ศึกษาอัตราและระยะเวลาที่เหมาะสมในการใช้ชีวภัณฑ์ที่ผลิตได้จากเชื้อ*Bacillus subtilis* เพื่อป้องกันกำจัดโรคแคงเกอร์ของมะนาว

The Rate and Duration of the Appropriate Use of Biological Product by *Bacillus subtilis* to Control of Lime Canker

นลินี ศิวากรณ์[1/] พจนา ตระกูลสุขรัตน์[1/]
วสันต์ ผ่องสมบูรณ์[2/]
[1/] กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช
[2/] ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรพิจิตร สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 2

บทคัดย่อ

การศึกษาอัตราและระยะเวลาที่เหมาะสมในการใช้ชีวภัณฑ์ที่ผลิตได้จากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* เพื่อป้องกันกำจัดโรคแคงเกอร์ของมะนาวที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (synonym *X. campestris* pv. *citri*) พบว่าสารเคมีคอปเปอร์ออกซี่คลอไรด์มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดโรคแคงเกอร์ดีที่สุดโดยแสดงระดับคะแนนการเกิดโรคต่ำที่สุดเฉลี่ย 2.3 รองลงมาได้แก่การใช้ชีวภัณฑ์จากเชื้อ *Bacillus subtilis* อัตรา 5 กรัม/น้ำ 1 ลิตร และ10 กรัม/น้ำ 1 ลิตรโดยให้ระดับคะแนนการเกิดโรคเฉลี่ย 2.5 และ2.4 และกรรมวิธีเปรียบเทียบ (น้ำ)แสดงคะแนนการเกิดโรคสูงสุดเฉลี่ย 3.3 ส่วนระยะเวลาในการฉีดพ่นทุก 7 วันไม่มีความแตกต่างกับการฉีดพ่นทุก 14 วัน

คำนำ

โรคแคงเกอร์ของมะนาวมีสาเหตุเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (synonym *X. campestris* pv. *citri*) เชื้อแบคทีเรียนี้สามารถเข้าทำลายส่วนของพืชที่อยู่เหนือพื้นดินตั้งแต่ ใบ กิ่งก้าน ผล และเชื้อสาเหตุนี้สามารถอาศัยอยู่บนต้นมะนาวได้ทุกฤดูกาล โดยมากมักพบระบาดรุนแรงในฤดูฝน จากการศึกษาโรคแคงเกอร์ในประเทศไทยจัดเป็นพวก Canker A (Uematsu และคณะ, 1993) การป้องกันกำจัดโรคแคงเกอร์ในปัจจุบันยังไม่มีสารเคมีที่มีประสิทธิภาพโดยตรงต่อเชื้อแบคทีเรียสาเหตุนี้ ซึ่งโดยทั่วไปเกษตรกรนิยมใช้สารประกอบคอปเปอร์ฉีดพ่นต่อเนื่องเป็นประจำ ทำให้ระบบนิเวศวิทยาถูกทำลายและมีสารประกอบคอปเปอร์ตกค้างในผลิตผล

รหัสการทดลอง 01-35-54-01-03-00-01-54

ส่วนการใช้ยาปฏิชีวนะกับโรคแคงเกอร์ทำให้เกิดการสะสมของยาในผลผลิตซึ่งจะทำให้มนุษย์ได้รับสารปฏิชีวนะโดยไม่จำเป็นอันอาจทำให้เกิดการดื้อยาปฏิชีวนะในการรักษาโรคในระยะที่เกิดการเจ็บป่วยได้ ซึ่งก็เป็นอันตรายที่จะแนะนำให้เกษตรกรนำยาปฏิชีวนะมาใช้ในทางการเกษตร จุลินทรีย์ที่ใช้ในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีได้มีการศึกษากันมามีหลายชนิดได้แก่ แบคทีเรีย แอคติโนมัยซิส เชื้อรา และสัตว์ชนิดเล็กๆที่กินจุลินชีพเป็นอาหาร เช่น โปรโตซัว ไส้เดือนฝอย และไร แบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์ที่สำคัญที่สุดในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี เนื่องจากสามารถเจริญเติบโตได้รวดเร็วและย่อยสลายอาหารได้กว้างในสภาพแตกต่างกันทั้งยังสามารถผลิตสารปฏิชีวนยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ได้ (Kenneth and Cock,1982) นลินีและคณะ(2528) พบว่าเชื้อ actinomycetes ที่แยกได้จากดินในท้องที่ต่างๆ สามารถสร้างปฏิชีวนสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียโรคพืชได้หลายชนิด นลินีและคณะ (2534) พบว่า *Bacillus subtilis* สามารถควบคุมความรุนแรงของโรคขอบใบแห้งของข้าวจาก94%เป็น19% และจากการศึกษาการควบคุมโรคแคงเกอร์โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในแปลงทดลองที่จังหวัดอยุธยาพบว่า *Bacillus subtilis* strain WD20 สามารถลดการเกิดโรคแคงเกอร์ของส้มโอได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยสามารถลดความรุนแรงของโรคแคงเกอร์บนส้มโอได้ 24% ในขณะที่คอปเปอร์ออกซี่คลอไรด์สามารถลดความรุนแรงของโรคแคงเกอร์ได้เพียง 4.10 % การป้องกันกำจัดศัตรูพืชโดยชีววิธีก็เป็นกรรมวิธีหนึ่งในการจัดการศัตรูพืชแบบผสมผสาน เพื่อการจัดการโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพป้องกันการดื้อยาของสารเคมีรวมทั้งพิษตกค้างในอาหาร เพิ่มความหลากหลายของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์เข้าไปครอบครองพื้นที่ก่อนที่เชื้อสาเหตุโรคจะเข้าทำลาย เพื่อกระตุ้นหรือชักนำให้พืชสร้างความต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคพืช ซึ่งการปฏิบัติดังกล่าวจะลดการใช้สารเคมีได้ และลดการระบาดของโรคอย่างรุนแรงได้ ซึ่งวิธีดังกล่าวควรได้ศึกษาเพื่อให้สามารถนำมาใช้ในการจัดการควบคุมโรคแคงเกอร์มะนาว โดยการดัดแปลงหรือพัฒนาให้มีความเหมาะสมต่อสภาพการผลิตมะนาว อันจะเป็นแนวทางให้เกษตรกรสามารถเลือกและเพิ่มมูลค่าของผลผลิตที่ปราศจากพิษตกค้าง

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. แปลงปลูกมะนาวอำเภอบ้านแพ้ว จังหวัดนครปฐม
2. เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* strain WD20
3. สารจับใบ และสารเคมีคอปเปอร์ออกซี่คลอไรด์.
4. กล้องจุลทรรศน์, เครื่องแก้ว, ตาชั่ง, เครื่องเขย่า, กระบอกฉีด
5. ผงทัลคัม, เมทิลเซลลูโลส, แมกนีเซียมซัลเฟต
6. อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย PSA, PSB และ PDB

วิธีการ

การศึกษาอัตราและระยะเวลาที่เหมาะสมในการใช้เชื้อ *B. subtilis* WD 20 ในรูปผลิตภัณฑ์ผงเชื้อต่อโรคแคงเกอร์ของมะนาวในแปลงปลูกอำเภอบ้านแพ้ว จังหวัดสมุทรสาคร

1. การเตรียมผลิตภัณฑ์ผงเชื้อ *B. subtilis* WD 20 โดยใช้เข็มเขี่ยหัวกลมเขี่ยเชื้อ *B. subtilis* WD 20 ที่เลี้ยงในหลอดอาหาร PSA จำนวน 1 loop มาใส่ในอาหารเหลว PSBที่บรรจุในขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 500 มล. แล้วนำเข้าเครื่องเขย่าอัตราความเร็ว 145-150 รอบ/นาทีเป็นเวลา 3-5 วัน จากนั้นจึงเติมแมกนีเซียมซัลเฟตและเมททิลเซลลูโลสลงไปในขวดเลี้ยงเชื้อ กวนให้เข้ากัน นำส่วนผสมทั้งหมดค่อย ๆเทใส่ลงในผงทัลคัมที่อบฆ่าเชื้อแล้ว ผสมให้เข้ากันและนำมาเทใส่ถาดที่วางรองด้วยอลูมินั่มฟอยล์เกลี่ยให้เรียบและผึ่งไว้จนแห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 3-4 วัน แล้วนำมาบดให้เป็นผงละเอียด

2. การทดสอบอัตราและระยะเวลาในการใช้ผลิตภัณฑ์จากเชื้อ *B. subtilis* WD 20 ในการป้องกันกำจัดโรคแคงเกอร์บนต้นมะนาว

2.1 การวางแผนการทดลอง วางแผนการทดลองแบบFactorial in RCB มี 5 กรรมวิธี ๆ ละ 5 ซ้ำ ๆละ 3 ผล ประกอบด้วย 2 ปัจจัย ดังนี้

2.1.1 ฉีดพ่นบนผลมะนาวด้วยกรรมวิธีต่างๆ คือ

1. ฉีดพ่นด้วยผลิตภัณฑ์ผงเชื้อ *B. subtilis* WD 20 ที่เตรียมไว้ในข้อ1 อัตรา 1 กรัม/น้ำ 1 ลิตร
2. ฉีดพ่นด้วยผลิตภัณฑ์ผงเชื้อ *B. subtilis* WD 20 ที่เตรียมไว้ในข้อ1 อัตรา 5 กรัม/น้ำ 1 ลิตร
3. ฉีดพ่นด้วยผลิตภัณฑ์ผงเชื้อ *B. subtilis* WD 20 ที่เตรียมไว้ในข้อ1 อัตรา 10 กรัม/น้ำ 1 ลิตร
4. ฉีดพ่นด้วยสารเคมีคอปเปอร์ออกซี่คลอไรด์ อัตรา 10 กรัม/น้ำ 1 ลิตร
5. ฉีดพ่นด้วยน้ำเป็นกรรมวิธีเปรียบเทียบ

2.1.2 ระยะเวลาการฉีดพ่น คือ

1. ฉีดพ่นทุก 7 วัน
2. ฉีดพ่นทุก 14 วัน

2.2 การปฏิบัติการทดลอง นำสารละลายตามกรรมวิธีที่เตรียมไว้ในข้อ2.1.1 ผสมสารจับใบอัตรา 2 หยด/น้ำ 20 มล. แล้วนำไปฉีดพ่นบนผลมะนาวแต่ละต้นตามกรรมวิธีต่าง ๆ ที่กำหนดไว้ในแต่ละผลและกำหนดผลมะนาวที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มม.อายุผลมะนาว 2 สัปดาห์และไม่เป็นโรคแคงเกอร์เพื่อเป็นตัวแทนในการตรวจการเกิดโรคในแต่ละผลจำนวน 3 ผล/ต้น โดยฉีดพ่นตามกรรมวิธีที่วางไว้จนถึงระยะแก่เต็มที่สามารถเก็บเกี่ยวได้เป็นเวลา 3 เดือน(ผลมะนาวมีระยะตั้งแต่ออกดอกจนถึงเก็บกี่ยวเป็นเวลา 5 เดือน)

2.3 การบันทึกข้อมูล ตรวจและประเมินให้คะแนนความรุนแรงระดับความรุนแรงของโรคแคงเกอร์บนผลมะนาวในแต่ละผลตามคู่มือการประเมินระดับคะแนนของ James (1971) ดังนี้

0 = ไม่พบเกิดโรคแคงเกอร์
1 = พบแผลจุดโรคแคงเกอร์ 1-5 %ของพื้นที่รอบผล
2 = พบแผลจุดโรคแคงเกอร์ 6-10 %ของพื้นที่รอบผล
3 = พบแผลจุดโรคแคงเกอร์ 11-25 %ของพื้นที่รอบผล
4 = พบแผลจุดโรคแคงเกอร์ 26-50 %ของพื้นที่รอบผล
5 = พบแผลจุดโรคแคงเกอร์ 51-75 %ของพื้นที่รอบผล
6 = พบแผลจุดโรคแคงเกอร์ 76-100 %ของพื้นที่รอบผล

คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของการเกิดโรคตามวิธีของ Horsfall and Heuberger (1942) ดังนี้

$$\text{ความรุนแรงของการเกิดโรค} = \frac{\text{ผลรวม (ระดับ x จำนวนใบของแต่ละระดับ)}}{\text{จำนวนใบทั้งหมด x ระดับสูงสุด}} \times 100$$

และนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์เปรียบเทียบทางสถิติ

ระยะเวลาและสถานที่

- มกราคม 2555 – กันยายน 2555
- ห้องปฏิบัติการและเรือนทดลองกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
- แปลงมะนาวของเกษตรกร อำเภอบ้านแพ้ว จ.นครปฐม

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาอัตราและระยะเวลาที่เหมาะสมในการใช้เชื้อ *B. subtilis* WD 20 ในรูปผลิตภัณฑ์ผงเชื้อต่อโรคแคงเกอร์ของมะนาวในแปลงปลูกอำเภอบ้านแพ้ว จังหวัดสมุทรสาคร พบว่าสารเคมีคอปเปอร์ออกซี่คลอไรด์แสดงระดับคะแนนความรุนแรงของการเกิดโรคต่ำที่สุดเฉลี่ย 2.2 เมื่อพ่นทุก 7 วันและคะแนนเฉลี่ย 2.4 เมื่อพ่นทุก 14 วัน การฉีดพ่นด้วยผลิตภัณฑ์ผงเชื้อจุลินทรีย์ *B. subtilis* WD 20 อัตรา 5 กรัม/ลิตรและ 10 กรัม/ลิตร แสดงระดับคะแนนความรุนแรงของการเกิดโรคเฉลี่ย 2.4 เมื่อพ่นทุก7 วันและคะแนนเฉลี่ย 2.6 เมื่อพ่นทุก 14 วัน ซึ่งไม่แตกต่างกับสารเคมีคอปเปอร์ออกซี่คลอไรด์ ส่วนการฉีดพ่นด้วยผลิตภัณฑ์ผงเชื้อจุลินทรีย์ *B. subtilis* WD 20 อัตรา 1 กรัม/ลิตร แสดงระดับคะแนนความรุนแรงของการเกิดโรคเฉลี่ย 2.8เมื่อพ่นทุก 7 วัน และคะแนนเฉลี่ย 2.6 เมื่อพ่นทุ 14 วัน กรรมวิธีการฉีดพ่นด้วยน้ำซึ่งเป็นกรรมวิธี

เปรียบเทียบมะนาวแสดงการเกิดโรคแคงเกอร์สูงที่สุดโดยแสดงระดับคะแนนความรุนแรงของการเกิดโรคเฉลี่ย 3.3 เมื่อพ่นทุก 7 วัน และคะแนนเฉลี่ย 3.2 เมื่อพ่นทุก 14 วัน (ตารางที่1)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การศึกษาอัตราและระยะเวลาที่เหมาะสมในการใช้ชีวภัณฑ์ที่ผลิตได้จากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* เพื่อป้องกันกำจัดโรคแคงเกอร์ของมะนาวที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (synonym *X. campestris* pv. *citri*) พบว่าสารเคมีคอปเปอร์ออกซี่คลอไรด์มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดโรคแคงเกอร์ดีที่สุดโดยแสดงระดับคะแนนการเกิดโรคต่ำที่สุดเฉลี่ย 2.3 รองลงมาได้แก่การใช้ชีวภัณฑ์จากเชื้อ *Bacillus subtilis* อัตรา 5 กรัม/น้ำ 1 ลิตร และ10 กรัม/น้ำ 1 ลิตรโดยให้ระดับคะแนนการเกิดโรคเฉลี่ย 2.5 และ 2.4 และกรรมวิธีเปรียบเทียบ (น้ำ)แสดงคะแนนการเกิดโรคสูงสุดเฉลี่ย 3.3 ส่วนระยะเวลาในการฉีดพ่นทุก 14 วันไม่มีความแตกต่างกับเมื่อฉีดพ่นทุก 7 วัน ซึ่งจากการทดลองยังไม่มีสารชนิดใดที่สามารถป้องกันกำจัดโรคแคงเกอร์ให้หายไปจากสวนได้ยังคงต้องใช้วิธีการป้องกันกำจัดโรคอื่นๆร่วมกันเช่นการใช้วิธีการเขตกรรมโดยการตัดแต่งกิ่งที่เป็นโรคและนำออกจากแปลงปลูกไปเผาทำลายเพื่อลดปริมาณแหล่งสะสมของเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคแคงเกอร์

เอกสารอ้างอิง

นลินี จาริกภากร ภาณี หนูนิ่ม บุญมี วารินสอาด พิรุณ จันทนกุล เอนกชัย.2534. การป้องกันกำจัดโรค ข้าวโดยเชื้อบักเตรี *Bacillus subtillis* รายงานการสัมมนาทางวิชาการความก้าวหน้าเทคโนโลยีชีวภาพการกสิกรรมและสิ่งแวดล้อม ณ โรงแรมเชียงใหม่ออร์คิด จ. เชียงใหม่ หน้า 257-272

นลินี ศิวากรณ์ สุเนตรา ภาวิจิตร วินิดา ฐิตะฐาน และสำเนา ศรุตานนท์ 2528.การศึกษาปฏิชีวนภาพของเชื้อ Actinomycetes ในดินต่อเชื้อบักเตรีโรคพืช รายงานผลงานวิจัย พ.ศ. 2528. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา หน้า 301-311.

Kenneth,F.B.,and R.J.Cock. 1982.Biological control of plant pathogens. Publish by The American Phytopathoiogical Society.St.Paul,Minnesota.433p.Res. Commun 110: 194-199.

Uematsu, T.,Chuenchitt, S.Karnjanarat, S., Vivithajinda, S.,Nabheerong, S.,Benjathikul, S.,Nilmanee, S.,Dhirabhava, W. and Buanghuwon, D.1983.Bacterial Diseases on Economic Crops in Thailand, Topoical Agriculture Research Center,

Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Japan and Department of Agriculture, Ministry of Agriculture and Cooperatives, Thailand

ภาคผนวก

ตารางที่ 1 อัตราและระยะในการฉีดพ่นผลิตภัณฑ์จากเชื้อ *Bacillus subtilis* ต่อโรคแคงเกอร์บนผลมะนาว

กรรมวิธี	ระดับคะแนนการเกิดโรค		ค่าเฉลี่ย	ค่าความแตกต่าง
	7 วัน	14 วัน		
ผงเชื้อ *B. subtilis*อัตรา 1 กรัม/ลิตร	2.8 b	2.6 a	2.7 b[1/]	0.2 ns
ผงเชื้อ *B. subtilis*อัตรา 5 กรัม/ลิตร	2.4 ab	2.6 a	2.5 ab	-0.2 ns.
ผงเชื้อ *B. subtilis*อัตรา 10 กรัม/ลิตร	2.4 ab	2.4 a	2.4 ab	0
คอปเปอร์ออกซี่คลอไรด์	2.2 a	2.4 a	2.3 a	-0.2 ns
น้ำ (Control)	3.3 c	3.2 b	3.3 c	0.1 ns
ค่าเฉลี่ย	2.6	2.6	2.6	

CV. = 25.5%**

[1/] อักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงว่าค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันทางสถิติโดยวิธีDMRT ที่ระดับความเชื้อมั่น 99%