

ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์
Bacillus megaterium สายพันธุ์ No.16 ในการควบคุม
โรคกาบใบแห้งของข้าวพันธุ์ กข6

Efficiency of Antagonistic Bacterium *Bacillus megaterium*
Strain No.16 for Controlling Sheath Blight Disease of RD6
Rice Variety

ปิลันธนา ฐาปนพงษ์วรกุล^{1/} และ ศราวิษฐ์ สายมงคล^{1/}
Pilunthana Thapanapongworakul^{1/} and Sarawit Saimongkol^{1/}

(Received: 15 May 2015; Accepted: 31 July 2015)

Abstract: The potential antagonistic bacteria *Bacillus megaterium* strain No.16 for controlling sheath blight disease of RD6 rice variety caused by *Rhizoctonia solani* was evaluated. Four isolates of *R. solani* RSLPN-1, RSLPN-2, RSLPN-3 and RLSPN-4 were obtained from experimental rice paddy fields of Lamphun Land Development Station, Si Bua Ban sub-district, Mueang district, Lamphun province. Dual culture test was determined to investigate the ability of antagonistic bacteria to inhibit mycelial growth of these pathogens for 4 days. This antagonistic *B. megaterium* showed significantly inhibited of all *R. solani* isolates at 41.65, 26.78, 26.08 and 42.35%, respectively; especially isolate RLSPN-4 had shown high percentage of growth inhibition. Whereas, the antagonistic *B. megaterium* showed significantly against mycelial growth of *R. solani* isolates RSLPN-2 and RLSPN-4 more than 95 % by pour plate test. Mycelial growth inhibition by *B. megaterium* was observed under compound microscope in either dual culture or pour plate tests. For control of rice sheath blight disease, spraying the granule formulation of *B. megaterium* on rice plants in the greenhouse was significantly suppressed sheath blight disease of rice caused by *R. solani* isolate RLSPN-4 when compared to control. These suggested that the antagonistic bacteria *B. megaterium* have an excellent potential to be used as biocontrol agent of sheath blight disease in rice RD6 variety in laboratory and greenhouse conditions.

Keywords: Sheath blight disease, *Rhizoctonia solani*, antagonistic *Bacillus megaterium*, biological control

^{1/} ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ 50200

^{1/} Department of Entomology and Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University. Chiang Mai 50200, Thailand

* Corresponding author: E-mail address: pilunthana.t@cmu.ac.th

บทคัดย่อ: การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิบักร์ *Bacillus megaterium* สายพันธุ์ No.16 เพื่อควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าวพันธุ์ กข6 สาเหตุเกิดจากเชื้อรา *Rhizoctonia solani* เมื่อแยกและรวบรวมเชื้อราสาเหตุจากแปลงทดลองปลูกข้าวของสถานีพัฒนาที่ดินลำพูน ตำบลศรีบัวบาน อำเภอเมือง จังหวัดลำพูน ได้จำนวน 4 ไอโซเลท คือ RSLPN-1, RSLPN-2, RSLPN-3 และ RSLPN-4 นำมาทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรียปฏิบักร์ *B. megaterium* ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) โดยวิธี dual culture เป็นเวลา 4 วัน พบว่า เชื้อแบคทีเรียปฏิบักร์สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. solani* แต่ละไอโซเลทได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 41.65, 26.78, 26.08 และ 42.35 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับการทดสอบด้วยวิธี pour plate พบว่า เชื้อแบคทีเรียปฏิบักร์มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. solani* ไอโซเลท RSLPN-2 และ RSLPN-4 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงมากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ปลายเส้นใยของเชื้อรา *R. solani* จากวิธีการทดสอบทั้ง 2 วิธี มีลักษณะผิดปกติเหมือนกัน จากนั้นทดสอบการควบคุมโรคกาบใบแห้งที่เกิดจากเชื้อรา *R. solani* ไอโซเลท RSLPN-4 โดยวิธีการพ่นชีวภัณฑ์เชื้อ *B. megaterium* ในสภาพเรือนทดลอง พบว่า ชีวภัณฑ์ดังกล่าวสามารถลดความรุนแรงของโรคกาบใบแห้งได้แตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิบักร์ *B. megaterium* สามารถควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าวพันธุ์ กข 6 ในสภาพห้องปฏิบัติการและเรือนทดลองได้

คำสำคัญ: โรคกาบใบแห้ง เชื้อรา *Rhizoctonia solani* เชื้อแบคทีเรียปฏิบักร์ *Bacillus megaterium* การควบคุมโดยชีววิธี

คำนำ

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นพืชอาหารหลักและพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย และยังเป็นที่ต้องการของตลาดทั้งภายในประเทศและต่างประเทศ ในภาคเหนือของไทย ปี พ.ศ. 2555/56 จังหวัดเชียงใหม่มีพื้นที่ปลูกข้าวนาปีทั้งหมด 455,425 ไร่ ผลผลิต 279,084 ตัน อำเภอที่มีพื้นที่ปลูกข้าวมาก ได้แก่ อำเภอแม่ฮาด อำเภอแม่สะเรียง และดอยสะเก็ด จะทำการปลูกข้าวตั้งแต่เดือนพฤษภาคมจนถึงเดือนตุลาคมของทุกปี ปัจจุบันพื้นที่ปลูกข้าวสำคัญในประเทศลดลง ทำให้ผลผลิตลดลง (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2557) จำเป็นต้องมีการเพิ่มพื้นที่เพาะปลูกและเพิ่มประสิทธิภาพของผลผลิต แต่อย่างไรก็ตาม สาเหตุสำคัญประการหนึ่งที่ทำให้ผลผลิตข้าวลดลงเกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคพืช โรคที่สำคัญของข้าวที่ส่งผลกระทบต่อปริมาณและคุณภาพของผลผลิต ได้แก่ โรคไหม้ (blast) เกิดจากเชื้อรา *Pyricularia oryzae* โรคกาบใบแห้ง (sheath blight) เกิดจากเชื้อรา *Rhizoctonia solani* และโรคเมล็ดด่าง (kernel spotting) เกิดจากเชื้อราหลายชนิด เช่น *Curvularia lunata*, *Bipolaris oryzae* เป็นต้น

โรคกาบใบแห้งของข้าว สาเหตุเกิดจากเชื้อรา *R. solani* พบระบาดในแหล่งปลูกข้าวที่สำคัญในโลก และทั่วทุกภาคของประเทศ นับเป็นโรคหนึ่งที่ทำให้เกิดความเสียหายมากที่สุด เข้าทำลายในส่วนกาบใบ พบอาการในระยะแตกกอจนถึงใกล้ระยะเก็บเกี่ยว หากพบการระบาดของรุนแรงลุกลามถึงใบธง จะทำให้ข้าวมีปริมาณและคุณภาพของผลผลิตลดลง ตั้งแต่ 6-20 เปอร์เซ็นต์ และอาจสูงถึง 50 เปอร์เซ็นต์ ในพันธุ์ข้าวที่อ่อนแอต่อโรค (Ou, 1985; Teng et al., 1990; Savary et al., 2000) การระบาดและระดับความรุนแรงของโรคจะแตกต่างกันตามพื้นที่ สภาพแวดล้อม ความสมบูรณ์ของดิน สายพันธุ์ข้าว อัตราเมล็ดพันธุ์ และปริมาณการใช้ปุ๋ยไนโตรเจน เชื้อราสาเหตุสามารถแพร่กระจายโดยเมล็ด sclerotium อาศัยอยู่ในดิน ดินเศษซากพืช หรือกระแสม (ทัศนีย์, 2540) ซึ่งเกษตรกรส่วนใหญ่นิยมใช้สารป้องกันกำจัดเชื้อรา เช่น วาเลตามัยซิน เบโนมิล รอฟรัล และเพนโคนาโซน เป็นต้น (Chin and Bhandhufalck, 1990) จึงสมควรหาแนวทางลดการใช้สารเคมีเกษตรที่อาจมีสารตกค้างในเมล็ดข้าว ในน้ำ และดิน เกิดผลกระทบต่อเกษตรกร ผู้บริโภค และสิ่งแวดล้อม เพื่อให้สอดคล้องกับนโยบายของรัฐบาลให้หาสิ่งทดแทนเพื่อลดการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชขึ้น การควบคุมโรคพืช

โดยการใช้จุลินทรีย์ปฏิบั๊กซ์เป็นวิธีการที่นำผลจากปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติซึ่งตามปกติจะมีการควบคุมปริมาณของสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ ด้วยกันเองอยู่แล้ว (สายชล และสมบัติ, 2550) ซึ่งวิธีการนี้ถือว่าเป็นที่ยอมรับและเป็นวิธีที่มีโอกาสสูงเพื่อนำไปเป็นกลยุทธ์ในการป้องกันกำจัดโรค เพราะใช้ได้ผลดีจนถึงขั้นทำในระดับการค้า (เยวพา, 2551; Cook, 1993) จากผลงานวิจัยการใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิบั๊กซ์ *Bacillus megaterium* เพื่อควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าว เริ่มตั้งแต่การทดสอบและคัดเชื้อแบคทีเรียปฏิบั๊กซ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *R. solani* จำนวน 323 ไอโซเลท ที่ได้จากดินในนาข้าวของจังหวัดต่าง ๆ ในภาคใต้ พบว่า เชื้อแบคทีเรีย *B. megaterium* มีฤทธิ์ในการเป็นปฏิบั๊กซ์ได้สูงสุด (Kanjnamaneesathian *et al.*, 1998; Pengnoo *et al.*, 2000) ต่อมาได้ทำการพัฒนาชีวภัณฑ์เชื้อ *B. megaterium* ในรูปแบบต่าง ๆ เพื่อให้เหมาะกับการใช้โดยการหว่านหรือพ่น สะดวกต่อการขนส่ง สามารถเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เกษตรกรสามารถใช้ได้ง่าย และมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าว เมื่อนำชีวภัณฑ์ดังกล่าวไปทดสอบการควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าวสายพันธุ์ต่าง ๆ เช่น ข้าวดอกมะลิ 105, พิษณุโลก 2, กข1 และ กข23 ภายใต้สภาพเรือนทดลองและแปลงนาในพื้นที่จังหวัดต่าง ๆ ทั้งภาคใต้ ภาคกลาง และภาคเหนือตอนล่าง เป็นต้น พบว่า ชีวภัณฑ์เชื้อ *B. megaterium* สามารถควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าวได้หลายสายพันธุ์ โดยให้ผลดีเช่นเดียวกับการใช้สารเคมี (Kanjnamaneesathian *et al.*, 2007, 2009; Wiwattanapatapee *et al.*, 2013) ดังนั้น การนำข้อมูลดังกล่าวมาใช้ในพื้นที่ให้เกิดประโยชน์ จึงจำเป็นต้องมีการทดสอบกับแหล่งเชื้อสาเหตุโรค พันธุ์ข้าว และสภาพพื้นที่นั้น ๆ การทดลองครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิบั๊กซ์ *B. megaterium* ในการควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าวพันธุ์ กข6 ที่เกิดจากเชื้อรา *R. solani* โดยทดสอบในสภาพห้องปฏิบัติการและนำชีวภัณฑ์เชื้อ *B. megaterium* มาใช้เพื่อควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าวในสภาพเรือนทดลอง เพื่อให้ได้ข้อมูลที่สามารถนำไปแนะนำเกษตรกรหรือผู้ที่สนใจในจังหวัดเชียงใหม่และจังหวัดใกล้เคียงต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การศึกษาลักษณะอาการของโรค การตรวจและการแยกเชื้อสาเหตุโรคกาบใบแห้ง

ทำการสำรวจโรคกาบใบแห้งข้าวที่เกิดกับข้าวพันธุ์ กข6 จากแปลงทดลองปลูกข้าวของสถานีพัฒนาที่ดินลำพูน ตำบลศรีบัวบาน อำเภอเมือง จังหวัดลำพูน นำตัวอย่างของข้าวพันธุ์ กข6 ที่แสดงอาการของโรคบนกาบใบ บันทึกลักษณะอาการและตรวจหาเชื้อสาเหตุ ด้วยวิธี tissue transplanting method และทำการแยกเชื้อจากบริเวณกาบใบที่แสดงอาการของโรค โดยนำชิ้นพืชที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวแล้วด้วย 3% sodium hypochlorite วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) สังเกตลักษณะของเชื้อที่เจริญรอบ ๆ บริเวณเนื้อเยื่อพืช จากนั้นทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี hyphal tip isolation บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เก็บเชื้อไว้เป็น stock culture เพื่อใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป

การทดสอบความสามารถในการเกิดโรค

ทำการปลูกเชื้อรา *R. solani* ด้วยชิ้นวุ้น (agar disc) ลงบนกาบใบของข้าวพันธุ์ กข6 ที่ระยะแตกกอ ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีการของ Park *et al.* (2008) ส่วนชุดควบคุมทำเช่นเดียวกันแต่ใช้ชิ้นวุ้นอาหาร PDA ที่ไม่มีเชื้อสาเหตุ สังเกตอาการของโรคทุกวันหลังทำการปลูกเชื้อ

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิบั๊กซ์ *Bacillus megaterium* ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคกาบใบแห้ง ในสภาพห้องปฏิบัติการ

นำเชื้อรา *R. solani* จำนวน 4 ไอโซเลท มาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อกับเชื้อแบคทีเรียปฏิบั๊กซ์ (antagonistic bacteria) *B. megaterium* สายพันธุ์ No.16 ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีววินทรีย์แห่งชาติภาคใต้ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ/คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา โดยนำมา streak plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar (NA) เพื่อนำไปทดสอบความสามารถในการเป็นปฏิบั๊กซ์ของเชื้อแบคทีเรีย *B. megaterium* ใน

การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. solani* สาเหตุโรคกาบใบแห้งข้าว ด้วยวิธี dual culture และ pour plate วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) มี 2 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีมี 3 ซ้ำ โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *B. megaterium* เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นวางชิ้นส่วนของเชื้อสาเหตุ (culture disc) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ห่างจากขอบจานอาหารประมาณ 2 เซนติเมตร ห่างจากจุดศูนย์กลางของเชื้อ 5 เซนติเมตร บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน สำหรับชุดควบคุมทำการทดลองเช่นเดียวกันแต่ใช้น้ำกลั่นฆ่าเชื้อแทนแบคทีเรียปฏิบัฏ์ บันทึกผลโดยวัดขนาดรัศมีของโคโลนีของเชื้อราสาเหตุโรคในชุดทดสอบและชุดควบคุม นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ (percent inhibition of radial growth, PIRG) ของเชื้อสาเหตุจากสูตร $PIRG = (R1 - R2) / R1 \times 100$ โดย R1 คือ รัศมีการเจริญของเชื้อราสาเหตุในชุดควบคุม และ R2 คือ รัศมีการเจริญของเชื้อราสาเหตุในชุดทดลอง สำหรับการทดสอบด้วยวิธี pour plate ใช้วิธีการของ Pengnoot *et al.* (2000)

การทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ *Bacillus megaterium* ในการควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าวพันธุ์ กข6 ในสภาพเรือนทดลอง

นำชีวภัณฑ์เชื้อ *B. megaterium* สายพันธุ์ No.16 ในรูปของแกรนูล ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติภาคใต้ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา มาละลายในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วที่อัตราแนะนำ 3% (w/v) เพื่อเตรียมเป็นสารละลายชีวภัณฑ์ให้ได้ที่ระดับความเข้มข้น 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำเมล็ดข้าวพันธุ์ กข6 ที่ฆ่าเชื้อที่ผิวแล้วนำมาแช่ในสารละลายชีวภัณฑ์ของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัฏ์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ฝักรีดแห้ง และนำเมล็ดไปเพาะในถาดหลุมขนาด 104 หลุม ซึ่งบรรจุดินที่ฆ่าเชื้อที่ผิวแล้ว เมื่อดันกล้าข้าวอายุ 25 วัน ย้ายต้นกล้าข้าวปลูกในกระถางพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 20 เซนติเมตร วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 4 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีมี 5 ซ้ำ ใช้ข้าว 5 ต้นต่อซ้ำ จำนวน 20 กระถาง ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุม (พ่นน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ)
กรรมวิธีที่ 2 ปลูกเชื้อรา *R. solani* อย่างเดียว
กรรมวิธีที่ 3 พ่นชีวภัณฑ์เชื้อ *B. megaterium* อย่างเดียว

กรรมวิธีที่ 4 พ่นชีวภัณฑ์เชื้อ *B. megaterium* และปลูกเชื้อรา *R. solani*

เมื่อดันข้าวอายุ 50 วัน ทำการพ่นชีวภัณฑ์เชื้อ *B. megaterium* ก่อนปลูกเชื้อราสาเหตุเป็นเวลา 3 วัน จากนั้นปลูกเชื้อราสาเหตุซึ่งดัดแปลงจากวิธีการของ Park *et al.* (2008) โดยใช้ cork borer เจาะชิ้นอาหาร PDA เป็นวงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ซึ่งมีเชื้อรา *R. solani* เจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วัน เพื่อนำไปปลูกเชื้อบนกาบใบข้าว หลังจากปลูกเชื้อราสาเหตุแล้วพ่นชีวภัณฑ์เชื้อ *B. megaterium* อีก 2 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 3 วัน และพ่นน้ำกลั่นในกรรมวิธีควบคุมหลังปลูกเชื้อเป็นเวลา 7 วัน สังเกตลักษณะอาการของโรคและบันทึกข้อมูลทั้งด้านการเจริญเติบโตและด้านโรค โดยวัดความสูงของต้นข้าว นับจำนวนหน่อต่อกอ วัดความสูงของแผลที่ถูกเชื้อสาเหตุเข้าทำลาย วัดความสูงของต้นข้าวแต่ละหน่อ และนับจำนวนหน่อที่เกิดโรค จากนั้นนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรค (% relative lesion height, %RLH) ตามวิธีของ Anh *et al.* (1986) และเปอร์เซ็นต์หน่อที่เกิดโรค (% of infected rice tillers) มีสูตรการคำนวณ ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรค (\%RLH)} = \frac{\text{ความสูงของแผล/ความสูงของต้นข้าว}}{\times 100} \quad \dots(1)$$

$$\text{เปอร์เซ็นต์หน่อที่เกิดโรค} = \frac{\text{จำนวนหน่อที่แสดงอาการของโรค/จำนวนหน่อทั้งหมด}}{\times 100} \quad \dots(2)$$

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Least significant difference (LSD) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (Gomez and Gomez, 1984)

ผลและวิจารณ์

การศึกษาลักษณะอาการของโรค และการแยกเชื้อสาเหตุโรคกาบใบแห้งของข้าวพันธุ์ กข6

จากการสำรวจโรคกาบใบแห้งที่เกิดขึ้นกับข้าวพันธุ์ กข6 จากแปลงทดลองปลูกข้าวของสถานีพัฒนาที่ดิน ลำพูน ตำบลศรีบัวบาน อำเภอเมือง จังหวัดลำพูน พบว่า บนกาบใบมีลักษณะเป็นแผลขนาด 1-10 มิลลิเมตร ตรงบริเวณใกล้ระดับน้ำ ขอบแผลมีสีน้ำตาล แผลมีสีเขียวปนเทา (greenish-gray) และแผลขยายลุกลามติดกันเกิดเป็นแผลขนาดใหญ่ จนมีแผลขนาดไม่จำกัดและลุกลามขยายขึ้นไปจนถึงใบข้าว (ภาพที่ 1A) เมื่อนำตัวอย่างใบข้าวที่แสดงอาการของโรคมาทำการแยกเชื้อสาเหตุด้วยวิธี tissue transplanting method บนอาหาร PDA สามารถแยกเชื้อรา *R. solani* สาเหตุโรคกาบใบแห้งข้าว ได้จำนวน 4 ไอโซเลท ได้แก่ RSLPN-1, RSLPN-2, RSLPN-3 และ RLPN-4 โดยโคไคโนของเชื้อราที่เจริญบนอาหาร PDA เริ่มแรกมีลักษณะหยาดสีขาวฟูบนผิวหน้าอาหาร จากนั้นเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลถึงสีน้ำตาลเข้ม (ภาพที่ 1B) และสร้างเม็ด sclerotium เพื่อใช้ในการอยู่ข้ามฤดูต่อไป เมื่อนำเชื้อสาเหตุสองสายได้กล้างจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ พบลักษณะเส้นใยไม่มีสี มีลักษณะตั้งฉาก และมีผนังกันตามขวาง (ภาพที่ 1C)

การทดสอบความสามารถในการเกิดโรค

ผลการทดสอบความสามารถในการเกิดโรคของเชื้อรา *R. solani* โดยการนำชิ้นส่วนของเชื้อสาเหตุทั้ง 4 ไอโซเลท ปลูกเชื้อลงบนกาบใบของข้าวพันธุ์ กข6 หลังจากปลูกเชื้อ เป็นเวลา 7 วัน พบกาบใบข้าวที่ปลูกเชื้อแสดงอาการของโรคเกิดแผลสีเขียวปนเทา ขอบแผลมีสีน้ำตาล และแผลขยายลุกลามติดกันเกิดเป็นแผลขนาดใหญ่ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมไม่พบลักษณะอาการของโรคเกิดขึ้น โดยเชื้อรา *R. solani* ไอโซเลท RLPN-4 ก่อให้เกิดความรุนแรงของโรคมากที่สุด จึงคัดเลือกไอโซเลทดังกล่าวใช้ในการทดสอบในกระถางภายใต้สภาพเรือนทดลองต่อไป

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณช์ *B. megaterium* ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคกาบใบแห้ง ในสภาพห้องปฏิบัติการ

ทดสอบประสิทธิภาพเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณช์ *B. megaterium* สายพันธุ์ No.16 ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. solani* สาเหตุโรคกาบใบแห้ง ทั้ง 4 ไอโซเลท ได้แก่ RSLPN-1, RSLPN-2, RSLPN-3 และ RLPN-4 ในสภาพห้องปฏิบัติการ ด้วยวิธี dual culture และ pour plate บนอาหาร PDA เป็นเวลา 4 วัน (ตารางที่ 1) พบว่าทดสอบด้วยวิธี dual culture เชื้อแบคทีเรียปฏิบัณช์

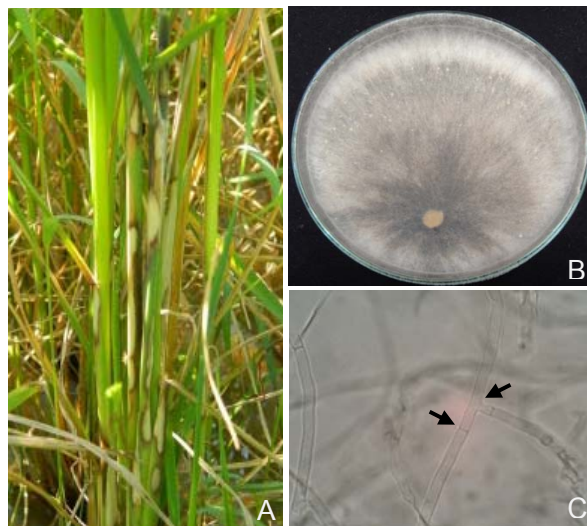


Figure 1 Natural infection of sheath blight disease in RD6 rice variety (A), cultural morphology of the pathogen, *Rhizoctonia solani* on PDA (B) and cultural characteristics of *R. solani* (C). Dark arrows indicate septa and constricted hyphae (10X)

B. megaterium สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. solani* ทั้ง 4 ไอโซเลทได้แตกต่างกัน โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 41.65, 26.78, 26.08 และ 42.35 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยเชื้อรา *R. solani* ไอโซเลท RLPN-4 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่สูงที่สุด (ภาพที่ 2A) โดยมีค่าเฉลี่ยขนาดรัศมีของโคโลนีทุกไอโซเลทแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่ 1) ถึงแม้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ได้จะต่ำกว่างานวิจัยอื่น ๆ ที่ใช้แบคทีเรียสกุล *Bacillus* โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อสาเหตุอยู่ในช่วง 50-90 เปอร์เซ็นต์ (Akgul and Mirik, 2008; Ajillogba *et al.*, 2013) แต่เมื่อนำเชื้อสาเหตุทั้ง 4 ไอโซเลท มาทดสอบด้วยวิธี pour plate พบว่า เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. megaterium* มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. solani* ทั้ง 4 ไอโซเลทแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ในช่วง 96-100 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 1 และภาพที่ 2B) สำหรับเชื้อรา *R. solani* ไอโซเลท RLPN-1 และ RSLPN-3 เชื้อไม่เจริญจึงไม่สามารถวัดขนาดโคโลนีได้ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Pengnook *et al.* (2000) และ Chumthong *et al.* (2008) เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. megaterium* มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. solani* ได้มากกว่า 85-99 เปอร์เซ็นต์

เช่นเดียวกับรายงานวิจัยของ Kildea *et al.* (2008) ทำการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. megaterium* สายพันธุ์ MKB135 ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Mycosphaerella graminicola* ด้วยวิธี dual culture และ culture filtrate พบว่า เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไม่สามารถผลิตสารเมตาบอไลต์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุได้โดยตรง แต่เมื่อทดสอบโดยวิธี dual liquid culture พบว่า เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. megaterium* สายพันธุ์ MKB135 สามารถผลิตสารระเหยที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *M. graminicola* ได้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 43 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่า วิธีการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียมีผลต่อการประเมินความสามารถในการเป็นเชื้อปฏิปักษ์

เมื่อตัดปลายเส้นใยเชื้อรา *R. solani* ไอโซเลท RLPN-4 ที่ถูกยับยั้งสองภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า ทั้งการทดสอบโดยวิธี dual culture และ pour plate เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. megaterium* แสดงการเป็นปรสิตกับเชื้อราสาเหตุโดยอยู่รอบปลายเส้นใย ทำให้เส้นใยของเชื้อรามีลักษณะผิดปกติ ผนังเซลล์ถูกย่อยสลายและฉีกขาด เมื่อเทียบกับชุดควบคุมเส้นใยมีลักษณะปกติ (ภาพที่ 2C, D) และเชื้อรา *R. solani* อีก 3 ไอโซเลท แสดงผลเช่นเดียวกัน เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* รวมทั้งเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. megaterium* สามารถ

Table 1 Growth inhibition of four isolates of *Rhizoctonia solani* in dual culture and pour plate assays with antagonistic bacteria *Bacillus megaterium* on PDA at 4 days after inoculation (DAI)

<i>R. solani</i> isolate	Dual culture ^{1/}		Pour plate ^{1/}	
	Radial growth of <i>R. solani</i> (cm)	% inhibition	Radial growth of <i>R. solani</i> (cm)	% inhibition
Control	4.78a ^{2/}	0.00c	4.50a	0.00c
RSLPN-1	2.78c	41.65a	0.00c	100.00a
RSLPN-2	3.50b	26.78b	0.15b	96.73b
RSLPN-3	3.53b	26.08b	0.00c	100.00a
RSLPN-4	2.75c	42.35a	0.13b	97.03b
LSD _{0.05}	0.15	3.19	0.02	0.15
CV (%)	2.40	6.42	1.24	0.10

^{1/} Average from 3 replicates for each isolate

^{2/} Means within the same column followed by the same letter are not significantly different at the 0.05 level by LSD test

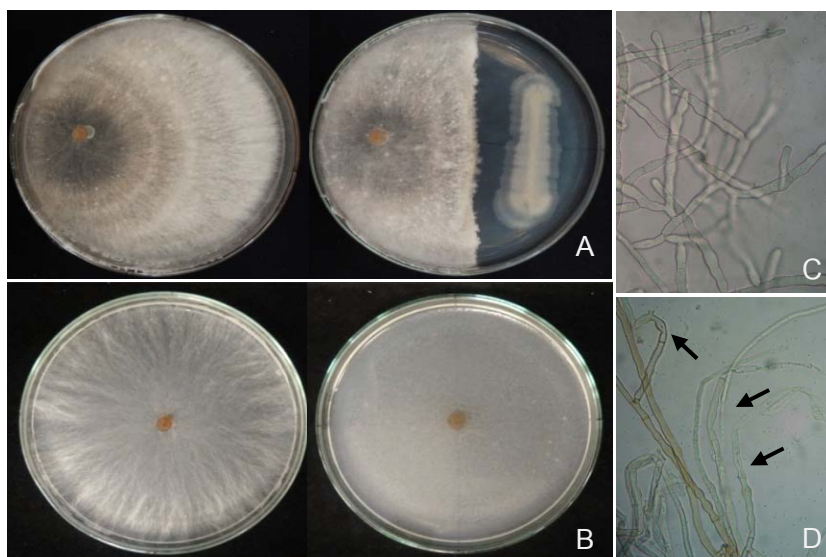


Figure 2 *In vitro* antifungal of antagonistic bacteria *Bacillus megaterium* strain No.16 against *Rhizoctonia solani* isolate RSLPN-4 on PDA at 4 days after inoculation (DAI) in dual culture (A) and pour plate (B) tests. Optical micrographs of the inhibition of fungal growth by No.16 in dual culture at 4 DAI. The control culture with only *R. solani* isolate RSLPN-4 (C), and *R. solani* isolate RSLPN-4 mycelium from the edge of the inhibition zone. Dark arrows indicate hyphal deformation (10x)

Table 2 Efficacy of antagonistic bacteria *Bacillus megaterium* in suppressing the development of sheath blight disease in pot test

Treatment	Height ^{1/} (cm)	Tillers/pot	Tiller with sheath blight symptoms (%)	Severity (%RLH)
Control	53.37b ^{2/}	3.94	0.00c	0.00c
<i>R. solani</i>	51.58b	3.68	84.00a	60.60a
<i>B. megaterium</i>	56.80a	3.68	0.00c	0.00c
<i>B. megaterium</i> + <i>R. solani</i>	58.52a	3.60	48.00b	47.00b
LSD _{0.05}	2.86	0.33	9.48	5.84
CV(%)	3.87	6.67	21.43	16.18

^{1/} Average from 5 replicates for each isolate.

^{2/} Means within the same column followed by the same letter are not significantly different at the 0.05 level by LSD test.

ผลิตเอนไซม์หลายชนิด สารปฏิชีวนะต่าง ๆ ที่มีผลในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ต่าง ๆ (El-Banna, 2005; Chakraborty *et al.*, 2006) อีกทั้งยังสามารถผลิตสาร heat-stable antibiotics ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. solani* (Larkin *et al.*, 1998; Pengnoo *et al.*, 2000)

จากผลการทดลองดังกล่าวจึงนำไปประยุกต์ใช้โดยการพ่นชีวภัณฑ์เชื้อ *B. megaterium* เพื่อควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าวที่เกิดจากเชื้อรา *R. solani* ไชยเลข RLPN-4 ในเรือนทดลองต่อไป

การทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์เชื้อ *B. megaterium* เพื่อควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าวพันธุ์ กข6 ในสภาพเรือนทดลอง

จากการทดลองพบว่า กรรมวิธีที่พ่นชีวภัณฑ์เชื้อ *B. megaterium* ร่วมกับการปลูกเชื้อรา *R. solani* สามารถลดความรุนแรงของโรคกาบใบแห้งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมปลูกเชื้อรา *R. solani* อย่างเดียว โดยมีเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคเท่ากับ 47 เปอร์เซ็นต์ และทำให้จำนวนหน่อที่เกิดโรคหลังจากพ่นชีวภัณฑ์เชื้อ *B. megaterium* ลดลงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งอาจเกิดจากเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ลดการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุและยับยั้งการแพร่ระบาดของโรคไปยังพื้นที่ข้างเคียงอีกด้วย (Kanjnamaneesathian *et al.*, 2007) อีกทั้งยังเพิ่มความสูงของต้นข้าวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) อย่างไรก็ตาม พบว่าทุกกรรมวิธีไม่มีผลทำให้จำนวนหน่อต่อกอของข้าวแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 2) แสดงให้เห็นว่า ชีวภัณฑ์เชื้อแบคทีเรีย *B. megaterium* สามารถควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าวพันธุ์ กข6 ในสภาพเรือนทดลองได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kanjnamaneesathian *et al.* (2007) และ Chumthong *et al.* (2008) พบว่า ชีวภัณฑ์เชื้อ *B. megaterium* สามารถควบคุมโรคกาบใบแห้งข้าวได้หลายสายพันธุ์ เช่น ข้าวดอกมะลิ 105 พืชปลูก 2 กข1 และ กข23 ทั้งในสภาพเรือนทดลองและแปลงนา เมื่อพิจารณาเปอร์เซ็นต์จำนวนหน่อที่เกิดโรคหลังจากพ่นชีวภัณฑ์เชื้อ *B. megaterium* นี้อาจจะลดการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุและยับยั้งการแพร่ระบาดของโรคไปยังพื้นที่ข้างเคียงอีกด้วย

สรุป

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. megaterium* สายพันธุ์ No.16 ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. solani* สาเหตุโรคกาบใบแห้งของข้าวพันธุ์ กข6 ซึ่งเป็นข้าวพันธุ์ไวแสงด้วย พบว่า วิธีการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียมีผลต่อการประเมินความสามารถในการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ โดยวิธี dual

culture และ pour plate มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา *R. solani* ไอโซเลท RSLPN-4 ดีที่สุดเท่ากับ 42.35 และ 97.03 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ขณะที่ปลายเส้นใยของเชื้อราจากการทดสอบทั้ง 2 วิธีมีลักษณะผิดปกติ ผงเซลล์ถูกย่อยสลายและฉีกขาดเหมือนกัน การควบคุมโรคกาบใบแห้งในสภาพเรือนทดลอง พบว่า ชีวภัณฑ์เชื้อ *B. megaterium* สามารถลดความรุนแรงของโรคกาบใบแห้งได้ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. megaterium* แสดงศักยภาพในการควบคุมเชื้อรา *R. solani* สาเหตุโรคกาบใบแห้งของข้าวพันธุ์ กข6 ได้ดีทั้งในรูปของเซลล์สดและชีวภัณฑ์ นอกจากนี้ควรมีการทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ดังกล่าวในแปลงนาเพื่อยืนยันผลการทดลองและสนับสนุนให้มีการใช้อย่างแพร่หลายมากขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธีแห่งชาติดิภาคใต้ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ / คณะทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ชีวภัณฑ์เชื้อ *Bacillus megaterium* ทำให้การดำเนินงานวิจัยในครั้งนี้สำเร็จตามเป้าประสงค์

เอกสารอ้างอิง

- ทัศนีย์ สงวนสัจ. 2540. บทบาทของพันธุกรรมต้านทานโรคและแมลงกับการปรับปรุงพันธุ์ข้าวของไทย. ศูนย์วิจัยข้าวพิษณุโลก สถาบันวิจัยข้าว กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ. 174 หน้า.
- สายชล โนชัย และ สมบัติ ศรีชูวงศ์. 2550. ประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ที่แยกได้จากเมล็ดข้าวขาวดอกมะลิ 105 ในการควบคุมโรคยอดผกคาบในต้นกล้าข้าว. วารสารเกษตร 23(1): 59-65.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2557. สถานการณ์สินค้าเกษตรที่สำคัญและแนวโน้ม ปี 2557. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล :

- http://www.oae.go.th/download/journal/trends_FEB2557.pdf (7 เมษายน 2558).
- เยาวพา สุวัทธิ. 2551. การใช้จุลินทรีย์ในการควบคุมศัตรูพืช. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล: <https://www.gpo.or.th/rdi1/html/microbe.html> (24 มีนาคม 2558).
- Ajilogba, C. F., O. O. Babalola and F. Ahmad. 2013. Antagonistic effects of *Bacillus* species in biocontrol of tomato *Fusarium* wilt. *Studies on Ethno-Medicine* 7(3): 205-216.
- Akgul, D. S. and M. Mirik. 2008. Biocontrol of *Phytophthora capsici* on pepper plants by *Bacillus megaterium* strains. *Journal of Plant Pathology* 90(1): 29-34.
- Anh, S. W., R. L. Pena, B. L. Candole and T. W. Mew. 1986. A new scale for rice sheath blight disease assessment. *IRRN* 11(6): 17.
- Chakraborty, U., B. Chakraborty and M. Basnet. 2006. Plant growth promotion and induction of resistance in *Camellia sinensis* by *Bacillus megaterium*. *Journal of Basic Microbiology* 46: 186-195.
- Chin, K. M. and A. Bhandhufalck. 1990. The importance of crop growth stages for determining the application timing of disease control agents on rice. pp. 131-142. *In*: B.T. Grayson, M.B. Green and L.G. Copping (eds.). *Pest Management in Rice*. Elsevier, London.
- Chumthong, A., M. Kanjanamaneesathian, A. Pengnoo and R. Wiwattanapatapee. 2008. Water-soluble granules containing *Bacillus megaterium* for biological control of rice sheath blight: formulation, bacterial viability and efficacy testing. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24: 2499-2507.
- Cook, R. J. 1993. Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 31: 53-80.
- El-Banna, N. M. 2005. Effect of carbon source on the antimicrobial activity of the air flora. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 21: 1451-1454.
- Gomez, K. A. and A. A. Gomez. 1984. *Statistical Procedures for Agricultural Research*. 2nd edition. John Wiley & Sons, New York.
- Kanjanamaneesathian, K., C. Kusonwiriawong, A. Pengnoo and L. Nilratana. 1998. Screening of potential bacterial antagonists for control of sheath blight in rice and development of suitable bacterial formulations for effective application. *Australasian Plant Pathology* 27: 198-206.
- Kanjanamaneesathian, K., R. Wiwattanapatapee, A. Pengnoo, K. Oungbho and A. Chumthong. 2007. Efficacy of novel formulations of *Bacillus megaterium* in suppressing sheath blight of rice caused by *Rhizoctonia solani*. *Plant Pathology Journal* 6(2): 195-201.
- Kanjanamaneesathian, K., A. Chumthong, A. Pengnoo and R. Wiwattanapatapee. 2009. *Bacillus megaterium* suppresses major Thailand rice diseases. *Asian Journal of Food and Agro-Industry (Special Issue)*: S154-S159.
- Kildea, S., V. Ransbotyn, M. R. Khan, B. Fagan, G. Leonard, E. Mullins and F. M. Doohan. 2008. *Bacillus megaterium* shows potential of the biocontrol of *Septoria tritici* blotch of wheat. *Biological Control* 47: 37-45.
- Larkin, R. P., D. P. Roberts and J. A. Gracia-Garza. 1998. Biological control of fungal diseases. pp. 149-191. *In*: D. Hutson and J.

- Miyamoto (eds.). Fungicidal Activity: Chemical and Biological Approaches to Plant Protection. John Wiley & Sons, New York.
- Ou, S. H. 1985. Rice Diseases. 2nd edition. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey.
- Park, D. S., R. J. Sayler, Y. G. Hong, M. H. Nam and Y. Yang. 2008. A method for inoculation and evaluation of rice sheath blight disease. Plant Disease 92: 25-29.
- Pengnoo, A., C. Kusonwiriawong, L. Nilratana and M. Kanjanamaneesathian. 2000. Greenhouse and field trials of the bacterial antagonists in pellet formulations to suppress sheath blight of rice caused by *Rhizoctonia solani*. BioControl 45: 245-256.
- Savary, S., L. Willocquet, F. A. Elazegui, P.S. Teng, P. V. Du, D. Zhu, Q. Tang, S. Huang, X. Lin, H. M. Singh and R. K. Srivastava. 2000. Rice pest constraints in tropical Asia: characterization of injury profiles in relation to production situations. Plant Disease 84: 341-356.
- Teng, P. S., C. Q. Torres, F. L. Nuque and S. B. Calvero. 1990. Current knowledge on crop losses in tropical rice. pp. 39-53. *In*: IRRI. Crop Loss Assessment in Rice. International Rice Research Institute, Manila.
- Wiwattanapatapee, R., A. Chumthong, A. Pengnoo and M. Kanjanamneesathian. 2013. Preparation and evaluation of *Bacillus megaterium*-alginate microcapsules for control of rice sheath blight disease. World Journal of Microbiology Biotechnology 29: 1487-1497.
-