

การคัดเลือกแบคทีเรียปฏิชีวนะในการควบคุม เชื้อรา *Rhizoctonia solani*
 Select and Test of biological control for *Rhizoctonia. solani*

พีระวรรณ พัฒนวิภาส^{1/} ทศนาพร ทศคร^{1/} ธารทิพย์ ภาสบุตร^{1/}
 ศิวีโล ลาภบรรจบ^{2/} อ้อยทิน จันทร์เมือง^{3/}
^{1/} กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
^{2/} ศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์ สถาบันวิจัยพืชไร่
^{3/} ศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่ สถาบันวิจัยพืชไร่

บทคัดย่อ

เก็บตัวอย่างกาบใบข้าวโพดที่แสดงอาการไหม้หรือจุดมาทำการแยกเชื้อและศึกษาเชื้อที่แยกได้พบว่าเป็น *Rhizoctonia solani* นำเชื้อที่แยกได้ มาทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ในห้องปฏิบัติการกับจุลินทรีย์จากหน่วยเก็บจุลินทรีย์โรคพืช จำนวน 181 isolate บนอาหาร PDA พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ จำนวน 13 ไอโซเลท แสดงปฏิกริยายับยั้งเชื้อ *Rhizoctonia solani* หลังการทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA 2 วัน นำเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Rhizoctonia solani* จำนวน 13 ไอโซเลท นำไปทดสอบในขั้นต่อไป

รหัสการทดลอง 03-04-54-01-03-01-06-54

คำนำ

เชื้อรา *Rhizoctonia solani* มีลักษณะที่สำคัญคือไม่สร้าง asexual spore คงมีแต่เส้นใย เส้นใยจะอัดรวมกันเป็นเม็ด Sclerotia เพื่ออยู่ข้ามฤดูโดยเม็ด Sclerotia จะอยู่ในดินและซากพืช หรือพืชอาศัยและแพร่ระบาดทำความเสียหายในฤดูปลูกต่อไป เชื้อราชนิดนี้ทำให้เกิดโรครากับพืชหลายชนิด ลักษณะอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อราชนิดนี้ ส่วนใหญ่ทำให้เกิดอาการเน่าบนเมล็ด และต้นกล้าที่ยังไม่โผล่พ้นระดับผิวดิน และเน่าระดับดินเช่นโรคโคนเน่าของกล้าปาล์ม พีระวรรณ (2546) รายงานว่าโรคกาบและใบไหม้ข้าวโพดสามารถเข้าทำลายข้าวโพดได้ตั้งแต่ระยะกล้าข้าวโพดที่อ่อนแอจะทำให้ต้นกล้าเน่าหักพับล้มลง และพบอาการของโรคบนส่วนต่าง ๆ ของข้าวโพด เช่น ลำต้น ใบ กาบใบ กาบฝัก และ ฝัก มีรายงานว่าดินที่มีเชื้อ *Rhizoctonia solani* อยู่ 15,19 และ 1 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้ผลผลิตข้าวโพดลด 47 , 42 และ 8 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (Sumner and Minton, 1989) โรคกาบใบแห้งของข้าวโดยพบว่าระยะข้าวแตกกอ ลักษณะแผลสีเขียวปนเทาปรากฏตามกาบใบตรงบริเวณใกล้ระดับน้ำแผลจะลุกลามขยายใหญ่ขึ้นจนมีขนาดไม่จำกัดและลุกลามขยายขึ้นถึงใบข้าวถ้าเป็นพันธุ์ข้าวที่อ่อนแอ แผลสามารถลุกลามถึงใบธงและกาบหุ้มรวงข้าว ทำให้ใบและกาบใบเหี่ยวแห้งผลผลิตลดลง(กองโรคพืชและจุลชีววิทยา, 2543) มีรายงานว่าใช้สาร Validamycin สามารถควบคุมโรคได้ดีที่สุด(Dalmacio *et al.*, 1990)

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เก็บตัวอย่างโรคพืช ได้แก่ กรรไกรตัดแต่งกิ่ง ถุงพลาสติกสำหรับเก็บตัวอย่าง กระดาษหนังสือพิมพ์ ปากกาเคมี หนั่งยาง
2. สารละลายโซเดียมไฮเพอร์คลอไรด์ แอติลแอลกอฮอล์ 75%
3. อาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA), water agar (WA)
4. วัสดุอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ งานอาหารเลี้ยงเชื้อ ขวดดูแรน ปีกเกอร์ กระจบอกลง ใบมีดผ่าตัด เข็มเย็บปลายแหลม สไลด์ cover slip
5. ตู้ปลอดเชื้อ หม้อนึ่งความดัน ตู้อบความร้อน เครื่องชั่ง
6. กล้องจุลทรรศน์

วิธีการ

1. การศึกษาการป้องกันกำจัดเชื้อ *Rhizoctonia solani* โดยวิธี ในห้องปฏิบัติการ

1.1 การเก็บตัวอย่างเชื้อรา *Rhizoctonia solani* และการแยกเชื้อ

สำรวจและเก็บตัวอย่างเชื้อรา *Rhizoctonia solani* จากแหล่งปลูกในไร่เกษตรกร นำมาแยกเชื้อโดยวิธี tissue transplanting method จากส่วนของขอบแผลจากพืชที่เป็นโรค โดยตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาดเล็ก ฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอรีน 10 เปอร์เซ็นต์แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ จากนั้น

จึงวางบนอาหารพีดีเอ (potato dextrose agar; PDA) ทุกขั้นตอนปฏิบัติงานโดยเทคนิคปลอดเชื้อ นำไปบ่มไว้ในอุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส หลังจากที่มีเชื้อเจริญออกมาจากขอบแผล ตรวจสอบลักษณะของเชื้อที่แยกได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ย้ายเชื้อเก็บรักษาในหลอดอาหารเพื่อเป็น stock culture

2. การทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Rhizoctonia solani*. ในห้องปฏิบัติการ

นำจุลินทรีย์ที่เก็บไว้หน่วยเก็บจุลินทรีย์โรคพืช มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ในห้องปฏิบัติการ โดยเลี้ยงเชื้อบนอาหาร PDA เมื่อเชื้ออายุ 2 วัน ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร เจาะบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อนำมาวางตรงกลางอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ใช้ loop ที่เผาไฟฆ่าเชื้อแล้วแตะโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแบทที่เรียทดสอบไอโซเลทต่างๆ ที่เลี้ยงบนอาหาร RNV อายุ 24 ชั่วโมง ลงบนจานเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อรา *Rhizoctonia solani* โดยขีดเชื้อจุลินทรีย์มีความยาว 1 ซม. จำนวน 4 จุด ตรงข้ามกันในแนวกากบาทให้ห่างจากเชื้อรา 4 ซม. วางแผนการทดลองแบบ CRD 4 ซ้ำ บ่มเชื้อไว้ในอุณหภูมิห้อง วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางการเจริญของเส้นใยเชื้อรา ในแต่ละไอโซเลทเปรียบเทียบกับการเจริญของเชื้อราเพียงอย่างเดียว

2. การทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อรา

Rhizoctonia solani ในสภาพเรือนทดลอง

นำจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Rhizoctonia solani* มาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ในสภาพเรือนทดลองที่มีการปลูกเชื้อให้กับพืชอาศัยของเชื้อรา *Rhizoctonia solani* มีขั้นตอนการทดลองดังนี้

2.1 การปลูกพืชทดสอบ

ปลูกพืชทดสอบ ในกระถางพลาสติกที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 50 ซม. จำนวน 4 ต้นต่อกระถาง 4 กระถางต่อ 1 ซ้ำ วางแผนการทดลองแบบ RCB มี 4 ซ้ำ

2.2 การเพิ่มปริมาณเชื้อรา *Rhizoctonia solani* เพื่อใช้ในการปลูกเชื้อ

นำเมล็ดข้าวฟ่าง มาแช่น้ำนานประมาณ 18 ชั่วโมง เปลี่ยนน้ำที่แช่เมล็ด 3-4 ครั้ง เพื่อให้เมล็ดสะอาด จากนั้นจึงนำเมล็ดบรรจุลงในถุงพลาสติกทนความร้อน ปริมาณ 2 ใน 3 ของภาชนะ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 45 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วจึงนึ่งฆ่าเชื้อซ้ำอีกครั้งในวันถัดมา เชื้อขึ้นวันที่มีเส้นใยของเชื้อเจริญอยู่ลงไปลงในถุงข้าวฟ่างที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เมื่อเริ่มมีการเจริญของเส้นใยบนเมล็ดข้าวฟ่าง เขย่าถุงเพื่อให้เชื้อกระจายไม่เกาะเป็นก้อนแข็ง บ่มไว้เป็นเวลา 3 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำเมล็ดข้าวฟ่างที่มีเชื้อเจริญอยู่มาบอบให้แตกเพื่อให้มีขนาดเล็กลงและมีความสม่ำเสมอ นำเชื้อที่เตรียมได้ไปปลูกเชื้อให้กับพืชที่ปลูกในเรือนทดลอง

2.3 การพ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ตามชนิดที่ได้จากผลการทดลองในห้องปฏิบัติการ

11.3 การบันทึกข้อมูล

- วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางการเจริญของเส้นใยเชื้อรา ในแต่ละไอโซเลท เปรียบเทียบกับการเจริญของเชื้อราเพียงอย่างเดียว
- การประเมินความรุนแรงของโรค หลังปลูกเชื้อ สังเกตอาการ บันทึกระดับความรุนแรงของการเกิดโรคทุกสัปดาห์ก่อนที่จะมีการพ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์

เวลาและสถานที่

ตุลาคม 2553 – กันยายน 2554

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

แปลงปลูกพืชของเกษตรกร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1.การศึกษาประสิทธิภาพของสารป้องกันกำจัดโรคพืชต่อเชื้อ *Rhizoctonia solani* ในห้องปฏิบัติการ

1.1 การเก็บตัวอย่างเชื้อรา *Rhizoctonia solani* และการแยกเชื้อ

ผลการสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างโรคพืชที่มีลักษณะอาการกาบใบไหม้หรือจุดของข้าวโพด ได้รวบรวมตัวอย่างพืชที่แสดงลักษณะอาการไหม้หรือจุดแหล่งปลูกพืชจังหวัดนครราชสีมา นำมาแยกเชื้อโดยวิธี tissue transplanting method ตรวจสอบลักษณะของเชื้อที่แยกได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ย้ายเชื้อเก็บรักษาในหลอดอาหารเพื่อเป็น stock culture สำหรับทดสอบต่อไป

1.2 การทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ในห้องปฏิบัติการ

การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ในห้องปฏิบัติการ โดยเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร PDA เมื่อเชื้อราอายุ 2 วัน ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร เจาะบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อนำมาวางตรงกลางอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ใช้ loop ที่เผาไฟฆ่าเชื้อแล้วแตะโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแบทที่เรียทดสอบไอโซเลทต่างๆ ที่เลี้ยงบนอาหาร RNV อายุ 24 ชั่วโมง ลงบนจานเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อรา *Rhizoctonia solani* โดยขีดเชื้อจุลินทรีย์มีความยาว 1 ซม. จำนวน 4 จุด ตรงข้ามกันในแนวกากบาทให้ห่างจากเชื้อรา 4 ซม. วางแผนการทดลองแบบ CRD 4 ซ้ำ บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ในแต่ละไอโซเลทเปรียบเทียบกับการเจริญของเชื้อราเพียงอย่างเดียว คัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Rhizoctonia solani* จำนวน 13 ไอโซเลท นำไปทดสอบในขั้นต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- พีระวรรณ พัฒนวิภาส. 2546. โรคกาบและใบไหม้ข้าวโพดที่เกิดจากเชื้อรา *Rhizoctonia solani*.
หน้า 260-263. ใน : รายงานการประชุมวิชาการข้าวโพดข้าวฟ่างแห่งชาติ ครั้งที่ 31. 11-15
พฤษภาคม 2546. ณ โรงแรมโรสการ์เดนท์ เอโพรม รีสอร์ท อ. สามพราน จ. นครปฐม.
- Dalmacio , S.C ., Lozano , G.P., De La Pena , R. S., Candole , B. L. 1990.
Mechanical , Biological and Chemical control of banded leaf and
sheath blight on maize caused by *Rhizoctonia solani* (Philippines).
Bacolod City (Philippines).
- Summer, D.R. and Minton , N.A. 1989. Crop losses in corn induced by
Rhizoctonia solani AG-2-2 and nematodes Phytopatho. 79 (a).

ตารางที่ 1 การทดสอบประสิทธิภาพเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์(ชุดที่ 1)ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Rhizoctonia solani* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

ไอโซเลท	ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง
1	57.08
2	59.31
3	61.11
4	69.58
5	59.86
6	51.25
7	47.92
8	52.92
9	37.78
10	54.31
11	0.00
12	46.81
13	52.08
14	43.61
15	45.69
16	50.28
17	50.28

ตารางที่ 1(ต่อ)

ไอโซเลท	ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง
18	42.22
19	47.78
20	45.69
21	57.36
22	49.72
23	54.72
24	56.11
25	53.33
26	43.75
27	46.94
28	47.78
29	57.36
30	53.19
31	46.11
32	45.00
33	44.72
34	0.00
35	45.28
36	34.58
37	51.25
38	52.91
39	44.72
40	0.00
41	0.00
42	45.41
43	51.11
44	0.00
45	54.30
46	47.78

ตารางที่ 1(ต่อ)

ไอโซเลข	ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง
47	49.17
48	45.69
49	40.28
50	0.00
51	25.83
52	58.61
53	45.83
54	54.83
55	48.19
56	17.78
57	50.42
58	8.47
59	0.00
60	47.91
61	48.75
62	37.64
63	46.94
64	44.58
65	45.97
66	48.19
67	18.89
68	21.94
69	43.056
70	0.00
control	0.00

ตารางที่ 2 การทดสอบประสิทธิภาพเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ(ชุดที่ 2)ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Rhizoctonia solani* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

ไอโซเลท	ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง
1	50.00
2	53.00
3	49.86
4	50.97
5	0.00
6	49.44
7	49.44
8	51.67
9	52.36
10	52.50
11	49.58
12	49.72
13	15.56
14	2.78
15	51.39
16	0.00
17	0.00

ตารางที่ 2(ต่อ)

ไอโซเลข	ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง
18	11.53
19	51.81
20	47.50
21	0.00
22	44.44
23	33.89
24	47.50
25	49.17
26	48.19
27	49.17
28	52.36
29	0.00
30	48.33
31	51.25
32	51.81
33	49.17
34	51.39
35	50.69
36	46.39
37	45.14
38	45.14
39	45.83
40	49.58
41	45.42
42	49.17
43	47.64
44	45.56
45	0.00

ตารางที่ 2(ต่อ)

ไอโซเลข	ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง
46	47.21
47	47.80
48	6.76
49	48.87
50	45.43
51	41.39
52	43.53
53	46.02
54	51.00
55	44.12
56	32.85
57	13.04
58	42.94
59	40.68
60	45.31
61	16.96
62	47.56

ตารางที่ 2(ต่อ)

ไอโซเลท	ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง
63	46.14
64	6.76
65	6.76
66	47.21
67	44.36
68	41.28
69	46.02
70	47.80
71	41.28
72	41.99
73	6.76
74	43.41
75	50.65
76	42.82
77	40.68
78	44.36
79	42.23
80	41.51
control	0.00

ตารางที่ 3 การทดสอบประสิทธิภาพเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ(ชุดที่ 3)ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Rhizoctonia solani* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

ไอโซเลข	ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง
1	52.77
2	0.00
3	46.00
4	0.00
5	0.00
6	13.00
7	18.55
8	42.66
9	52.44
10	35.55
11	54.11
12	35.22
13	0.00
14	38.00
15	0.00
16	7.44
17	0.00

ตารางที่ 3(ต่อ)

ไอโซเลท	ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง
18	35.22
19	5.55
20	14.88
21	45.55
22	37.11
23	33.33
24	44.44
25	44.44
26	44.77
27	29.66
28	44.44
29	37.66
30	45.22
31	44.44
control	0.00