *L.theobromae* (2-01, 2-03) ของน้ำเลี้ยงเชื้อ *B.subtilis* 5 สายพันธุ์ (ABS-D01, D02, D03, D11, และ D12) ที่เจือจาง 32 เท่า

ตารางที่ 13 ผลของน้ำเลี้ยงเชื้อ *B.subtilis* 5 สายพันธุ์ ที่ระดับความเข้มข้น 1:64 ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Phomopsis* sp.

| เชื้อรา                    | เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อราจากน้ำเลี้ยงเชื้อ <i>B.subtilis</i> ที่เจือจาง 64 เท่า |         |         |         |         |
|----------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|---------|---------|---------|---------|
|                            | ABS-D01                                                                                       | ABS-D02 | ABS-D03 | ABS-D11 | ABS-D12 |
| <i>Phomopsis</i> sp.(1-01) | 83.91                                                                                         | 0       | 91.19   | 43.98   | 66.28   |
| <i>Phomopsis</i> sp.(1-02) | 87.33                                                                                         | 4.94    | 87.34   | 65.23   | 48.40   |

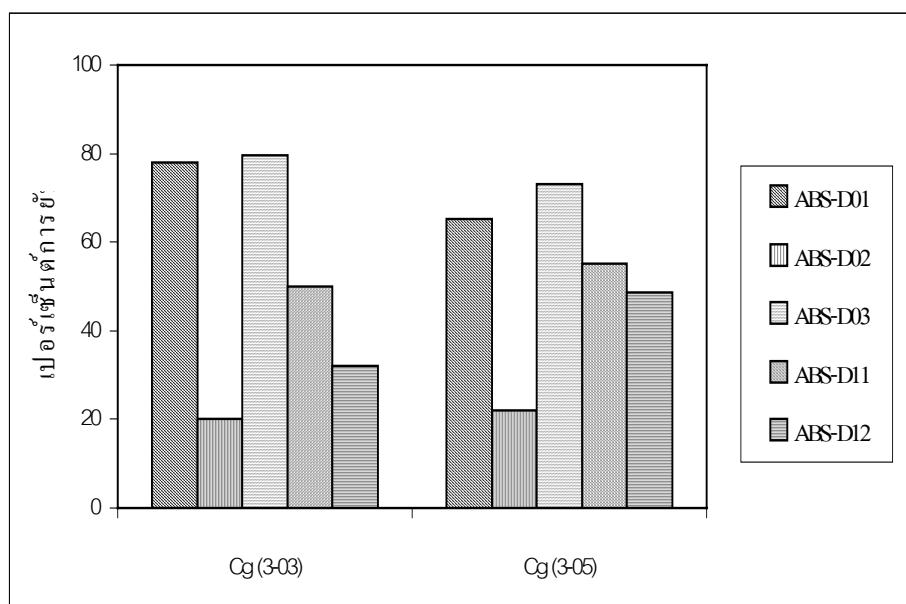


รูปที่ 6 แผนภูมิเปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Phomopsis* sp. ของน้ำเลี้ยงเชื้อ *B.subtilis* 5 สายพันธุ์ (ABS-D01, D02, D03, D11, และ D12) ที่เจือจาง 64 เท่า



ตารางที่ 14 ผลของน้ำเลี้ยงเชื้อ *B.subtilis* 5 สายพันธุ์ ที่ระดับความเข้มข้น 1:64 ต่อการยับยั้ง  
การเจริญของเชื้อรา *C.gloeosporioides*

| เชื้อรา                     | เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อราจากน้ำเลี้ยงเชื้อ <i>B.subtilis</i><br>เจือจาง 64 เท่า |         |         |         |         |
|-----------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|---------|---------|---------|---------|
|                             | ABS-D01                                                                                       | ABS-D02 | ABS-D03 | ABS-D11 | ABS-D12 |
| <i>C.gloeosporio</i> (3-03) | 78.06                                                                                         | 20.05   | 79.51   | 50.13   | 31.94   |
| <i>C.gloeosporio</i> (3-05) | 65.27                                                                                         | 22.14   | 73.18   | 55.18   | 48.64   |



รูปที่ 7 แผนภูมิเปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C.gloeosporioides*  
(3-03, 3-05) ของน้ำเลี้ยงเชื้อ *B.subtilis* 5 สายพันธุ์ (ABS-D01, D02, D03, D11,  
และ D12) ที่ระดับเจือจางความเข้มข้น 64 เท่า

### 3. การทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่มีศักยภาพสูงต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา

เมื่อนำสารสกัดหยาบของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิด มาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเส้นใยราในสไลด์หลุม เพื่อหาค่า  $EC_{50}$  ได้ผลดังตารางที่ 15 สารสกัดหยาบจาก ABS-D12, ABS-D11 และ ABS-D01 มีฤทธิ์ยับยั้ง *P. palmivora* สายพันธุ์จันทบุรี, T1 และ T2 ตามลำดับได้ดีที่สุด ABS-D02 ยับยั้ง *L. theobromae* ทั้ง 2 สายพันธุ์ได้ดีที่สุด และ ABS-D12 ยับยั้ง *Phomopsis* sp. ทั้ง 2 สายพันธุ์ และ *C. gloeosporioides* ทั้งสองสายพันธุ์ได้ดีที่สุด โดยที่สารสกัดหยาบจาก ABS-D12 มีค่าเฉลี่ยของ  $EC_{50}$  ต่ำกว่าทั้ง 9 ไอโซเลตต่ำที่สุด เท่ากับ 115.9  $\mu\text{g/ml}$  รองลงมาได้แก่ ABS-D02 และ ABS-D01 ซึ่งมีค่าเฉลี่ยของ  $EC_{50}$  ใกล้เคียงกัน คือ 132.0 และ 136.0  $\mu\text{g/ml}$  ตามลำดับ ส่วนสารสกัดหยาบ ABS-D11 มีค่าเฉลี่ย 206.7  $\mu\text{g/ml}$  และสารสกัดหยาบ ABS-D03 มีค่าเฉลี่ยมากที่สุดเท่ากับ 944.7  $\mu\text{g/ml}$

ตารางที่ 15 ค่า  $EC_{50}$  ของสารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียต่อการเจริญของสายรา

| เชื้อรา                          | ค่า $EC_{50}$ ของสารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย ( $\mu\text{g/ml}$ ) |         |         |         |         |
|----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|---------|---------|---------|---------|
|                                  | ABS-D01                                                                     | ABS-D02 | ABS-D03 | ABS-D11 | ABS-D12 |
| <i>P. palmivora</i> (จันทบุรี)   | 231.0                                                                       | 64.4    | 547.0   | 730.0   | 31.0    |
| <i>P. palmivora</i> (T1)         | 180.0                                                                       | 325.0   | 179.0   | 138.0   | 236.0   |
| <i>P. palmivora</i> (T2)         | 345.0                                                                       | 544.0   | 538.0   | >800    | 665.0   |
| <i>L. theobromae</i> (2-01)      | 27.9                                                                        | 28.9    | >2,000  | 43.0    | <12.5   |
| <i>L. theobromae</i> (2-03)      | 139.0                                                                       | 29.0    | 1,540   | 64.0    | 48.0    |
| <i>Phomopsis</i> sp.(1-01)       | 58.0                                                                        | 26.0    | 555.0   | 20.0    | 8.0     |
| <i>Phomopsis</i> sp.(1-02)       | 49.0                                                                        | 11.0    | >2,000  | <12.5   | <12.5   |
| <i>C. gloeosporioides</i> (3-03) | 64.0                                                                        | 28.9    | 167.0   | 16.0    | 18.0    |
| <i>C. gloeosporioides</i> (3-05) | 130.0                                                                       | 131.0   | 976.0   | 36.7    | 12.4    |
| ค่าเฉลี่ย                        | 136.0                                                                       | 132.0   | 944.7   | 206.7   | 115.9   |

จากการทดสอบผลของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียพบว่า ABS- D01, ABS- D03 และ ABS- D11 สามารถยับยั้ง *P. palmivora* ได้ดีใกล้เคียงกัน ABS- D02 ยับยั้งได้ปานกลาง และ ABS- D12 ยับยั้งได้ต่ำสุด แต่ ABS- D12 ยับยั้ง *L. theobromae* ได้ดีที่สุด นอกจากนี้ ABS- D01 และ ABS- D03 ยังยับยั้ง *Phomopsis* sp. และ *G. gloeosporioides* ได้ดีอีกด้วย สำหรับ ABS- D02 นั้นพบว่าสารสกัดหยาบมีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *L. theobromae* และ *Phomopsis* sp. โดยมีค่า  $EC_{50}$  ต่ำสุด ดังนั้นจึงนำเชื้อทั้ง 5 สายพันธุ์มาผสมกันเพื่อให้มีประสิทธิภาพครอบคลุมในการยับยั้งเชื้อก่อโรคทั้งหมดในการทดลองขั้นต่อไป

#### 4 การทดสอบปฏิกิริยาปฏิสัมพันธ์ระหว่างเชื้อแบคทีเรีย *B.subtilis* ทั้ง 5 สายพันธุ์

ไม่พบปฏิกิริยาปฏิสัมพันธ์ระหว่าง *B.subtilis* ทั้งห้าสายพันธุ์ดังในตารางด้านล่างบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อจึงสามารถใช้ผสมร่วมกันสำหรับทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งโรคที่เกิดจากเชื้อราโรคผลเน่าโดยใช้ *L.theobromae* บนผลทุเรียน

ผลการทดลอง

| เชื้อ <i>B.subtilis</i><br>ที่เกลี่ยบนอาหาร<br>LA | วงใส (inhibition zone) บริเวณหลุมที่ได้เชื้อ <i>B.subtilis</i> สายพันธุ์ต่างๆ |         |         |         |         |
|---------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|---------|---------|---------|---------|
|                                                   | ABS-D01                                                                       | ABS-D02 | ABS-D03 | ABS-D11 | ABS-D12 |
| ABS-D01                                           | ND                                                                            | -       | -       | -       | -       |
| ABS-D02                                           | -                                                                             | ND      | -       | -       | -       |
| ABS-D03                                           | -                                                                             | -       | ND      | -       | -       |
| ABS-D11                                           | -                                                                             | -       | -       | ND      | -       |
| ABS-D12                                           | -                                                                             | -       | -       | -       | ND      |

ND = ไม่ต้องทดสอบ,

- = ไม่เกิดวงใส

5. การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเกิดโรคผลเน่าบนผลทุเรียนจากเชื้อรา *L.theobromae* (2-03) โดยเชื้อแบคทีเรีย *B.subtilis* และสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย เปรียบเทียบกับสารเคมี (imazalil)

จากการทดสอบประสิทธิภาพของสาร imazalil 500 ppm, น้ำเชื้อของ *B.subtilis* 5 สายพันธุ์ และสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *B.subtilis* 5 สายพันธุ์ ในการยับยั้งการเกิดโรคผลเน่าของทุเรียนที่เกิดจากเชื้อ *L.theobromae* โดยใช้ไอโซเลท 2-03 ซึ่งก่อโรครุนแรงสูงสุดเมื่อปลูกเชื้อบนผลทุเรียน พบว่าสารทั้ง 3 ชนิดมีประสิทธิภาพในการยับยั้งและป้องกันการเข้าทำลายของเชื้ออย่างมีนัยสำคัญ โดยสารที่มีคุณสมบัติดีที่สุดคือ imazalil 500 pm. รองลงมาคือสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อของ *B.subtilis* 5 สายพันธุ์ และน้ำเชื้อของ *B.subtilis* 5 สายพันธุ์ตามลำดับ (ตารางที่ 17)

และเมื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบ (orthogonal contrast analysis) ในแต่ละกรรมวิธีพบว่า ประสิทธิภาพของสารทั้ง 3 ในการยับยั้งการเกิดโรค เมื่อทำการปลูกเชื้อก่อนแล้วจึงจุ่มสารให้ผลไม่แตกต่างจากชุดควบคุม (ตารางที่ 18) ในขณะที่หากจุ่มสารแต่ละชนิดก่อนแล้วจึงปลูกเชื้อพบว่าแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญแสดงว่าในการใช้สารทั้ง 3 ชนิด ควรใช้ก่อนที่จะมีการเข้าทำลายของเชื้อ ส่วนการเปรียบเทียบความรุนแรงของการเกิดโรคในชุดควบคุมที่ทำการปลูกเชื้อก่อนและหลังจากจุ่มเชื้อในน้ำให้ผลแตกต่างกันอย่างชัดเจน โดยผลทุเรียนที่จุ่มน้ำก่อนแล้วปลูกเชื้อเกิดโรครุนแรงมาก ทั้งนี้อาจเนื่องจากความชื้นที่ยังคงตกค้างอยู่ที่ผิวส่งเสริมให้เชื้อราเจริญได้ดี ในขณะที่กรรมวิธีที่ใช้สารแต่ละชนิดระดับการเกิดโรคไม่แตกต่างกัน

และเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสาร imazalil 500 ppm. ต่อน้ำเชื้อ และสารสกัดจากเชื้อพบว่าในกรณีที่จุ่มสารก่อนปลูกเชื้อให้ผลแตกต่างที่ระดับ 95 เปอร์เซนต์ ส่วนการปลูกเชื้อก่อนจุ่มสารให้ผลแตกต่างที่ระดับ 99 เปอร์เซนต์ ซึ่งสอดคล้องกับการเปรียบเทียบเวลาในการปลูกเชื้อหรือการเข้าทำลายของเชื้อว่า หากเชื้อเข้าทำลายก่อนแล้ว การเกิดโรคจะรุนแรงกว่า ประสิทธิภาพของสารในการยับยั้งจะลดลงและจากการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของน้ำเชื้อและสารสกัดจากเชื้อในการยับยั้งการเกิดโรคในผลทุเรียนให้ผลไม่แตกต่างกัน

และเมื่อทำการศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งหรือลดความรุนแรงการเกิดโรคโดยวิเคราะห์จากเปอร์เซ็นต์ของการเกิดโรคพบว่า การปลูกเชื้อแล้วจุ่มในสาร imazalil 500 ppm. ให้ผลดีที่สุด รองลงมาคือการจุ่มสาร imazalil 500 ppm. แล้วปลูกเชื้อโดยไม่แตกต่างกันทางสถิติ ลำดับที่ 3 คือ การให้สารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อ *B.subtilis* 5 สายพันธุ์ แล้วจึงปลูกเชื้อ (ตารางที่ 19, 20) ซึ่งผลการทดลองไม่แตกต่างกันในทางสถิติกิจกรรมวิธีการให้สาร imazalil แล้วจึงปลูกเชื้อ ในขณะที่ทั้ง 3 กรรมวิธีนี้แตกต่างจากกรรมวิธีอื่นอย่างมีนัยสำคัญใกล้เคียงกับการวิเคราะห์โดยศึกษาจากระดับความรุนแรงของการเกิดโรค

ตารางที่ 17 ค่าเฉลี่ยของผลอาการผลเน่าจากการปลูกเชื้อ *L.theobromae* (2-03) และจุ่มด้วยสารต่าง ๆ

| กรรมวิธี                  | ค่าเฉลี่ยของแผล (มม.) |
|---------------------------|-----------------------|
| T2 จุ่มน้ำ ปลูกเชื้อ      | 57.905 A              |
| T7 ปลูกเชื้อ สารสกัด      | 30.839 B              |
| T5 ปลูกเชื้อ น้ำเชื้อ     | 27.140 B              |
| T1 ปลูกเชื้อ น้ำ          | 24.729 B              |
| T6 น้ำเชื้อ ปลูกเชื้อ     | 24.315 B              |
| T8 สารสกัด ปลูกเชื้อ      | 11.676 B C            |
| T3 ปลูกเชื้อ สาร imazalil | 4.367 C               |
| T4 สาร imazalil ปลูกเชื้อ | 1.098 C               |

ตัวอักษรที่เหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ด้วย DMRT

ตารางที่ 18 ค่าวิเคราะห์เปรียบเทียบความรุนแรงของอาการผลเน่าจากการปลูกเชื้อ *L.theobromae* (2-03) และจุ่มด้วยสารต่าง ๆ

| Source    | DF  | SS           | MS          | F     | Pr>F   |
|-----------|-----|--------------|-------------|-------|--------|
| Treatment | (3) | 18981.29134  |             |       |        |
| T1 VS T2  | 1   | 16501.41168  | 16501.41168 | 13.90 | 0.0002 |
| T3 VS T8  | 1   | 801.46840    | 801.46840   | 0.68  | 0.4121 |
| T4 VS T8  | 1   | 1678.41126   | 1678.41126  | 1.41  | 0.2356 |
| Error     | 232 | 275362.20246 | 1186.90605  |       |        |
| Total     | 239 | 343033.46275 |             |       |        |

ตารางที่ 19 เปอร์เซ็นต์ของการเกิดโรคผลเน่าของทุเรียนจากการปลูกเชื้อ *L.theobromae* (2-03) และจุ่มด้วยสารต่าง ๆ

| กรรมวิธี                  | เปอร์เซ็นต์ของการเกิดโรค |   |   |
|---------------------------|--------------------------|---|---|
| T2 จุ่มน้ำ ปลูกเชื้อ      | 93.3                     | A |   |
| T1 ปลูกเชื้อ น้ำ          | 86.7                     | B | A |
| T7 ปลูกเชื้อ สารสกัด      | 70                       | B | A |
| T6 น้ำเชื้อ ปลูกเชื้อ     | 70                       | B | A |
| T5 ปลูกเชื้อ น้ำเชื้อ     | 63.3                     | B | A |
| T8 สารสกัด ปลูกเชื้อ      | 40                       |   | C |
| T4 สาร imazalil ปลูกเชื้อ | 26.7                     | D | C |
| T3 ปลูกเชื้อ สาร imazalil | 13.3                     | D |   |

ตัวอักษรที่เหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดย DMRT

ตารางที่ 20 ค่าวิเคราะห์เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ของการเกิดโรคผลเน่าของทุเรียนจากการปลูกเชื้อ *L.theobromae* (2-03) และจุ่มด้วยสารต่าง ๆ

| Source    | DF  | SS           | MS          | F     | Pr>F   |
|-----------|-----|--------------|-------------|-------|--------|
| Treatment | (3) | 18981.29134  |             |       |        |
| T1 VS T2  | 1   | 16501.41168  | 16501.41168 | 13.90 | 0.0002 |
| T3 VS T8  | 1   | 801.46840    | 801.46840   | 0.68  | 0.4121 |
| T4 VS T8  | 1   | 1678.41126   | 1678.41126  | 1.41  | 0.2356 |
| Error     | 232 | 275362.20246 | 1186.90605  |       |        |
| Total     | 239 | 343033.46275 |             |       |        |

## 6 ประสิทธิภาพของสารในการยับยั้งการเกิดโรคผลเน่าจากเชื้อ *L.theobromae* ที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ

จากการทดสอบประสิทธิภาพของสาร imazalil 500 ppm. เชื้อผสมของ *B.subtilis* 5 สายพันธุ์และสารสกัดจาก *B.subtilis* 5 สายพันธุ์ในการยับยั้งการเกิดโรคผลเน่าของเชื้อ *L.theobromae* ที่เกิดตามธรรมชาติ (ตารางที่ 21) พบว่าสารทั้ง 3 ชนิดมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคได้ระดับหนึ่ง โดยน้ำเลี้ยงเชื้อมีประสิทธิภาพสูงสุดสามารถลดการเกิดโรคได้ 50 เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม รองลงมาคือสาร imazalil และสารสกัดซึ่งให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติกับชุดควบคุมซึ่งจุ่มแช่น้ำ โกล้เคียงกับการทดสอบประสิทธิภาพของสารทั้ง 3 ชนิดในการยับยั้งการเกิดโรคผลเน่าโดยการปลูกเชื้อ *L. theobromae* (2-03) ก่อนแล้วจึงจุ่มสารซึ่งพบว่าเชื้อ *B.subtilis* ให้ผลการทดลองที่ดีกว่าการใช้สารสกัดเล็กน้อย อนึ่งการทดสอบประสิทธิภาพของสารทั้ง 3 ชนิดในการควบคุมการเกิดโรคผลเน่าซึ่งมีการติดเชื้อตามธรรมชาติครั้งนี้ทำการทดลองกรรมวิธีละ 30 ผล อีกทั้งของการเกิดโรคตามธรรมชาติค่อนข้างน้อยเพียง 26.68 เปอร์เซ็นต์จึงควรทำการทดสอบเพิ่มเติมโดยใช้จำนวนผลทุเรียนมากกว่านี้

จากการวิเคราะห์ประสิทธิภาพของสารทั้ง 3 ชนิดในการลดความรุนแรงของโรคและการยับยั้งการเกิดโรคของเชื้อ *L. theobromae* (2-03) พบว่าสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *B.subtilis* 5 สายพันธุ์มีศักยภาพสูงในการลดความรุนแรงและยับยั้งการเกิดโรคโดยมีประสิทธิภาพต่ำกว่า imazalil เล็กน้อย โดยต้องให้สารสกัดนี้ในระยะที่ผลกำลังเจริญก่อนที่จะพืชถูกเชื้อเข้าทำลาย หากเชื้อเข้าทำลายแล้วประสิทธิภาพของสารนี้ลดลง ในทางปฏิบัติจึงควรฉีดพ่นในแปลงก่อนการเก็บเกี่ยว ในขณะที่เชื้อ *B.subtilis* 5 สายพันธุ์ค่อนข้างมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคผลเน่าที่ติดเชื้อตามธรรมชาติ

**ตารางที่ 21** เปอร์เซ็นต์ของการเกิดโรคผลเน่าของทุเรียนจากเชื้อ *L.theobroma* ตามธรรมชาติ หลังจากจุ่มในสารต่าง ๆ

| กรรมวิธี                                                | เปอร์เซ็นต์ของการเกิดโรค |     |
|---------------------------------------------------------|--------------------------|-----|
| น้ำ                                                     | 26.68                    | A   |
| สารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ <i>B. subtilis</i> 5 สายพันธุ์ | 23.34                    | A B |
| สารเคมี imazalil 500 ppm.                               | 16.66                    | C B |
| เชื้อ <i>B. subtilis</i> 5 สายพันธุ์                    | 13.32                    | C   |

ตัวอักษรที่เหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์โดย DMRT

## สรุปผลการวิจัย

เชื้อ *B.subtilis* ที่คัดเลือกจากดินและที่ได้จากโครงการ “ การพัฒนา Antagonist *B.subtilis* สำหรับควบคุมโรคข้าว” จำนวน 23 สายพันธุ์จากทั้งหมด 140 สายพันธุ์ที่แสดงปฏิกิริยาปฏิปักษ์บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อต่อเชื้อราโรคโคนและรากเน่า (*P.palmivora*) สายพันธุ์ที่แยกได้จากสวนทุเรียน จ. ชุมพร 2 ไอโซเลต และจากสวน จ. จันทบุรี 1 ไอโซเลต และเชื้อรากุ่มผลเน่า (*L.theobromae*, *Phomopsis* sp., *C.gloeosporioides*) อย่างละ 2 ไอโซเลต ผลการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งของสารออกฤทธิ์ในน้ำเลี้ยงเชื้อของ *B.subtilis* ที่คัดเลือกได้ต่อการเจริญของสายราทั้งสองกลุ่ม พบว่าเมื่อเจือจางไป 4 เท่า *B.subtilis* สายพันธุ์ ABS-D01, ABS-D03, ABS-D11, ABS-D02 และ ABS-D12 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P.palmivora* ทั้ง 3 ไอโซเลตได้ดีตามลำดับ (92-100%), (91-99%), (87-99%), (54-77%) และ (34-49%) ในขณะที่เชื้อรากุ่มโรคผลเน่าจะถูกยับยั้งได้สูงกว่าเชื้อราโรคโคนและรากเน่า เมื่อพิจารณาจากค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์เมื่อเจือจางน้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ดังกล่าวเป็น 64 เท่า ศักยภาพการยับยั้งของเชื้อ *B.subtilis* ทั้ง 5 สายพันธุ์ต่อการเจริญของสายราสาเหตุโรคทั้งสองกลุ่มชัดเจนยิ่งขึ้น เมื่อได้ค่า  $EC_{50}$  ของสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียซึ่งทดสอบบนสไลด์หลุม โดยเชื้อ *B.subtilis* ABS-D12 จะแสดงค่า  $EC_{50}$  เฉลี่ยต่อการยับยั้งเชื้อราทั้ง 9 ไอโซเลต เท่ากับ 115.9  $\mu\text{g/ml}$  และไม่พบปฏิกิริยาระหว่างสายพันธุ์ *B.subtilis* ทั้งห้าบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งทำให้สามารถใช้ร่วมกันได้เป็นการช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งให้ครอบคลุมเชื้อราทั้งสองกลุ่มได้มากที่สุด

การทดสอบความรุนแรงของเชื้อ *L.theobromae* ที่ปลูกบนทุเรียน ไอโซเลต Lt 2-03 ก่อโรคได้รุนแรงมาก และเมื่อเปรียบเทียบก่อนและหลังจากจุ่มแช่ในน้ำก็ให้ผลการเกิดโรคแตกต่างกันอย่างชัดเจน โดยผลทุเรียนที่จุ่มน้ำก่อนแล้วปลูกเชื้อเกิดโรครุนแรงได้สูงมากกว่าปลูกเชื้อแล้วจุ่มน้ำ จากการทดสอบประสิทธิภาพของสาร imazalil 500 ppm, เชื้อ *B.subtilis* 5 สายพันธุ์ และสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *B.subtilis* 5 สายพันธุ์ ในการยับยั้งหรือป้องกันการเกิดโรคผลเน่าที่เกิดจากปลูกเชื้อ *L.theobromae* (2-03) บนทุเรียนพบว่าแตกต่างกันเมื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบในแต่ละกรรมวิธี การยับยั้งการเกิดโรคเมื่อทำการปลูกเชื้อก่อนแล้วจึงจุ่มสารให้ผลไม่แตกต่างจากชุดควบคุม ในขณะที่หากจุ่มสารแต่ละชนิดก่อนแล้วจึงปลูกเชื้อพบว่าป้องกันการเกิดโรคได้แตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ โดย สาร imazalil 500 pm แสดงคุณสมบัติที่ดีที่สุด รองลงมาคือสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อของ *B.subtilis* 5 สายพันธุ์ และเชื้อ *B.subtilis* 5 สายพันธุ์ ซึ่งสอดคล้องกับผลที่ได้จากวิเคราะห์ระดับความรุนแรงของการเกิดโรค

การยับยั้งการเกิดโรคผลเน่าของเชื้อ *L. theobromae* ที่เกิดตามธรรมชาติพบว่าสารทั้ง 3 ชนิด มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคได้ระดับหนึ่งโดยสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อมีประสิทธิภาพสูงสุด สามารถลดการเกิดโรคได้ 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม รองลงมาคือสาร imazalil และสารสกัดซึ่งให้ผลไม่แตกต่างในทางสถิติกับชุดควบคุมซึ่งจุ่มแช่ในน้ำ ใกล้เคียงกับการทดสอบประสิทธิภาพ



ภาพของสารทั้ง 3 ชนิดในการยับยั้งการเกิดโรคผลเน่าโดยการปลูกเชื้อ *L. theobromae* (2-03) ก่อน แล้วจึงจุ่มสารซึ่งพบว่าเชื้อ *B.subtilis* ให้ผลการทดลองที่ดีกว่าการใช้สารสกัดเล็กน้อย

กล่าวโดยสรุปจากการวิเคราะห์ประสิทธิภาพในการลดความรุนแรงของโรคและการยับยั้งการเกิดโรคของเชื้อ *L.theobromae* (2-03) พบว่าสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *B.subtilis* 5 สายพันธุ์ มีศักยภาพสูง ในการลดความรุนแรงและยับยั้งการเกิดโรคโดยมีประสิทธิภาพต่ำกว่า imazalil เล็กน้อย หากมีการพัฒนาเพิ่มประสิทธิภาพจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อเกษตรกร

## เอกสารอ้างอิง

วิจิตรา จูติดำรงคัมพันธ์ และคณะ (2542) “ การพัฒนา Antagonist *Bacillus subtilis* สำหรับควบคุมโรคข้าว” การประชุมสัมมนาทางวิชาการ สารชีวอินทรีย์กำจัดศัตรูพืชในศตวรรษที่ 21 โดยสมาคมกีฏและสัตววิทยาแห่งประเทศไทย ฯ หน้า 50 -60.

สมศิริ แสงโชติ (2539) โรคของทุเรียนภายหลังการเก็บเกี่ยว ในการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่ 34. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ ฯ หน้า 148 – 152.

เอียน ศิลาชัย (2536) “ โรคพืชไม้ผล สมุนไพร และการป้องกันกำจัด ” กรมวิชาการเกษตร.

Erwin, D.C. and Ribeiro, O.K. (1996) *Phytophthora Diseases Worldwide*, APS Press, the American Phytopathological Society, Minnesota, U.S.A.

Gamliel, A., Katan, J. and Cohen, E. (1989) Toxicity of chloronitrobenzenes to *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani* as related to their structure. *Phytoparasitica*, 17: 101-105.

Jutidamrongphan, W., Phongpaichit, S. Kaewprom, S., Nilrattana, L. and Charigkapakorn, N. (1994). Production and Effects on Fungal Growth Inhibition of Biocative Products of Antagonist *Bacillus subtilis*. In the 11<sup>th</sup> FAOBMB symposium, Bangkok, p.156 (Nov 15-18).

Jutidamrongphan, W. (1996) Biological Control of Plant Diseases by Antagonistic Microorganisms. Proceeding in the Second Thai-French Symposium on “Plant Molecular Biology”, Bordeaux, France, p.349-360 (Oct 6-10).

Mckeen, C.D., Reilly, C.C. and Pusey, P.L. (1986) Production and partial characterization of antifungal substances antagonistic to *Monilinia fructicola* from *Bacillus subtilis*. *Phytopathol.* 76, 136-139.

Masago, H. *et.al.* (1977) Selective inhibition of *Pythium* spp. on a medium for direct isolation of *Phytophthora* spp. from and plants. *Phytopathol.* 67 : 425 – 428.

Picman, A.K., Schneider, E.F. and Gershenzon, J. (1990) Antifungal activities of sunflower terpenoids. *Biochem. Sys. Ecol.* 18 : 325 - 328.

Pongpisutta, R. and Sangchote, S. (1994) *Phytophthora* fruit rot of durian (*Durio zibethinus* L.) in Champ, B.R., Highley, E. and Johnson, Q.I. ed. Postharvest handling of tropical fruit proceeding of an international conference held in Chiangmai, Thailand, 19 – 23 July 1993 ACIAR Proceedings No 460-461.

Ribeiro, O.K. (1978) A Source Book of the Genus *Phytophthora* Strauss & Cramer, Germany, 417 pp.

Sandrin, C., Peypoux, F. and Michel, G. (1990) Coproduction of Surfactin and Iturin A, Lipopeptides with Surfactant and Antifungal Properties, by *Bacillus subtilis*. Applied Biochem. 12 : 370-375.

Sinclair, J.B.(1989) *Bacillus subtilis* as a biocontrol agent for plant diseases. Perspectives in Phytopatho. 367-374.

Tuite, J. 1969. Plant Pathological methods, Fungi and bacteria, Burgess Publishing Company, Minneapolis, Minn. pp. 239.

Van Driesche, R.G and Bellows, T.S. Jr. (1996) Biological Control, Chapman & Hall, U.S.A.

## ภาคผนวก

การทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ *B.subtilis* ต่อการควบคุมโรคผลเน่าที่เกิดจากเชื้อรา *P. palmivora* บนผลทุเรียน

โดยความร่วมมือระหว่างคณะวิจัย กับ รศ ดร. สมศิริ แสงโชติภาควิชาโรคพืช

คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน

### วิธีการทดลอง

#### 1. การเตรียมเชื้อและสารสกัด

##### 1.1 การเตรียมเชื้อรา *P. palmivora*

นำ isolate ของเชื้อรา *P. palmivora* ซึ่งเป็นเชื้อที่แยกมาได้จากผลทุเรียนที่เป็นโรค ที่เก็บรวบรวมไว้ที่ หน่วยตรวจสอบโรคผลิตผลเกษตรและเมล็ดพันธุ์ ภาควิชาโรคพืช มาเลี้ยงลงบนอาหาร V-8 juice agar เป็นระยะเวลา 7 วัน ภายใต้แสง near ultraviolet สลับมืด 12 ชม. เป็นระยะเวลา 7 วัน จากนั้นนำเอาจานเลี้ยงเชื้อที่ได้มาล้างเอา sporangia โดยการ เอาน้ำกลั่นหนึ่งชาม เชื้อแล้วใส่ลงในจานเลี้ยงเชื้อดังกล่าว แล้วขูดที่ผิวหน้าเบาๆ ด้วยแท่งแก้วเพื่อให้ sporangia หลุดออกมา แล้วจึงรวบรวมน้ำที่ได้มารองผ่านผ้าขาวบาง น้ำกรองที่ได้จะใช้สำหรับการปลูกเชื้อต่อไป

##### 1.2 เตรียมเชื้อแบคทีเรีย *B.subtilis* และสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *B.subtilis*

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *B.subtilis* สายพันธุ์ที่ให้ผลการยับยั้งเชื้อราก่อโรคผลเน่าทุเรียนได้ดีจากการทดลองบนอาหารวุ้น ได้แก่เชื้อ ABS-D01, ABS-D02, ABS-D03, ABS-D11 และ ABS-D12 ในอาหารเหลว และเตรียมสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อตามวิธีในข้อ VI (1.1 และ 1.2)

### การทดลอง แบ่งออกเป็น 2 แบบ

แบบที่ 1 ปลูกเชื้อบนผลทุเรียนทุกกลุ่มด้วยวิธีฉีดพ่นสารแขวนลอย sporangium ของเชื้อ *P.palmivora* 12,000 sporangim/cm<sup>2</sup> บ่มไว้ในสภาพที่มีความชื้นสูง (มากกว่า 98%) เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง แล้วจึงนำมาจุ่มใน (1) น้ำ (2) เชื้อแบคทีเรียแขวนลอย *B.subtilis* (3) สารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *B.subtilis* และ (4) สารเคมี fosetyl-AI ความเข้มข้น 2,000 ppm นาน 3 นาที โดยไม่ใช้สารจับใบบ่มทุเรียนภายใต้ความชื้นพอเหมาะ จนกระทั่งแสดงอาการของโรค วางแผนการทดลองแบบ CRD โดยใช้ผลทุเรียน 50 ผล ต่อการทดลอง ( 10 ผลต่อซ้ำ)

แบบที่ 2 จุ่มผลทุเรียนแต่ละกลุ่มใน (1) น้ำ (2) เชื้อแบคทีเรียแขวนลอย *B.subtilis* (3) สารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *B.subtilis* และ (4) สารเคมี fosetyl-AI ความเข้มข้น 2,000 ppm นาน 3 นาที โดยไม่มีสารจับใบแล้วจึงปลูกเชื้อต่อไปด้วยการฉีดพ่น sporangium ของเชื้อ *P.palmivora* 12,000 sporngim/cm<sup>2</sup> โดยไม่ใช้สารจับใบบ่มทุเรียนภายใต้ความชื้นพอเหมาะ จน



## บทความสำหรับเผยแพร่

### โครงการ “ การขยายผลการใช้จุลินทรีย์ *Bacillus subtilis* สำหรับการควบคุมโรคไม้ผล

#### (I) ควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคโคนและรากเน่าและกลุ่มราโรคผลเน่าของทุเรียน

คณะวิจัย : ผศ.ดร. วิจิตรา ลีละสุภกุล\* รศ.ดร. เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร\*\* และ ผศ. เสมอใจ ชื่นจิตต์\*\*\*

\*ภาควิชาชีวเคมี \*\*ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ \*\*\*ภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ. สงขลา 90112 โทรศัพท์/โทรสาร 074 – 446420, 446656

e-mail : [jwichitr@ratree.psu.ac.th](mailto:jwichitr@ratree.psu.ac.th)

สนับสนุน โดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

จุลินทรีย์ *B.subtilis* เป็นสารควบคุมชีวภาพที่มีผู้สนใจนำมาใช้ในการป้องกันกำจัดโรคแทนสารเคมีที่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภคและลดการปนเปื้อนต่อสิ่งแวดล้อม โครงการ”การพัฒนา Antagonist *B.subtilis* สำหรับควบคุมโรคข้าว” ได้รวบรวมจุลินทรีย์ *B.subtilis* สายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการควบคุมโรคจากเชื้อราและแบคทีเรียของพืช คณะผู้วิจัยจึงมีจุดมุ่งหมายที่ต้องการนำสายพันธุ์เหล่านี้และค้นหาสายพันธุ์เพิ่มเติมเพื่อขยายผลในการควบคุมโรคเชื้อราของพืชเศรษฐกิจของประเทศไทยโดยเฉพาะทุเรียน ซึ่งปัญหาโรคที่สำคัญและพบมากที่สุดคือโรคโคนและรากเน่าอันเกิดจากเชื้อรา *Phytophthora palmivora* (Butler) เป็นสาเหตุทำให้ต้นทุเรียนตายในขณะที่ยังผลเน่าของทุเรียนที่พบอยู่เสมอจากเชื้อราสาเหตุคือ *Lasiodiplodia theobromae*, *Phomopsis* sp. และ *Collectotricum gloeosporioides* ที่มีผลกระทบต่อยาได้ของเกษตรกรชาวสวนทุเรียนเป็นอย่างสูง เชื้อราทั้งสองกลุ่มนี้ สามารถแพร่ระบาดไปกับน้ำ ลมและแมลงก็เป็นพาหะนำโรคได้อย่างดี การใช้สารเคมีจะควบคุมโรคได้ระยะหนึ่งแต่เมื่อใช้บ่อยครั้งก็จะทำให้โรคดื้อยา และการจุ่มผลทุเรียนในสารเคมีก่อนส่งออกขายในตลาดส่งผลให้ผู้บริโภคมีโอกาสที่จะได้รับอันตราย รวมทั้งระดับมาตรฐานของสารเคมีตกค้างในผลไม้ที่ส่งออกไปยังต่างประเทศก็เป็นข้อจำกัดอันหนึ่งที่ช่วยป้องกันการปนเปื้อนของสารเคมีในผลิตภัณฑ์ที่ส่งออก ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะมุ่งเน้นการประยุกต์ใช้สารออกฤทธิ์ควบคุมเชื้อราที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ *B.subtilis* ซึ่งมีความปลอดภัยสูง สำหรับป้องกันโรคเชื้อราที่สำคัญดังกล่าวตั้งแต่ระยะที่ปลูกจนกระทั่งควบคุมโรคหลังเก็บเกี่ยวทุเรียนด้วย

**วัตถุประสงค์:** หาสายพันธุ์ *B.subtilis* ที่แสดงศักยภาพดีต่อการเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคโคนและรากเน่าและผลเน่าของทุเรียน หาคำแนะนำการออกฤทธิ์และทดสอบประสิทธิภาพในระดับห้องปฏิบัติการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อราของสารที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *B.subtilis* ต่อโรคผลเน่าของผลทุเรียน

**การดำเนินการศึกษา:** คัดแยกสายพันธุ์จุลินทรีย์ *B.subtilis* จากชนิดอื่นๆ จากตัวอย่างดินที่เก็บจากสวนทุเรียนให้บริสุทธิ์ และคัดแยกเฉพาะสายพันธุ์ที่แสดงปฏิกิริยาต่อต้านเชื้อราทั้งสองกลุ่ม ซึ่งแยกได้จากสวนทุเรียนแถบภาคใต้และภาคตะวันออก ทดสอบประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อหรือสารออกฤทธิ์ที่จุลินทรีย์ *B.subtilis* ผลิตและปล่อยออกมาในอาหารเหลว โดยเจือจางอย่างเป็นลำดับและผสมกับอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อรา และตรวจดูการเจริญของเชื้อราบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารออกฤทธิ์ คัดเลือกจุลินทรีย์ *B.subtilis* ที่ให้ผลดีในการยับยั้งจำนวน 5 สายพันธุ์ แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารเหลวที่เหมาะสมจำนวนมาก เพื่อสกัดสารออกฤทธิ์อย่างหยาบ ซึ่งเป็นสารจำพวกสารปฏิชีวนะ และทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราทั้งสองกลุ่ม จำนวน 9 ไอโซเลต หาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งแล้วนำมาคำนวณหาความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ 50 % คือค่า Effective concentration ( $EC_{50}$ ) เพื่อยืนยันผลที่แน่นอนได้ในระดับหนึ่ง จึงทำการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *B.subtilis* ในอาหารเหลวอย่างง่ายมีต้นทุนต่ำในปริมาณมาก ทำสารออกฤทธิ์ในอาหารเหลวที่เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ให้เข้มข้น แล้วนำมาทดสอบกับผลทุเรียนจากสวน ซึ่งไม่มีการใช้สารเคมีกำจัดโรคพืชหรือแมลง ปลุกเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่า (*L.theobromae* สายพันธุ์ 2-03) วางแผนการทดลองแบบ CRD 8 กรรมวิธี. กลุ่มที่ 1 ทำการปลุกเชื้อราให้ติดผลก่อนเป็นเวลา 9 ชั่วโมง แล้วจึงจุ่มสาร กลุ่มที่ 2 ทำการจุ่มสารแต่ละชนิดได้แก่ น้ำ เซลล์ของ *B.subtilis* 5 สายพันธุ์ (ในน้ำเลี้ยงเชื้อ) และสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *B.subtilis* ผึ่งให้แห้งแล้วจึงทำการปลุกเชื้อ วัดขนาดของแผลทั้งแนวตั้งและแนวนอนของผลที่สูงเทียบกับที่จุ่มสารเคมี (imazalil) 500ppm และน้ำบันทึภาพและวิเคราะห์ผลทางสถิติ และเปรียบเทียบเฉพาะกลุ่ม (orthogonal contrast analysis) ในขณะเดียวกันนับจำนวนผลและแผลที่แสดงอาการโรค และวิเคราะห์ค่าเปอร์เซ็นต์ของการเกิดโรค

**ผลการทดลอง** เชื้อ *B.subtilis* ที่คัดเลือกจากดินและที่ได้จากโครงการ “การพัฒนา Antagonist *B.subtilis* สำหรับควบคุมโรคข้าว” จำนวน 23 สายพันธุ์จากทั้งหมด 140 สายพันธุ์ที่แสดงปฏิกิริยาปฏิปักษ์ชัดเจนบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อต่อเชื้อราโรคโคนและรากเน่า (*P.palmivora*) สายพันธุ์ที่แยกได้จากสวนทุเรียน จ. ชุมพร 2 ไอโซเลต และจากสวน จ. จันทบุรี 1 ไอโซเลต และเชื้อรากุ่มผลเน่า (*L.theobromae*, *Phomopsis* sp., *C.gloeosporioides*) อย่างละ 2 ไอโซเลต ผลการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งของสารออกฤทธิ์ในน้ำเลี้ยงเชื้อของ *B.subtilis* ที่คัดเลือกได้ต่อการเจริญของสายราทั้งสองกลุ่มดังตารางที่ 1 พบว่าเมื่อเจือจางไป 4 เท่า *B.subtilis* สายพันธุ์ ABS-D01, ABS-D03, ABS-D11, ABS-D02 และ ABS-D12 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. palmivora* ทั้ง 3 ไอโซ

เลตได้ดีตามลำดับ (92-100%), (91-99%), (87-99%), (54-77%) และ (34-49%) ในขณะที่เชื้อรากลุ่มโรคผลเน่าจะถูกยับยั้งได้สูงกว่าเชื้อราโรคโคนและรากเน่า เมื่อพิจารณาจากค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์จากการเจือจางน้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ดังกล่าวเป็น 64 เท่า ศักยภาพการยับยั้งของเชื้อ *B.subtilis* ทั้ง 5 สายพันธุ์ต่อการเจริญของสาหร่ายสาเหตุโรคทั้งสองกลุ่มชัดเจนยิ่งขึ้น เมื่อได้ค่า  $EC_{50}$  ของสารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียซึ่งทดสอบบนสไลด์หลุม (ตารางที่ 2) โดยเชื้อ *B.subtilis* ABS-D12 จะแสดงค่า  $EC_{50}$  เฉลี่ยต่อการยับยั้งเชื้อราทั้ง 9 ไอโซเลต เท่ากับ 116  $\mu\text{g/ml}$  และไม่พบปฏิกิริยาระหว่าง *B.subtilis* ทั้งห้าสายพันธุ์บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งทำให้สามารถใช้ร่วมกันได้เป็นการช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งให้ครอบคลุมเชื้อราทั้งสองกลุ่มได้มากที่สุด

จากผลการทดลองที่ได้เมื่อทดสอบในระดับห้องปฏิบัติการทำให้สามารถคัดเลือก *B. subtilis* จำนวน 5 สายพันธุ์เพื่อใช้ร่วมกันสำหรับทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเกิดโรคผลเน่าโดยใช้ *L.theobromae* 2-03 ซึ่งมีความรุนแรงสูงเมื่อปลูกเชื้อบนผลทุเรียน ระหว่าง imazalil 500 ppm, น้ำเลี้ยงเชื้อของ *B.subtilis* 5 สายพันธุ์ และสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *B.subtilis* 5 สายพันธุ์ พบว่าสารทั้ง 3 ชนิดมีประสิทธิภาพในการยับยั้งและป้องกันการเข้าทำลายของเชื้ออย่างมีนัยสำคัญ โดยสารที่มีคุณสมบัติที่ดีที่สุดคือ imazalil รองลงมาคือสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อของ *B.subtilis* 5 สายพันธุ์ และเชื้อของ *B.subtilis* 5 สายพันธุ์ตามลำดับ (ตารางที่ 3) และเมื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบในแต่ละกรรมวิธีพบว่าประสิทธิภาพของสารทั้ง 3 ในการยับยั้งการเกิดโรคเมื่อทำการปลูกเชื้อก่อนแล้วจึงจุ่มสารให้ผลไม่แตกต่างจากชุดควบคุม ในขณะที่หากจุ่มสารแต่ละชนิดก่อนแล้วจึงปลูกเชื้อพบว่าแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญแสดงว่าในการใช้สารทั้ง 3 ชนิด ควรใช้ก่อนที่จะมีการเข้าทำลายของเชื้อ ส่วนการเปรียบเทียบความรุนแรงของการเกิดโรคในชุดควบคุมที่ทำการปลูกเชื้อก่อนและหลังจากจุ่มแช่ในน้ำให้ผลแตกต่างอย่างชัดเจน โดยผลทุเรียนที่จุ่มน้ำก่อนแล้วปลูกเชื้อเกิดโรครุนแรงมาก ทั้งนี้ อาจเนื่องจากความชื้นที่ยังคงตกค้างอยู่ที่ผิวส่งเสริมให้เชื้อราเจริญได้ดี ในขณะที่กรรมวิธีที่ใช้สารแต่ละชนิดระดับการเกิดโรคไม่แตกต่างกัน และเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสาร imazalil 500 ppm. ต่อเชื้อ *B.subtilis* และสารสกัดจากเชื้อ *B.subtilis* พบว่าในกรณีที่จุ่มสารก่อนปลูกเชื้อให้ผลแตกต่างที่ระดับ 95 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการปลูกเชื้อก่อนจุ่มสารให้ผลแตกต่างที่ระดับ 99 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับการเปรียบเทียบเวลาในการปลูกเชื้อหรือการเข้าทำลายของเชื้อว่า หากเชื้อเข้าทำลายก่อนแล้ว การเกิดโรคจะรุนแรงกว่า ประสิทธิภาพของสารในการยับยั้งจะลดลง และจากการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของน้ำเชื้อและสารสกัดจากเชื้อในการยับยั้งการเกิดโรคในผลทุเรียนให้ผลไม่แตกต่างกัน และเมื่อทำการศึกษาศักยภาพในการยับยั้งหรือลดความรุนแรงการเกิดโรคโดยวิเคราะห์จากเปอร์เซ็นต์ของการเกิดโรค (ตารางที่ 4) พบว่าการปลูกเชื้อแล้วจุ่มในสาร imazalil. ให้ผลดีที่สุด รองลงมาคือ การจุ่มสาร imazalil. แล้วปลูกเชื้อโดยไม่แตกต่างกันทางสถิติ ลำดับที่ 3



คือการให้สารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* แล้วจึงปลูกเชื้อ ซึ่งผลการทดลองไม่แตกต่างกันในทางสถิติจากกรรมวิธีที่จุ่มสาร imazalil แล้วจึงปลูกเชื้อ ในขณะที่ทั้ง 3 กรรมวิธีนี้แตกต่างจากกรรมวิธีอื่นอย่างมีนัยสำคัญใกล้เคียงกับการวิเคราะห์โดยศึกษาจากระดับความรุนแรงของการเกิดโรคสรุป จากการวิเคราะห์ประสิทธิภาพในการลดความรุนแรงของโรคและการยับยั้งการเกิดโรคของเชื้อผลเน่า (*L.theobromae* 2-03) พบว่าเชื้อ *B.subtilis* 5 สายพันธุ์ที่ทดสอบ รวมทั้งสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อมีศักยภาพสูงในการลดความรุนแรงและยับยั้งการเกิดโรคโดยมีประสิทธิภาพต่ำกว่าสารเคมี imazalil เล็กน้อย หากมีการพัฒนาเพิ่มประสิทธิภาพของเชื้อ *B.subtilis* ก็จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อความปลอดภัยและต้นทุนการผลิตของเกษตรกรสวนทุเรียน

ตารางที่ 1 การยับยั้งการเจริญของเชื้อราจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *B.subtilis* ที่เจือจางความเข้มข้น

| เชื้อรา                                                                                    | เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อราจากน้ำเลี้ยงเชื้อ <i>B.subtilis</i> เจือจาง 4 เท่า |         |         |         |         |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|---------|---------|---------|---------|
|                                                                                            | ABS-D01                                                                                   | ABS-D02 | ABS-D03 | ABS-D11 | ABS-D12 |
| <i>Pp</i> (จันทบุรี)                                                                       | 92.39                                                                                     | 77.52   | 92.39   | 91.90   | 34.33   |
| <i>Pp</i> (T1)                                                                             | 100.00                                                                                    | 54.00   | 91.26   | 87.29   | 37.38   |
| <i>Pp</i> (T2)                                                                             | 100.00                                                                                    | 65.80   | 98.96   | 98.96   | 49.32   |
| เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อราจากน้ำเลี้ยงเชื้อ <i>B.subtilis</i> เจือจาง 32 เท่า |                                                                                           |         |         |         |         |
| <i>Lt.</i> (2-01)                                                                          | 76.47                                                                                     | 69.13   | 79.95   | 71.63   | 81.42   |
| <i>Lt.</i> (2-03)                                                                          | 60.36                                                                                     | 15.24   | 72.14   | 66.88   | 83.04   |
| เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อราจากน้ำเลี้ยงเชื้อ <i>B.subtilis</i> เจือจาง 64 เท่า |                                                                                           |         |         |         |         |
| <i>Ps.</i> (1-01)                                                                          | 83.91                                                                                     | 0       | 91.19   | 43.98   | 66.28   |
| <i>Ps</i> (1-02)                                                                           | 87.33                                                                                     | 4.94    | 87.34   | 65.23   | 48.40   |
| <i>Cg</i> (3-03)                                                                           | 78.06                                                                                     | 20.05   | 79.51   | 50.13   | 31.94   |
| <i>Cg</i> (3-05)                                                                           | 65.27                                                                                     | 22.14   | 73.18   | 55.18   | 48.64   |

หมายเหตุ *Pp* = *P.palmivora*, *Lt* = *L.theobromae* , *Ps*=*Phomopsis* sp., *Cg* =*C.gloeosporioides*

ตารางที่ 2 ค่า EC<sub>50</sub> ของสารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียต่อการเจริญของสายรา

| เชื้อรา                          | ค่า EC <sub>50</sub> ของสารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย (μg/ml) |         |         |         |         |
|----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|---------|---------|---------|---------|
|                                  | ABS-D01                                                               | ABS-D02 | ABS-D03 | ABS-D11 | ABS-D12 |
| <i>P. palmivora</i> (จันทบุรี)   | 231.0                                                                 | 64.4    | 547.0   | 730.0   | 31.0    |
| <i>P. palmivora</i> (T1)         | 180.0                                                                 | 325.0   | 179.0   | 138.0   | 236.0   |
| <i>P. palmivora</i> (T2)         | 345.0                                                                 | 544.0   | 538.0   | >800    | 665.0   |
| <i>L. theobromae</i> (2-01)      | 27.9                                                                  | 28.9    | >2,000  | 43.0    | <12.5   |
| <i>L. theobromae</i> (2-03)      | 139.0                                                                 | 29.0    | 1,540   | 64.0    | 48.0    |
| <i>Phomopsis</i> sp.(1-01)       | 58.0                                                                  | 26.0    | 555.0   | 20.0    | 8.0     |
| <i>Phomopsis</i> sp.(1-02)       | 49.0                                                                  | 11.0    | >2,000  | <12.5   | <12.5   |
| <i>C. gloeosporioides</i> (3-03) | 64.0                                                                  | 28.9    | 167.0   | 16.0    | 18.0    |
| <i>C. gloeosporioides</i> (3-05) | 130.0                                                                 | 131.0   | 976.0   | 36.7    | 12.4    |
| ค่าเฉลี่ย                        | 136.0                                                                 | 132.0   | 944.7   | 206.7   | 115.9   |

ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ยของแผลผลเน่าของทุเรียนจากการปลูกเชื้อ *L. theobromae* (2-03) และ  
จุลินทรีย์ต่าง ๆ

| กรรมวิธี                  | ค่าเฉลี่ยของแผล ( มม. ) |     |
|---------------------------|-------------------------|-----|
| T2 จุ่มน้ำ ปลูกเชื้อ      | 57.905                  | A   |
| T7 ปลูกเชื้อ สารสกัด      | 30.839                  | B   |
| T5 ปลูกเชื้อ น้ำเชื้อ     | 27.140                  | B   |
| T1 ปลูกเชื้อ น้ำ          | 24.729                  | B   |
| T6 น้ำเชื้อ ปลูกเชื้อ     | 24.315                  | B   |
| T8 สารสกัด ปลูกเชื้อ      | 11.676                  | B C |
| T3 ปลูกเชื้อ สาร imazalil | 4.367                   | C   |
| T4 สาร imazalil ปลูกเชื้อ | 1.098                   | C   |

ตัวอักษรที่เหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ด้วย DMRT

ตารางที่ 4 เปอร์เซ็นต์ของการเกิดโรคผลเน่าของทุเรียนจากการปลูกเชื้อ *L. theobromae* (2-03) และจุ่มสารต่าง ๆ

| กรรมวิธี                  | เปอร์เซ็นต์ของการเกิดโรค |   |   |
|---------------------------|--------------------------|---|---|
| T2 จุ่มน้ำ ปลูกเชื้อ      | 93.3                     | A |   |
| T1 ปลูกเชื้อ น้ำ          | 86.7                     | B | A |
| T7 ปลูกเชื้อ สารสกัด      | 70                       | B | A |
| T6 น้ำเชื้อ ปลูกเชื้อ     | 70                       | B | A |
| T5 ปลูกเชื้อ น้ำเชื้อ     | 63.3                     | B | A |
| T8 สารสกัด ปลูกเชื้อ      | 40                       |   | C |
| T4 สาร imazalil ปลูกเชื้อ | 26.7                     | D | C |
| T3 ปลูกเชื้อ สาร imazalil | 13.3                     | D |   |

ตัวอักษรที่เหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วย DMRT

## ผลที่เกิดขึ้นจากโครงการ (Output)

ผลที่เกิดขึ้นแบ่งออกเป็น 2 ระยะ ๆ ละ 7 เดือนดังแสดงในตาราง

| กิจกรรม                                                                                                                                                                                     | Output                                                                                                                                                            |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <u>7 เดือนที่ 1</u>                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                   |
| 1. คัดแยกเชื้อราสาเหตุโรคและ <i>B.subtilis</i> (BS) ที่มีแนวโน้มดีจากตัวอย่างดินและจากโครงการ (ABS/TRF)                                                                                     | 1. ได้เชื้อ <i>B.subtilis</i> (BS) จากตัวอย่างดินและจากโครงการ ABS/TRF จำนวน 140 สายพันธุ์ และเชื้อราโรคโคนและรากเน่าจากเปลือกทุเรียน จำนวน 3 สายพันธุ์           |
| 2. ศึกษาสายพันธุ์ BS ที่แสดงปฏิกิริยาปฏิปักษ์ต่อเชื้อราโรคทุเรียนบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ                                                                                                      | 2. ได้เชื้อ BS 23 สายพันธุ์ ที่มีแนวโน้มประสิทธิภาพดีในการยับยั้งเชื้อราโรคโคนและรากเน่า, โรคผลเน่าทั้ง 3 ชนิด หลังจากทดสอบบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ                  |
| 3. ผลิตเชื้อ BS และแยกสารออกฤทธิ์สำหรับทดสอบการเจริญของสายราในระดับจานอาหาร                                                                                                                 | 3. ได้สายพันธุ์ BS ที่ประสิทธิภาพดีที่สุด จำนวน 5 สายพันธุ์ เมื่อทดสอบจากสารออกฤทธิ์ที่ผลิตและปล่อยออกมาในน้ำเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญของสายราโรคทุเรียนทั้ง 2 กลุ่ม |
| 4. ทดสอบประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อหรือสารสกัดต่อการยับยั้งการงอกของสายราในระดับห้องปฏิบัติการ                                                                                             | 4. ได้ BS ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ปริมาณ 10 ลิตร จำนวน 5 สายพันธุ์                                                                                         |
| <u>7 เดือนที่ 2</u>                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                   |
| 1. เลี้ยงเชื้อ BS ปริมาณมากและแยกน้ำเลี้ยงเชื้อสำหรับใช้ทดลองกับการจุ่มผลทุเรียน                                                                                                            | 1. ได้ culture ของ BS ครบ 5 สายพันธุ์ ซึ่งเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB อย่างละ 10 ลิตร                                                                             |
| 2. ทดสอบความรุนแรงของสายพันธุ์เชื้อราโรคผลเน่าบนผลทุเรียน                                                                                                                                   | 2. พบว่าเชื้อรา <i>L. theobromae</i> สายพันธุ์ L2-03 มีความรุนแรงโรคผลเน่าสูงเมื่อปลูกเชื้อบนผลทุเรียน                                                            |
| 3. สกัดสารออกฤทธิ์จากน้ำเลี้ยงเชื้อ BS.และทดสอบประสิทธิภาพต่อการยับยั้งโรคผลเน่าที่เกิดจากเชื้อ <i>L.theobromae</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อ บนผลทุเรียนที่ปลูกเชื้อ และจากที่ติดเชื้อตามธรรมชาติ | 3. ได้สารออกฤทธิ์สกัดอย่างหยาบ (BS) ทั้ง 5 สายพันธุ์และค่า $EC_{50}$ ต่อเชื้อราทั้ง 2 กลุ่ม                                                                       |

|                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|-------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 4. วิเคราะห์ผล สรุป และรายงาน | <p>4. ทราบผลการยับยั้งราโรคผลเน่า (L.t.) ที่ความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ในน้ำเลี้ยงเชื้อเชื้อจากบนผลทุเรียนที่ปลูกเชื้อเปรียบเทียบกับเมื่อใช้สารเคมีและผลทุเรียนที่ไม่ควบคุมเชื้อ</p> <p>5. ได้ผลเปรียบเทียบประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อ BS ต่อการยับยั้งราโรคผลเน่าบนทุเรียนที่ปลูกเชื้อและที่ติดเชื้อโดยธรรมชาติเมื่อทุเรียนสุกและค่าวิเคราะห์ทางสถิติ</p> |
|-------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

### ผลที่เกิดขึ้นจากโครงการสิ้นสุดมีดังนี้

1. ได้ *B.subtilis* (BS) 5 สายพันธุ์ ที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ควบคุมโรคเชื้อราในทุเรียน ตั้งแต่ระยะการปลูกตลอดจนถึงการเก็บรักษาผลทุเรียนให้ปลอดภัยราในช่วงหลังการเก็บเกี่ยว จนกระทั่งออกสู่ตลาดเพื่อทดแทนการใช้สารเคมีฆ่ารา
2. สามารถทำการวิจัยและพัฒนาต่อไปในเรื่องการผลิตผลิตภัณฑ์สูตรเชื้อ *B.subtilis* สายพันธุ์ที่มีศักยภาพดังกล่าว ในระดับที่จะนำไปสู่การผลิตภาคอุตสาหกรรม โดยมุ่งเน้นศึกษาเรื่องความคุ้มค่าของผู้ใช้ต่อราคาผลผลิตของผลิตภัณฑ์ที่นำไปใช้
3. การประยุกต์ใช้สารออกฤทธิ์ของ *B.subtilis* (BS) 5 สายพันธุ์ ในการควบคุมโรคที่จะเป็นสาเหตุของการสูญเสียมูลค่าของกลุ่มผลไม้ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจในระยะหลังการเก็บเกี่ยวและส่งออกยังตลาดต่างประเทศ