แผนงานวิจัย : วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตขยายและการใช้ประโยชน์ของชีวภัณฑ์สู่เชิงพาณิชย์

โครงการวิจัย : วิจัยสำรวจและศึกษาศักยภาพชีวภัณฑ์ควบคุมศัตรูพืชทางการเกษตร

กิจกรรม : สำรวจและศึกษาศักยภาพชีวภัณฑ์ในการควบคุมโรคพืช

การคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุม เชื้อรา *Fusarium moniliforme* สาเหตุโรคต้นเน่าของข้าวโพด

Selection and efficacy test of Antagonistic Bacteria for control corn stalk rot caused by *Fusarium moniliforme*

พีระวรรณ พัฒนวิภาส[1] ธารทิพย ภาสบุตร[1] บุษราคัม อุดมศักดิ์[1]

[1] กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ABSTRACT

Corn stalk rot from Nakhonratchasima province were collected and identified as *Fusarium moniliforme*. One hundred and twenty-four isolates of antagonist were screened for inhibit *F. moniliforme*. The result shown that six isolates of antagonist were effected to inhibit *F. moniliforme*. The inhibition zone were evaluated that antagonist isolate 20W6, NA12, 16W5, 19W5, NA16 and 20W23 were 4.25, 4.25, 3.05, 2.00, 3.50 and 4.50 cm. respectively while non-treated with antagonist was 0. Field trial at Pakchong District, Nakhonratchasima province were evaluated for disease incidence, the result showed that antagonist isolate NA 16, 16W5 and NA16 were 20.92, 22.80 and 23.05 % respectively while non-treated with antagonist was 33.01%

Keywords: Fusarium Stalk Rot, *Fusarium moniliforme*

บทคัดย่อ

การคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุม เชื้อรา *Fusarium moniliforme* สาเหตุโรคต้นเน่าของข้าวโพด ดำเนินการทดลองระหว่างเดือนตุลาคม 2559 ถึง เดือนกันยายน 2560 โดยสำรวจและเก็บตัวอย่างข้าวโพดที่แสดงอาการต้นเน่า จากแหล่งปลูกในจังหวัดนครราชสีมา นำมาแยกเชื้อโดยวิธี tissue transplanting method พบว่าเป็นเชื้อรา *F. moniliforme* สาเหตุโรคต้นเน่าของข้าวโพด จากนั้นนำมาทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *F. moniliforme* . ในห้องปฏิบัติการ โดยฟื้นฟูเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ จำนวน 124 ไอโซเลท และทดสอบประสิทธิภาพเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ได้ฟื้นฟู จำนวนรวม 124 ไอโซเลท ผลการทดลองพบว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จำนวน 6 ไอโซ

เลท ได้แก่ 20W6, NA12, 16W5, 19W5, NA16 และ 20W23 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. moniliforme* ในห้องปฏิบัติการ โดยมีค่าเฉลี่ยของ Inhibition zone 4.25, 4.25, 3.05, 2.00, 3.50 และ 4.50 เซนติเมตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่มีค่าเฉลี่ยของ Inhibition zone 0 ทำการทดสอบในสภาพแปลงทดลองที่ อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมา ประเมินการเกิดโรคข้าวโพดเมื่อข้าวโพดอายุ 100-120 วัน พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท NA 16 มีประสิทธิภาพสูงสุดโดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 20.92 รองลงมาได้แก่ 16W5 และ NA16 โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 22.80 และ 23.05 ตามลำดับ แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีที่ปลูก เชื้อรา *F. moniliforme* มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 33.01
Keywords: โรคต้นเน่าของข้าวโพด, Fusarium Stalk Rot, *Fusarium moniliforme*

รหัสการทดลอง 03-05-59-01-02-00-04-60

คำนำ

โรคต้นเน่าเกิดจากเชื้อฟิวซาเรี่ยม(Fusarium Stalk Rot) เกิดจากเชื้อรา *Fusarium moniliforme* Sheld. เชื้อราสาเหตุจัดอยู่ใน Order : Moniliales Family : Tuberculariaceae เชื้อราสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศ บนเส้นใยสีขาวอมชมพูบนกาบใบและตามข้อ สปอร์มีสองขนาด ขนาดใหญ่ (macroconidia) ยาวตรง โค้งแหลมเรียวที่ปลายมีขนาดระหว่าง 2.4-4.5 x 15-60 ไมครอน มีผนังกั้น 3-7 เซลล์ สปอร์ขนาดเล็ก (microconidia) มีขนาด 2-3 x 5-12 ไมครอน สร้างเป็นเส้นสายยาวคล้ายลูกโซ่จำนวนมาก บนแขนงเส้นใยเชื้อรา เชื้อ *F. moniliforme* var. *subglutinans* สปอร์ขนาดใหญ่มีความโค้งน้อยกว่าและมีจำนวนผนังกั้น 3 เซลล์ ส่วนสปอร์ขนาดเล็กเกิดเดี่ยวๆไม่ต่อกันเป็นเส้นสาย(ชุติมันต์ และเตือนใจ, 2545) ต้นที่เป็นโรคจะสังเกตพบว่าใบต้นที่เป็นโรคสลดสีเขียวอมเทาต่อมาจะไหม้แห้งตาย ลำต้นส่วนล่างไม่แข็งแรง จะมีลักษณะเป็นแผลสีน้ำตาลอ่อนถึงสีน้ำตาลเข้ม บริเวณแผลจะแห้งยุบตัวลง ลำต้นแตกหรือฉีกบริเวณเหนือดิน เมื่อผ่าดูจะพบเส้นใยของเชื้อราสีขาวปกคลุมบริเวณแผลภายในลำต้น (ไส้) จะมีลักษณะเป็นสีชมพูหรือม่วง ต่อมาลำต้นจะกลวงเพราะถูกเชื้อราย่อยสลาย เมื่อถูกลมพัดต้นหักล้มได้ง่าย เชื้อราสามารถติดมากับเมล็ด หรืออาศัยในดินและเศษซากพืชที่เป็นโรคนี้ เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมประกอบกับบริเวณราก ลำต้นข้าวโพด ถูกแมลงทำลายทำให้เกิดแผล เชื้อโรคจะเข้าทำลายได้ง่ายขึ้น เชื้อโรคสามารถแพร่กระจายอยู่ในลำต้นและติดไปกับเมล็ดได้อีก จึงหมุนเวียนต่อไป นอกจากนี้สามารถแพร่กระจายไปตามลม จากการสร้างสปอร์ 2 ขนาดคือ Macroconidia (สปอร์ขนาดใหญ่) และMicroconidia (สปอร์ขนาดเล็ก) ซึ่งจะพบสปอร์บนเส้นใยสีชมพูอมม่วงหรือชมพูอมส้ม เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสม เชื้อที่ปลิวไปในอากาศสามารถเข้าทำลายข้าวโพดโดยตรงได้ทางรู้เปิดตามธรรมชาติที่มีความชื้น เช่น บริเวณกาบใบ(ชุติมันต์ และเตือนใจ, 2545; สมเกียรติ และคณะ, 2524)

แบคทีเรียกลุ่ม Bacillus สามารถพบได้ทั่วไปในดินปลูก ปุ๋ยคอก วัสดุปลูก รากพืช และผิวใบ เจริญเติบโตได้โดยใช้สารอาหารจากการย่อยสลายของซากพืชและสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ เป็นแบคทีเรียประเภท aerobic bacteria ที่สร้างสปอร์ที่เรียกว่าเอ็นโดสปอร์ (endospore) ที่มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อม เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสม *B. subtilis* ก็สามารถงอกกลับเป็นเซลล์แบคทีเรียได้ใหม่ ทำให้สามารถเพิ่มปริมาณได้ดี

ในสภาพธรรมชาติ สามารถสร้างสารปฏิชีวนะ ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรคพืช (Baker and Cook, 1974)

ในประเทศไทยได้มีการศึกษาจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มาใช้ในการควบคุมโรคพืช ณัฏฐิมา และ คณะ (2556) ได้รายงานการศึกษา แบคทีเรีย *B. subtilis* จำนวน 135 ไอโซเลท ทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวของขิง ในห้องปฏิบัติการสามารถคัดเลือกได้แบคทีเรียปฏิปักษ์ จำนวน 8 ไอโซเลท (BSDOA24, BS-DOA 69, BS-DOA 97, BS-DOA 108, BS-DOA 114, BS-DOA 123 BS-DOA 125 และBS-DOA 132) จากนั้นนำแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้งหมดไปทดสอบความสามารถในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงในสภาพเรือนทดลอง พบว่าแบคทีเรีย *B. subtilis* BS-DOA 24 และ BS-DOA 123 สามารถควบคุมโรคเหี่ยวของขิงได้ร้อยละ 60 นำแบคทีเรีย *B. subtilis* BS-DOA 24 และ BS-DOA 123 ไปทดสอบในสภาพแปลงทดลอง พบว่า *B. subtilis* BS-DOA 24 สามารถควบคุมโรคได้ร้อยละ 68 จากนั้นนำแบคทีเรีย *B. subtilis* BS-DOA 24 ไปพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์สูตรผงสำเร็จอย่างง่าย โดยใช้ผง talcum เป็นสารพาในอัตรา 1:4 (V:W) ได้ปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์ 1.1×10^{10} หน่วยโคโลนี/กรัม ชีวภัณฑ์นี้เก็บรักษาได้เป็นเวลา 12 เดือน ที่อุณหภูมิห้อง และ 15 เดือน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงในเรือนทดลองได้ร้อยละ 60 และมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงในสภาพแปลงทดลองที่มีการระบาดของโรคเหี่ยวของขิงได้ร้อยละ 62-65 จากนั้นนำชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ BS-DOA 24 ไปทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงในสภาพแปลงเกษตรกร ที่จังหวัดเพชรบูรณ์ พบว่ามีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงในแปลงเกษตรกรร้อยละ 62 และได้ผลผลิต 2,260 กิโลกรัม/ไร่ ผลจากการวิจัยนี้สามารถนำ ชีวภัณฑ์แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ BS-DOA 24 ที่ได้พัฒนาเป็นต้นแบบไปขยายผลสู่การผลิตเชิงพาณิชย์

บุษราคัม และ คณะ (2557) ได้รายงานการศึกษา *B. subtilis* ในการควบคุมโรคใบจุดคะน้า ในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่า ไอโซเลท 20W1, 20W5, 20W4, 20W12 และ 17G18 มีศักยภาพสูงสุด นำทั้ง 5 ไอโซเลทไปทดสอบการควบคุมโรคเบื้องต้นในโรงเรือนโดยพ่น cell suspension ของ *Bacillus* spp. ก่อนปลูกเชื้อ *A. brassicicola* พบว่า ทุกไอโซเลทสามารถลดการเกิดโรคได้ โดยมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคเท่ากับ 46.77, 52.81, 59.99, 60.45 และ 71.31 ตามลำดับ โดยที่กรรมวิธีที่ไม่มีการพ่นด้วย *Bacillus* spp. มีค่าเท่ากับ 73.79 นำทั้ง 5 ไอโซเลทไปทดสอบในแปลงปลูกที่ อ.ท่ามะกา จ.กาญจนบุรี โดยวิธีพ่นด้วย cell suspension พบว่า กรรมวิธีที่พ่นด้วย cell suspension ของ *Bacillus* spp. ทุกไอโซเลท มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคต่ำกว่ากรรมวิธีที่ไม่มีการพ่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากนั้นนำทั้ง 5 ไอโซเลทมาพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์สูตรผง พบว่า กรรมวิธีที่พ่นด้วยชีวภัณฑ์ *Bacillus* spp. ทั้ง 5 ไอโซเลทมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคต่ำกว่ากรรมวิธีที่ไม่มีการพ่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ไอโซเลท 20W1 มีประสิทธิภาพสูงสุดในการควบคุมโรคใบจุด สามารถลดการเกิดโรคได้เท่ากับ 32.88% การทดสอบอัตราการใช้ของ ชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ไอโซเลท 20W1 พบว่า อัตรา 20 - 30 กรัม/น้ำ 20 ลิตร ให้ผลดีเทียบเท่ากับการพ่นด้วยสาร mancozeb 80% WP และอัตรา 40 – 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตร ให้ผลดีกว่าการพ่นด้วยสาร mancozeb 80% WP อัตรา 40 กรัม/น้ำ 20 ลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

พากเพียร และ คณะ (2544) ได้ทดสอบ เชื้อ *B. subtilis* ซึ่งได้รับการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สูตรเหลว (TRF สูตร A และ TRF สูตร B) ในการควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าว (*Rhizoctonia solani* Khun.) ในสภาพแปลง พบว่า การใช้ TRF สูตร A, TRF สูตร B, Larminar WP, Agroguard Liq. มีเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรค 50.48, 52.53, 54.59 และ 55.18 ตามลำดับ ต่ำกว่ากรรมวิธีเปรียบเทียบซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรค 65.46% อย่างนัยสำคัญทางสถิติ

เชื้อรา *F. moniliforme* สาเหตุโรคถอดฝักดาบมีรายงานว่าทำให้ผลผลิตของข้าวลดลง 70 เปอร์เซ็นต์ในภาคเหนือของออสเตรเลีย (Heaton and Morschel,1965) และพบว่าจุลินทรีย์แบคทีเรียปฏิปักษ์ที่แยกได้จากดินนา หรือส่วนต่างๆ ของต้นข้าว มีศักยภาพในการป้องกันและกำจัดโรคถอดฝักดาบของข้าวได้ (Rosales *et al*,1986; Rosales and Mew, 1997; Kazempour and Elahinia, 2007) มีรายงานการทดสอบประสิทธิภาพของผงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคถอดฝักดาบของข้าวในแปลงนาพบว่า ทดสอบประสิทธิภาพของผงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคถอดฝักดาบของข้าวในแปลงนา ดำเนินการทดลองในนาเกษตรกร อำเภอเมืองพะเยา จังหวัดพะเยา ในฤดูนาปี 2552 และ 2553 8 กรรมวิธี ได้แก่ 1. กรรมวิธีควบคุม (control) 2.แบคทีเรียปฏิปักษ์ BAK-016 3.แบคทีเรียปฏิปักษ์ BAK-088 4.แบคทีเรียปฏิปักษ์ BAK-102 5.แบคทีเรียปฏิปักษ์ BAK-117 6.แบคทีเรียปฏิปักษ์ BAK-131 7.น้ำส้มควันไม้ (wood vinegar) 8.สารป้องกันกำจัดโรคพืช mancozeb+carbendazim ผลการทดลอง ปี 2552 ไม่มีความแตกต่างทางสถิติระหว่างกรรมวิธีในระยะแตกกอ การใช้สารป้องกันกำจัดโรคพืช mancozeb+carbendazim ให้ผลในการควบคุมโรคดีที่สุด โดยเกิดโรคน้อยที่สุด 8.2 เปอร์เซ็นต์ กรรมวิธีที่ให้ผลดีรองลงมาคือ การใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ BAK-131 และ BAK-088 เกิดโรคถอดฝักดาบ 8.9 และ 9.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ขณะที่กรรมวิธีควบคุม (control) เกิดโรคสูงกว่า คือ 10.9 เปอร์เซ็นต์ สำหรับผลผลิตของข้าว พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเช่นกัน การใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ BAK-088 ให้ผลผลิตข้าวสูงสุด 596 กิโลกรัมต่อไร่ สูงกว่าการใช้สารป้องกันกำจัดโรคพืช mancozeb+carbendazim ที่ให้ผลผลิตข้าวต่ำสุด 556 กิโลกรัมต่อไร่ ผลการทดลองในปี 2553 ไม่มีความแตกต่างทางสถิติระหว่างกรรมวิธีในระยะกล้า การใช้สารป้องกันกำจัดโรคพืช mancozeb+ carbendazim เกิดโรคน้อยที่สุด 0.03 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือการใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ BAK-016 และ BAK-131 เกิดโรคถอดฝักดาบ 0.31 และ 0.40 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ น้อยกว่ากรรมวิธีควบคุมที่ข้าวเกิดโรค 1.48 เปอร์เซ็นต์ ในระยะแตกกอ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกรรมวิธี การใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ BAK-131 เกิดโรคน้อยที่สุด 1.30 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งน้อยกว่าการใช้สารป้องกันกำจัดโรคพืช mancozeb+carbendazim ที่ข้าวเกิดโรค 1.47 เปอร์เซ็นต์ และน้อยกว่ากรรมวิธีควบคุม ที่ข้าวเกิดโรค มากที่สุด 3.87 เปอร์เซ็นต์ สำหรับผลผลิตของข้าว มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกรรมวิธี พบว่าการใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ BAK-102 ให้ผลผลิตข้าวสูงสุด 647 กิโลกรัมต่อไร่ สูงกว่าการใช้สารป้องกันกำจัดโรคพืช mancozeb+carbendazim และ กรรมวิธีควบคุม ที่ให้ผลผลิต 516 และ 547 กิโลกรัมต่อไร่ ตามลำดับ (รัศมี และคณะ, 2554)

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เก็บตัวอย่างโรคพืช ได้แก่ กรรไกรตัดแต่งกิ่ง ถุงพลาสติกสำหรับเก็บตัวอย่าง กระดาษหนังสือพิมพ์ ปากกาเคมี หนังยาง

2. สารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ แอธิลแอลกอฮอล์ 75%

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA), water agar (WA)

4. วัสดุอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ จานอาหารเลี้ยงเชื้อ ขวดดูแรน บีกเกอร์ กระบอกตวง ใบมีดผ่าตัด เข็มเขี่ยปลายแหลม สไลด์ cover slip

5. ตู้ปลอดเชื้อ หม้อนึ่งความดัน ตู้อบความร้อน เครื่องชั่ง

6. กล้องจุลทรรศน์

7. กระถาง ดินปลูกพืช เมล็ดพันธุ์ข้าวโพด

วิธีการ

<u>ขั้นตอนที่ 1</u>

1. <u>การศึกษาการป้องกันกำจัดเชื้อข้อมูลวิธีการป้องกันและกำจัดเชื้อรา *F. moniliforme* โดยชีววิธี ในห้องปฏิบัติการ (ปี 2560)</u>

1.1 การเก็บตัวอย่างเชื้อรา *F. moniliforme* และการแยกเชื้อ

สำรวจและเก็บตัวอย่างเชื้อรา *F. moniliforme* จากแหล่งปลูกในไร่ เกษตรกร นำมาแยกเชื้อโดยวิธี tissue transplanting method จากส่วนของขอบแผลจากพืชที่เป็นโรค โดยตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาดเล็กฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอร็อก 10 เปอร์เซ็นต์แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ จากนั้นจึงวางบนอาหารพีดีเอ (potato dextrose agar; PDA) ทุกขั้นตอนปฏิบัติงานโดยเทคนิคปลอดเชื้อ นำไปบ่มไว้ในอุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส หลังจากที่มีเชื้อเจริญออกมาจากขอบแผล ตรวจสอบลักษณะของเชื้อที่แยกได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ย้ายเชื้อเก็บรักษาในหลอดอาหารเพื่อเป็น stock culture

1.2 การทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *F. moniliforme* ในห้องปฏิบัติการ

นำจุลินทรีย์ที่เก็บไว้ในหน่วยเก็บจุลินทรีย์โรคพืช มาทดทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *F. moniliforme* ในห้องปฏิบัติการ โดยเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร PDA เมื่อเชื้อราอายุ 2 วัน ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร เจาะบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อนำมาวางตรงกลางอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ใช้ loop ที่เผาไฟฆ่าเชื้อแล้วแตะโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแบททีเรียทดสอบไอโซเลทต่างๆ ที่เลี้ยงบนอาหาร RNV อายุ 24 ชั่วโมง ลงบนจานเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อรา *F. moniliforme* โดยขีดเชื้อจุลินทรีย์มีความยาว 1 ซม. จำนวน 4 จุด ตรงข้ามกันในแนวกากบาทให้ห่างจากเชื้อรา 4 ซม. บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง

<u>การบันทึกข้อมูล</u> บันทึกผลการทดลองโดยวัดความกว้างบริเวณใส (clear zone) ระหว่างแนวเส้น *Bacillus* spp. ถึงขอบเชื้อรา *F. moniliforme* ทั้ง 4 ด้าน นำมาคำนวณเป็นค่าเฉลี่ย inhibition zone โดยตรวจผลเมื่อเชื้อรา *F. moniliforme* เจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากนั้น คัดเลือกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุด ไปทดสอบประสิทธิภาพในระดับเรือนทดลอง

<u>ขั้นตอนที่ 2</u>

<u>1. การทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อรา *F. moniliforme* ในสภาพเรือนทดลอง</u>

นำจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *F. moniliforme* มาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อรา *F. moniliforme* ในสภาพเรือนทดลองที่มีการปลูกเชื้อให้กับพืชอาศัยของเชื้อรา *F. moniliforme* มีขั้นตอนการทดลองดังนี้

1.1 การปลูกพืชทดสอบ

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

1.2 การเพิ่มปริมาณเชื้อรา *F. moniliforme* 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 เขี่ยชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยของเชื้อเจริญอยู่ลงไปในถุงข้าวฟ่างที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เมื่อเริ่มมีการเจริญของเส้นใยบนเมล็ดข้าวฟ่าง เขย่าถุงเพื่อให้เชื้อกระจาย ไม่เกาะเป็นก้อนแข็ง บ่มไว้เป็นเวลา 3 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำเมล็ดข้าวฟ่างที่มีเชื้อเจริญอยู่มาบุบให้แตกเพื่อให้มีขนาดเล็กลงและมีความสม่ำเสมอ นำเชื้อที่เตรียมได้ไปปลูกเชื้อให้กับพืชที่ปลูกในเรือนทดลอง

1.3 การพ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ตามชนิดที่ได้จากผลการทดลองในห้องปฏิบัติการ

ปลูกข้าวโพดทดสอบ ปลูกเชื้อและพ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ตามกรรมวิธี ทุก 7 วัน จำนวน 4 ครั้ง ประเมินความรุนแรงโรคก่อนพ่นจุลินทรีย์ทุกครั้ง และหลังพ่นจุลินทรีย์ครั้งสุดท้าย 7 วัน

<u>ขั้นตอนที่ 3</u>

<u>1. การคัดเลือกและทดสอบศักยภาพแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุม เชื้อรา *F. moniliforme* ในแปลงทดลอง</u>

นำจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ที่ได้ผ่านการคัดเลือกจากห้องปฏิบัติการและเรือนทดลอง มาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคในสภาพแปลงทดลอง

1.1 การปลูกพืชทดสอบ

ปลูกข้าวโพดพันธุ์อ่อนแอ จำนวน 2 ต้น/หลุม ขนาดแปลงย่อย 1.5x2.5 เมตร จำนวน 2 แถว โดยใช้ระยะห่างระหว่างแถวเท่ากับ 75 เซ็นติเมตร ระยะระหว่างต้น 25 เซ็นติเมตร

1.2 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์

นำเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ทดสอบแล้วว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. moniliforme* มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PSB (Physic Soil Bloth) จากนั้นเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในรูปผงเชื้อ

1.3 การเตรียมเชื้อรา *F. moniliforme* เพื่อใช้ในการปลูกเชื้อ

เตรียมเชื้อรา *F. moniliforme* ตามขั้นตอนที่ 2 สำหรับใช้ในการปลูกเชื้อ

1..4 การทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์

เมื่อข้าวโพดอายุ 14 วัน ราดจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ทุก 7 วัน จำนวน 6 ครั้ง

วางแผนการทดลองแบบ RCB จำนวน 4 ซ้ำ มีกรรมวิธีราดน้ำเปล่าเป็นกรรมวิธีเปรียบเทียบ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ปลูกเชื้อ+พ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ 20W6

กรรมวิธีที่ 2 ปลูกเชื้อ+พ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ NA12

กรรมวิธีที่ 3 ปลูกเชื้อ+พ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ 16W5

กรรมวิธีที่ 4 ปลูกเชื้อ+พ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ 19W5

กรรมวิธีที่ 5 ปลูกเชื้อ+พ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ NA16

กรรมวิธีที่ 6 ปลูกเชื้อ+พ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ และ 20W23

กรรมวิธีที่ 7 ปลูกเชื้อ+พ่นน้ำเปล่า

กรรมวิธีที่ 8 ไม่ปลูกเชื้อ

เมื่อข้าวโพดอายุ 100-120 วัน ประเมินการเกิดโรค โดยนับจำนวนต้นทั้งหมด และจำนวนต้นที่แสดงอาการของโรค นำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค

เวลาและสถานที่

ตุลาคม 2559 – กันยายน 2561

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

แปลงเกษตรกร อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมา

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

<u>การเก็บตัวอย่างเชื้อรา *F. moniliforme* และการแยกเชื้อ</u>

สำรวจและเก็บตัวอย่างข้าวโพดที่แสดงอาการต้นเน่า จากแหล่งปลูกในจังหวัดนครราชสีมา นำมาแยกเชื้อโดยวิธี tissue transplanting method หลังจากที่มีเชื้อเจริญออกมาจากขอบแผล ตรวจสอบลักษณะของเชื้อที่แยกได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ย้ายเชื้อเก็บรักษาในหลอดอาหารเพื่อเป็น stock culture นำเชื้อราสาเหตุที่แยกได้มาพิสูจน์โรคตามวิธีการของ Koch (koch’s postulation) เมื่อข้าวโพดแสดงอาการของโรคนำมาแยกเชื้อราซ้ำอีกครั้งพบว่าเป็นเชื้อรา *F. moniliforme* สาเหตุโรคต้นเน่าของข้าวโพด

<u>การทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *F. moniliforme* ในห้องปฏิบัติการ</u>

ได้ฟื้นฟูเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ จำนวน 124 ไอโซเลท และทดสอบประสิทธิภาพเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ได้ฟื้นฟู จำนวนรวม 124 ไอโซเลท พบว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ 20W6, NA12, 16W5, 19W5, NA16 และ 20W23 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. moniliforme* ในห้องปฏิบัติการ โดยมีค่าเฉลี่ยของ Inhibition zone คือ 4.25,
4.25, 3.05, 2.00, 3.50 และ 4.50 เซนติเมตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่มีมีค่าเฉลี่ยของ Inhibition zone เท่ากับ 0 (ตารางที่ 1)

<u>การทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อรา *F. moniliforme* ในสภาพเรือนทดลอง</u>

ปลูกข้าวโพดทดสอบ ปลูกเชื้อและพ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ตามกรรมวิธี ทุก 7 วัน จำนวน 4 ครั้ง ประเมินความรุนแรงโรค พบว่าข้าวโพดไม่แสดงอาการของโรค เนื่องจากสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม จึงทำการทดลองซ้ำโดยเพิ่มปริมาณเชื้อ *F. moniliforme* ในดินปลูก และปลูกข้าวโพด ประเมินการเกิดโรคข้าวโพดทดสอบในเรือนทดลอง ข้าวโพดไม่แสดงอาการเกิดโรค อาจเนื่องจากสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม

<u>การคัดเลือกและทดสอบศักยภาพแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุม เชื้อรา *F. moniliforme* ในแปลงทดลอง</u>

ประเมินการเกิดโรคข้าวโพดทดสอบในสภาพแปลงทดลองที่ อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมา ข้าวโพด พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท NA 16 มีประสิทธิภาพสูงสุดโดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 20.92 รองลงมาได้แก่ 16W5 และ NA16 โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 22.80 และ 23.05 ตามลำดับไม่แตกต่างทางสถิติ แต่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีที่ปลูก เชื้อรา *F. moniliforme* มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 33.01 แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท 20W6, 19W5, 20W23 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 30.94, 25.82 และ 32.03 ตามลำดับ ไม่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีที่ปลูก เชื้อรา *F. moniliforme* (ตารางที่ 2)

จากผลการทดลองจะเห็นว่า แบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในห้องปฏิบัติการคือ ไอโซเลท 19W5 แต่เมื่อนำมาทดสอบในแปลงทดลองในรูปผงเชื้อ พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท NA 16 มีประสิทธิภาพสูงสุด ทั้งนี้อาจเป็นเพราะสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมต่อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุม เชื้อรา *F. moniliforme* ซึ่งบุษราคัมและคณะ(2557) ได้รายงานการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ด้วย cell suspension จำนวน 5 ไอโซเลท ในการควบคุมโรคใบจุดคะน้า พบว่า แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท 20W4 มีประสิทธิภาพสูงสุด แต่เมื่อนำมาพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์สูตรผงพบว่า แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท 20W1 มีประสิทธิภาพสูงสุดในการควบคุมโรคใบจุดคะน้า

สรุปผลการทดลอง

การคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุม เชื้อรา *Fusarium moniliforme* สาเหตุโรคต้นเน่าของข้าวโพด โดยทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *F. moniliforme* ในห้องปฏิบัติการ จำนวน 124 ไอโซเลท ผลการทดลองพบว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ 20W6, NA12, 16W5, 19W5, NA16 และ 20W23 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. moniliforme* ในห้องปฏิบัติการ โดยมีค่าเฉลี่ยของ Inhibition zone 4.25, 4.25, 3.05, 2.00, 3.50 และ 4.50 เซนติเมตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่มีค่าเฉลี่ยของ Inhibition zone 0 นำแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ได้มาทดสอบในเรือนทดลอง ไม่พบการเกิดโรค อาจเนื่องจากสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม ทำการทดสอบในสภาพแปลงทดลองที่ อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมา ประเมินการเกิดโรคข้าวโพดเมื่อข้าวโพดอายุ 100-120 วัน พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท NA 16 มีประสิทธิภาพสูงสุดโดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 20.92 รองลงมาได้แก่ 16W5 และ NA16 โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 22.80 และ 23.05 ตามลำดับ แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีที่ปลูก เชื้อรา *F. moniliforme* มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 33.01

เอกสารอ้างอิง

ชุติมันต์ พานิชศักดิ์พัฒนา และเตือนใจ บุญ-หลง. 2545. โรคข้าวโพดและการป้องกันกำจัดกองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร.69 หน้า.

รัศมี ฐิติเกียรติพงศ์, ปิยะพันธ์ ศรีคุ้ม, วิชชุดา รัตนากาญจน์ และ วันพร เข็มมุกด์. 2554. ประสิทธิภาพของผงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคถอดฝักดาบของข้าวในแปลงนา: . หน้า 282-290. *ใน* ประชุมวิชาการข้าวและธัญพืชเมืองหนาว ประจำปี 2554. กรมการข้าว กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ 331 หน้า

ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล, บูรณี พั่ววงษ์แพทย์, ทิพวรรณ กันหาญาติ และ รุ่งนภา ทองเคร็ง. 2556. การพัฒนาชีวภัณฑ์แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ BS-DOA 24 ในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงที่เกิดจากแบคทีเรีย.หน้า 51-66. *ใน* ผลงานวิจัยดีเด่น กรมวิชาการเกษตร. ประจำปี 2556 กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ . 354 หน้า .

บุษราคัม อุดมศักดิ์, ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล, สุรีย์พร บัวอาจ, บูรณี พั่ววงษ์แพทย์ และ รสสุคนธ์ รุ่งแจ้ง. 2557. พัฒนาแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ใหม่ ในการควบคุมโรคใบจุดคะน้าสาเหตุจากเชื้อรา *Alternaria brassicicola.* หน้า 1- 16. *ใน* ผลงานวิจัยดีเด่น กรมวิชาการเกษตร. ประจำปี 2557 กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ . 224 หน้า .

พากเพียร อรัญนารถ, นงรัตน์ นิลพานิชย์, วิชิต ศิริสันธนะ และ สมคิด ดิสถาพร. 2544. ประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ *Bacillus subtilis* ในการควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าว. วารสารวิชาการเกษตร ม.ค.- เม.ย. 2544, 19(1) : 4-12.

พัฒนา สนธิรัตน์ ประไพศรี พิทักษ์ไพรวัน ธนวัฒน์ กำแหงฤทธิรงค์ วิรัช ชูบำรุง และ อุบล คือประ

โคน. 2537. ดรรชนีโรคพืชในประเทศไทย. กลุ่มงานวิทยาไมโค กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร. 285 หน้า

สมเกียรติ ฐิตะฐาน ดิลก อัญชลิสังกาศ วีระ แจ่มกระจ่าง และนิยม จิ้วจิ้น. 2524. เอกสารทางวิชาการเรื่องโรคข้าวโพด สาขาโรคพืชไร่ กองวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 22 หน้า.

Baker, K.F. and R.J. Cook. 1974. Biological Control of Soil-Borne Pathogens. W.H. Freeman and Co., San Francisco. 433 p.

Heaton, J.B. and J.R. Morschel. 1965. A foot rot disease of rice variety Bluebonnet, in northern territory, Australia, caused by *F. moniliforme* Sheldon. Trop. Sci. 7:116- 121.

Kazempour, M.N. and S.A. Elahinia. 2007. Biological control of *Fusarium fujikuroi,* the causal agent of bakanae disease by rice associated antagonistic bacteria. Bulg. J. Agric. Sci., 13: 393-408.

Rosales, A.M., F.L.Nugue and T.W.Mew. 1986. Biological control of bakanae disease of rice. Phil. Phytopath. 22:29-35.

Rosales, A.M. and T.W. Mew. 1997. Suppression of *Fusarium moniliforme* in rice by rice-associated antagonistic bacteria. Plant Dis. 81:49-52.

Table 1 Antagonists efficacy test for *Fusarium moniliforme* : causal agent of corn stalk rot .

	isolate	Inhibition zone(cm.)
1	20W6	4.25
2	NA12	4.25
3	16W5	3.05
4	19W5	2.00
5	NA16	3.50
6	20W23	4.50
	control	0

Table 2 Antagonists efficacy test for corn stalk rot causes by *F. moniliforme* on farm in Nakornratchasima province.

treatments	rate / 20 litres (g./ml.)	Disease incidence (%)
1. *F. moniliforme* + 20 W 6	60	30.94 cd
2. *F. moniliforme* + NA 12	60	25.82 bcd
3. *F. moniliforme* + 16 W 5	60	22.80 bc
4. *F. moniliforme* + 19 W 5	60	23.05 bc
5. *F. moniliforme* + NA 16	60	20.92 b
6. *F. moniliforme*+20W23	60	32.03 cd
7. *F. moniliforme*	-	33.01 d
8. untreated	-	0.00 a
c.v.(%)		28.69