

การคัดเลือกแบคทีเรียปฏิชีวนะในการควบคุม เชื้อรา *Rhizoctonia solani*

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

พิระวรรณ พัฒนวิภาส¹ ทศนาพร ทศคร¹ ธารทิพย์ ภาสบุตร¹

ศิริไล ลาภบรรจบ² อ้อยทิน จันทร์เมือง³

¹ กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

² ศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์ สถาบันวิจัยพืชไร่

² ศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่ สถาบันวิจัยพืชไร่

บทคัดย่อ

เก็บตัวอย่างกาบใบข้าวโพดที่แสดงอาการไหม้หรือจุดมาทำการแยกเชื้อและศึกษาเชื้อที่แยกได้พบว่าเป็น *Rhizoctonia solani* นำเชื้อที่แยกได้ มาทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ในห้องปฏิบัติการกับจุลินทรีย์จากหน่วยเก็บจุลินทรีย์โรคพืช จำนวน 35 isolate บนอาหาร PDA พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ จำนวน 5 ไอโซเลท แสดงปฏิกิริยายับยั้งเชื้อ *Rhizoctonia solani* หลังการทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA 2 วัน คัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา *Rhizoctonia solani* มากกว่า 85 เปอร์เซ็นต์ไปทดสอบประสิทธิภาพในแปลงทดลองต่อไป

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 และเน่าระดับดินเช่นโรคโคนเน่าของกล้าปรีพี ะวรรณ (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 หนังกาย
2. สารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ แอติลแอลกอฮอล์ 75%
3. อาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA), water agar (WA)
4. วัสดุอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ งานอาหารเลี้ยงเชื้อ ขวดดูแรน บีกเกอร์ กระจกบดว บวมืดผ้าตัด เข็มเขี่ยปลายแหลม สไลด์ cover slip
5. ตู้ปลอดเชื้อ หม้อนึ่งความดัน ตู้อบความร้อน เครื่องชั่ง
6. กล้องจุลทรรศน์

วิธีการ

1. การศึกษาการป้องกันกำจัดเชื้อ *Rhizoctonia solani* โดยชีววิธี 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 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 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 เชื้อขึ้นวันที่มีเส้นใยของเชื้อเจริญอยู่ลงไป ในถุงข้าวฟ่างที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 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* ในแต่ละไอโซเลทเปรียบเทียบกับเชื้อราเพียงอย่างเดียว คัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Rhizoctonia solani* โดยเลือก

ไอโซเลทที่มีระดับการยับยั้งตั้งแต่ 80 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไปซึ่งจากผลการทดสอบพบว่ามีจุลินทรีย์ จำนวน 5 ไอโซเลท ที่มีประสิทธิภาพเพื่อนำไปทดสอบในขั้นต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- พีระวรรณ พัฒรวิภาส. 2546. โรคกาบและใบไหม้ข้าวโพดที่เกิดจากเชื้อรา *Rhizoctonia solani*. หน้า 260-263. ใน : รายงานการประชุมวิชาการข้าวโพดข้าวฟ่างแห่งชาติ ครั้งที่ 31. 11-15 พฤษภาคม 2546. ณ โรงแรมโรสการ์เดนท์ เอไพรม 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 การทดสอบประสิทธิภาพเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา
Rhizoctonia solani บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

ไอโซเลข	ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง
1	38.44
2	35.56
3	39.00
4	37.89
5	88.89
6	39.44
7	39.44
8	37.22
9	36.56
10	36.44
11	39.83
12	39.22
13	73.33
14	86.11
15	37.56
16	88.89
17	88.89
18	77.33
19	37.11
20	41.44
21	88.89
22	44.44
23	55.00
24	41.44
25	39.78
26	40.57
27	39.78
28	36.56

ตารางที่ 1 การทดสอบประสิทธิภาพเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา
Rhizoctonia solani บนอาหารเลี้ยงเชื้อ (ต่อ)

ไอโซเลท	ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง
29	88.89
30	40.56
31	37.67
32	37.11
33	39.78
34	37.56
35	38.22
control	0