

การควบคุมโรคใบไหม้แผลใหญ่โดยชีววิธี
Biocontrol of Northern Corn Leaf Blight

พิระวรรณ พัฒนาการวิภาส¹ บุรณี พัวพงษ์แพทย์¹

ทัศนพร ทัศนคร¹ ศิวไล ลภภรรจบ²

¹กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

²ศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์ สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 5

บทคัดย่อ

เก็บตัวอย่างใบข้าวโพดที่แสดงอาการของโรคใบไหม้แผลใหญ่มาทำการแยกเชื้อและศึกษาเชื้อที่แยกได้พบว่าเป็น *Exerohilum turcicum* จำนวน 3 isolate นำเชื้อที่แยกได้จำนวน 1 isolate มาทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *E. turcicum* ในห้องปฏิบัติการกับจุลินทรีย์ที่แยกได้จากใบข้าวโพดที่บริเวณผิวพืชโดยวิธี leaf wash technique ในปี พ.ศ. 2551 ทดสอบลินทรีย์จำนวน 25 isolate บนอาหาร PDA พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ จำนวน 3 ไอโซเลท แสดงปฏิกริยายับยั้งเชื้อ *E. turcicum* หลังการทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA 7 วัน และในปี พ.ศ. 2552 ทดสอบลินทรีย์จำนวน 31 isolate บนอาหาร PDA พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ จำนวน 22 ไอโซเลท แสดงปฏิกริยายับยั้งเชื้อ *E. turcicum* หลังการทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA 7 วัน

คำนำ

โรคใบไหม้แผลใหญ่ของข้าวโพดที่เกิดจากเชื้อรา *Exerohilum turcicum* เป็นโรคหนึ่งที่ระบาดรุนแรงในหลายพื้นที่ โดยเฉพาะในเขตภาคตะวันตก และภาคเหนือ เช่น จ.กาญจนบุรี จ.เพชรบุรี จ.ราชบุรี และ จ.เชียงใหม่ โรคนี้พบได้ตลอดฤดูเพาะปลูก โดยเฉพาะในช่วงที่มีอุณหภูมิต่ำและความชื้นสูงโรคจะระบาดรุนแรงมาก (กองโรคพืชและจุลชีววิทยา, 2545) นอกจากนี้ปัจจุบันยังพบการเกิดโรคเพิ่มขึ้นในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จากการจัดทำบัญชีรายชื่อโรคและเชื้อสาเหตุโรคของข้าวโพดเพื่อการนำเข้า ในปี 2547 พีระวรรณ และคณะ (2549) ได้ทำการสำรวจโรคในแหล่งปลูกข้าวโพดในเขตภาคกลาง ภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จำนวน 4 จังหวัด พบการระบาดของโรคใบไหม้แผลใหญ่ใน จ.นครราชสีมา จ.นครพนม และ จ.ตาก และในปี 2548 ได้ทำการสำรวจโรคในเขตภาคกลาง ภาคตะวันตก ภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จำนวน 4 จังหวัด พบการระบาดของโรคใน จ.สุโขทัย จ.ตาก และ จ.นครราชสีมา ในปีการผลิต 2549 พบว่า โรคใบไหม้แผลใหญ่มีการระบาดรุนแรง และทำความเสียหายต่อผลผลิตและคุณภาพข้าวโพดหวานในแหล่งผลิตที่สำคัญอย่างรุนแรง (สมาคมปรับปรุงพันธุ์พืชและขยายพันธุ์พืชแห่งประเทศไทย และคณะ, 2549) โรคใบไหม้แผลใหญ่มักเริ่มพบเมื่อข้าวโพดอายุประมาณ 45 วันหรือก่อนข้าวโพดออกดอก อาการเริ่มแรกพบแผลขนาดเล็กสีคล้ำยฟางข้าวบนใบข้าวโพดต่อมาแผลจะขยายมีขนาดใหญ่ยาวตามใบข้าวโพดเมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมจะพบอาการแผลบนใบข้าวโพดหลายแผลต่อบนใบและแผลขยายรวมกันมากขึ้น ทำให้ใบข้าวโพดแห้งตาย สามารถพบอาการของแผลได้บนกาบฝัก ข้าวโพดที่เป็นโรครุนแรงโดยเฉพาะเมื่อพบอาการบนกาบฝักจะทำให้ฝักไม่สมบูรณ์ (ชุติมันต์ และเตื่อนใจ, 2545; พีระวรรณและคณะ, 2549) การใช้สารเคมีเป็นวิธีการหนึ่งในการป้องกันกำจัดโรค แต่ปัจจุบันสารเคมีชนิดเดิมที่ใช้อยู่ไม่สามารถควบคุมการระบาดของโรคเนื่องจากเกษตรกรใช้สารเคมีในอัตราสูงและช่วงระยะเวลาไม่เหมาะสม ส่งผลให้เชื้อราสาเหตุโรคมีแนวโน้มต้านทานต่อสารเคมีมากขึ้น และต้นทุนการผลิตสูง ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทำการศึกษาวิธีอื่นเพื่อป้องกันกำจัดโรคใบไหม้แผลใหญ่ได้แก่ การศึกษาการควบคุมโดยชีววิธี เพื่อให้ได้วิธีการที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดโรคใบไหม้แผลใหญ่ ซึ่งจะเป็นการลดความเสียหายที่เกิดจากโรคลดต้นทุนการผลิต ได้ผลผลิตข้าวโพดที่มีคุณภาพ มาตรฐาน สามารถแข่งขันได้ในตลาดโลก รวมทั้งปลอดภัยต่อเกษตรกร และสิ่งแวดล้อม

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ถุงพลาสติกสำหรับเก็บตัวอย่าง กระดาษหนังสือพิมพ์
2. กล้องจุลทรรศน์
3. วัสดุอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ

วิธีการ

1. การแยกเชื้อสาเหตุโรคใบไหม้แผลใหญ่

เก็บใบข้าวโพดที่เป็นโรค นำมาแยกเชื้อด้วยวิธี Tissue Transplanting โดยตัดใบที่เป็นแผลเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาดเล็ก ฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอริก 10 เปอร์เซ็นต์แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ จากนั้นจึงวางบนอาหารพีดีเอ (potato dextrose agar; PDA) ที่มีส่วนผสมของ CaCO_3 อัตรา 0.85 กรัมต่อลิตร (ดัดแปลงจาก Tzeng *et al.*, 1992) นำไปบ่มไว้ในอุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส หลังจากที่มีเชื้อเจริญออกมาจากขอบแผล ตรวจสอบลักษณะของเชื้อที่แยกได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ย้ายเชื้อเก็บรักษาในหลอดอาหารเพื่อเป็น stock culture

2. การแยกเชื้อจุลินทรีย์จากใบข้าวโพด

เก็บใบข้าวโพดจากต้นที่ไม่เป็นโรคใบไหม้แผลใหญ่และจากต้นที่เป็นโรคใบไหม้แผลใหญ่ นำมาแยกหาเชื้อจุลินทรีย์ที่บริเวณผิวพืชโดยวิธี leaf wash technique บนอาหารเลี้ยงเชื้อ RNV เก็บเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้ไว้สำหรับทดสอบต่อไป

3. การทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *E. turcicum* ในห้องปฏิบัติการ

นำจุลินทรีย์ที่แยกได้ในข้อ 2 มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *E. turcicum* ในห้องปฏิบัติการ โดยเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร PDA เมื่อเชื้อราอายุ 5 วัน ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร เจาะบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อนำมาวางตรงกลางอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ใช้ loop ที่เผาไฟฆ่าเชื้อแล้วแตะโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแบทที่เรียทดสอบไอโซเลทต่างๆ ที่เลี้ยงบนอาหาร RNV อายุ 24 ชั่วโมง ลงบนจานเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อรา *E. turcicum* โดยขีดเชื้อจุลินทรีย์มีความยาว 1 ซม. จำนวน 4 จุด ตรงข้ามกันในแนวกากบาทให้ห่างจากเชื้อรา 4 ซม. วางแผนการทดลองแบบ CRD 4 ซ้ำ บ่มเชื้อไว้ในอุณหภูมิห้อง วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *E. turcicum* ในแต่ละไอโซเลทเปรียบเทียบกับการเจริญของเชื้อราเพียงอย่างเดียว คัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *E. turcicum* โดยเลือกไอโซเลทที่มีระดับการยับยั้งตั้งแต่ 80 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป เพื่อนำไปทดสอบในขั้นต่อไป

เวลาและสถานที่

ตุลาคม 2550- กันยายน 2553

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การแยกเชื้อสาเหตุโรคใบไหม้แผลใหญ่

เก็บตัวอย่างข้าวโพดที่เป็นโรคใบไหม้แผลใหญ่จากจังหวัดเชียงใหม่นำมาศึกษาบันทึกลักษณะอาการของโรคและแยกเชื้อบริสุทธิ์ ด้วยวิธี tissues transplanting method โดยตัดชิ้นส่วนของพืชที่เป็นโรคขนาด 3 x 5 ซม. ฆ่าเชื้อภายนอกด้วยคลอรีน 10 % เป็นเวลา 2 - 4 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้ออีก 2 ครั้งวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ในสภาพปลอดเชื้อบ่มเชื้อไว้นาน 2 - 3 วัน ทำ *hyphal tip isolation* นำเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ศึกษารูปร่าง และการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เชื้อเชื้อทำสไลด์ตรวจดูลักษณะรูปร่างด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่าสามารถแยกได้เชื้อ *E. turcicum* ต่อจากนั้นพิสูจน์โรคโดยวิธีของ Koch (*Kock 's postulate*) โดยนำเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้มาปลูกบนต้นข้าวโพดแล้วแยกเชื้อซ้ำอีกครั้ง พบว่าเชื้อที่เจริญบนอาหารเหมือนเดิม คือเชื้อ *E. turcicum*

2. การแยกเชื้อจุลินทรีย์จากใบข้าวโพด

จากการสุ่มเก็บใบข้าวโพดจากต้นที่ไม่เป็นโรคใบไหม้แผลใหญ่และจากต้นที่เป็นโรคใบไหม้แผลใหญ่ นำมาแยกหาเชื้อจุลินทรีย์ที่บริเวณผิวพืชโดยวิธี leaf wash technique สามารถเก็บเชื้อจุลินทรีย์ได้ 25 isolate ได้แก่ บ้านแก่งเสี้ยน อ. เมือง อ. ท่าม่วง จ. กาญจนบุรี จำนวน 3 isolate จาก ต. ปากช่อง และ ต. ชับม่วง อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมา จำนวน 4 isolate จาก อ. ม่วงเหล็ก จ. นครราชสีมา จำนวน 2 isolate จาก อ. ดำเนินสะดวก จ. ราชบุรี จำนวน 2 isolate อ. แม่ระมาด อ. แม่สอด จ. ตาก จำนวน 4 isolate จาก อ. วังม่วง จ. สระบุรี จำนวน 5 isolate จาก อ. สันทราย จ. เชียงใหม่ จำนวน 3 isolate จาก อ. น้ำปาด จ. อุตรดิตถ์ จำนวน 2 isolate นำจุลินทรีย์ที่แยกได้ทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อ *E. turcicum*

3. การทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา

E. turcicum ในห้องปฏิบัติการ

นำเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้และเชื้อจุลินทรีย์จากหน่วยเก็บรักษาจุลินทรีย์โรคพืชมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *E. turcicum* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ในปี พ.ศ. 2551 จำนวน 25 isolate พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ จำนวน 3 ไอโซเลท แสดงปฏิกริยายับยั้งเชื้อ *E. turcicum* หลังการทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA 7 วัน และในปี พ.ศ. 2552 ทดสอบจำนวน 31 isolate บนอาหาร PDA พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ จำนวน 22 ไอโซเลท แสดงปฏิกริยายับยั้งเชื้อ *E. turcicum* หลังการทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA 7 วัน

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

เก็บตัวอย่างใบข้าวโพดที่แสดงอาการของโรคใบไหม้แผลใหญ่มาทำการแยกเชื้อและศึกษาเชื้อที่แยกได้พบว่าเป็นเชื้อ *E. turcicum* นำเชื้อที่แยกได้จากใบข้าวโพดที่บริเวณผิวพืชโดยวิธี leaf wash technigue และเชื้อจุลินทรีย์จากหน่วยเก็บรักษาจุลินทรีย์โรคพืชมาทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *E. turcicum* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ในปี พ.ศ. 2551 จำนวน 25 isolate พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ จำนวน 3 ไอโซเลท แสดงปฏิกริยายับยั้งเชื้อ *E. turcicum* หลังการทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA 7 วัน และในปี พ.ศ. 2552 ทดสอบจำนวน 31 isolate พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ จำนวน 22 ไอโซเลท แสดงปฏิกริยายับยั้งเชื้อ *E. turcicum* หลังการทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA 7 วัน

เอกสารอ้างอิง

- กองโรคพืชและจุลชีววิทยา. 2545. คู่มือโรคพืชไร่. เอกสารวิชาการกองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ. 105 หน้า.
- ชุตินันต์ พานิชศักดิ์พัฒนา และเตือนใจ บุญ-หลง. 2545. โรคข้าวโพดและการป้องกันกำจัด. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร. 69 หน้า.
- พีระวรรณ พัฒนวิภาส อมรรัตน์ ภูไพบูลย์ ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ วันเพ็ญ ศรีทองชัย และณัฐริมา โฆษิตเจริญกุล. 2549. การจัดทำบัญชีรายชื่อโรคและเชื้อสาเหตุโรคของข้าวโพดเพื่อการนำเข้า.
- ใน : เอกสารประกอบการประชุมเชิงปฏิบัติการโครงการวิจัยแม่บทข้าวโพดข้าวฟ่าง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 2. วันที่ 9-11 มีนาคม 2549. ณ สีดาร์สอร์ท อ.เมือง จ. นครนายก.
- สมาคมปรับปรุงพันธุ์พืชและขยายพันธุ์พืชแห่งประเทศไทย ศูนย์วิจัยพืชไร่ชัยนาท และสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 5. 2549. การสัมมนาเชิงปฏิบัติการ ระบบการส่งเสริมและวิเคราะห์ปัญหาในการผลิตข้าวโพดหวานเพื่ออุตสาหกรรม. วันที่ 1-3 มีนาคม 2549. ณ โรงแรมมนตรี จ.ชัยนาท.
- Tzeng, T.F., L.K. Lyngholm, C.F. Ford and C.R. Bronson. 1992. A RFLP maps and electrophoretic karyotype of the fungal maize pathogen *Cochliobolus heterostrophus*. Genetics 130: 81-92.

ตารางที่ 1 การทดสอบประสิทธิภาพเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *E. turcicum* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ปี พ.ศ. 2551

ไอโซเลท	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางเชื้อราสาเหตุโรค ¹	ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง ²
1	2.3	67.32
2	2.92	58.52
3	2.92	58.52
4	2.08	70.45
5	1.42	79.82
6	1.9	73.01
7	1.92	72.72
8	2.5	64.48
9	2.04	71.02
10	2.64	62.5
11	2.94	58
12	2.38	67.6
13	3.3	46.87
14	2.18	69.03
15	3.3	46.87
16	4.26	39.48
17	3.42	51.42

ไอโซเลท	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางเชื้อราสาเหตุโรค ¹	ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง ²
18	4.12	41.47
19	4.42	37.21
20	3.56	49.43
21	3.54	49.71
22	3.5	50.28
23	3.12	55.68
24	2.96	57.95
25	2.8	60.22
26	2.48	64.77
27	2.04	71.02
28	3.02	57.1
29	2.36	66.47
30	3.2	54.54
31	3.0	57.38
32	2.78	60.51
33	2.96	57.95
34	2.46	65.05
35	3.02	57.1
control	7.04	

ตารางที่ 2 การทดสอบประสิทธิภาพเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *E. turcicum* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ปี พ.ศ. 2552

ไอโซเลท	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางเชื้อราสาเหตุโรค ¹	ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง ²
1	1.78	80.22
2	3.9	56.66
3	1.68	81.33
4	3.2	64.44
5	3.95	56.11
6	1.51	83.22
7	2.56	82.66
8	1.60	82.22
9	3.85	57.22
10	1.58	82.44
11	8.5	5.55
12	6.10	32.22
13	1.53	83.33
14	1.31	85.44
15	7.08	21.33
16	1.26	86.00
17	1.85	79.44

ไอโซเลท	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางเชื้อราสาเหตุโรค ¹	ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง ²
18	1.53	83.00
19	1.50	83.33
20	1.78	80.22
21	1.41	84.33
22	1.35	85.00
23	1.80	80.00
24	1.56	82.66
25	7.16	20.44
26	1.01	88.77
27	1.31	85.44
28	1.36	84.88
29	2.88	68.00
30	1.36	84.88
31	1.41	84.33
control	9	

หมายเหตุ 1= ค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางเชื้อราสาเหตุโรคทั้งหมด 5 ซ้ำ

2= $100 - (\text{ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเชื้อรา } E. \text{ turcicum} \text{ ในกรรมวิธีเชื้อทดสอบ} \times 100) /$

ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเชื้อรา *E. turcicum* ในกรรมวิธีเปรียบเทียบ