เพิ่มประสิทธิภาพการควบคุมโรคใบขีดสีน้ำตาลข้าวด้วยการใช้ *Trichoderma asperellum* NST–009 ร่วมกับ *Bacillus subtilis* NST–002

Increasing the Efficacy to Control Narrow Brown Spot of Rice Using Combination of *Trichoderma asperellum* NST–009 and *Bacillus subtilis* NST–002

วาริน อินทนา[1,*] อรรถกร พรมวี[1] และ ปัณณวิชญ์ เย็นจิตต์[2]
Warin Intana[1,*], Athakorn Promwee[1] and Punnawich Yenjit[2]

[1] หน่วยวิจัยพืชเขตร้อน สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ นครศรีธรรมราช 80161
[2] ภาควิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตรและเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยราชภัฏนครสวรรค์ นครสวรรค์ 60000
[1] The Tropical Plant Research Unit, School of Agricultural Technology, Walailak University, Nakhon Si Thammarat, 80161 Thailand
[2] Department of Agricultural Technology, Faculty of Agricultural Technology and Industrial Technology, Nakhon Sawan Rajabhat University, Nakhon Sawan 60000 Thailand
รับเรื่อง: มีนาคม 2561 Received: March 2018
รับตีพิมพ์: กรกฎาคม 2561 Accepted: July 2018
* Corresponding author: iwarin@wu.ac.th

ABSTRACT: Four isolates of *Cercospora oryzae*, a causal agent of narrow brown spot disease, were isolated from Pathum Thani 1 rice collected from Pak Phanang district in Nakhon Si Thammarat province. All isolates provided 45.84–79.17% of disease severity on leaves of Pathum Thani 1 rice under greenhouse conditions, especially isolate Ce–NST–03 gave the highest disease severity of 79.17%. A total four strains of antagonistic microorganisms (*Trichoderma asperellum* NST–009, *T. asperellum* CB–Pin–01, *Bacillus subtilis* NST–002 and *B. subtilis* NST–008) were dual culture test on potato dextrose agar (PDA) at room temperature (27 ± 2ºC). All antagonistic strains significantly inhibited mycelial growth of *C. oryzae* Ce–NST–03 by 38.07–79.34%, compared to the control, especially *T. asperellum* NST–009 gave the highest inhibition of 79.34%. In the greenhouse test, all treatments with antagonistic microorganisms (individual and two strains combination treatments) significantly reduced disease severity by 26.83–73.17%, compared to the control 2 (with *C. oryzae*). Treatment with *T. asperellum* NST–009 + *B. subtilis* NST–002 gave a highest efficacy to reduce disease severity (73.17%), while using carbendazim chemical gave 70.73% reduction. Moreover, all treatments individual and two strains combination, the antagonistic microorganisms were found to survive in rice leaf by 0.17×10^6–9.22×10^6 CFU per 1 g of rice leaf. Particularly, three treatments with *T. asperellum* NST–009 (individual), *T. asperellum* NST–009 + *T. asperellum* CB–Pin–01 and *T. asperellum* NST–009 + *B. subtilis* NST–002 (two strains combination) showed highest rice leaf colonization with the same rate by 100.00%.

Keywords: Narrow brown spot disease, biological control, antagonist combination, leaf colonization

Agricultural Sci. J. (2018) Vol. 49(2): 147–159 ว. วิทย. กษ. (2561) 49(2): 147–159

บทคัดย่อ

แยกรา *Cercospora oryzae* ที่เป็นสาเหตุโรคใบขีดสีน้ำตาลจากใบข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 ที่เก็บจากพื้นที่อำเภอปากพนัง จังหวัดนครศรีธรรมราชได้จำนวน 4 ไอโซเลต เมื่อนำมาทดสอบความรุนแรงในการก่อโรคบนใบข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 ในโรงเรือนปลูกพืชทดลอง พบว่า ทุกไอโซเลต สามารถก่อโรคกับใบข้าวได้ในช่วง 45.84–79.17 เปอร์เซ็นต์ โดยเฉพาะไอโซเลต Ce–NST–03 ที่มีความรุนแรงในการก่อโรคสูงที่สุด 79.17 เปอร์เซ็นต์ นำจุลินทรีย์ปฏิปักษ์จำนวน 4 ชนิด (*Trichoderma asperellum* NST–009, *T. asperellum* CB–Pin–01, *Bacillus subtilis* NST–002 and *B. subtilis* NST–008) มาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งราก่อโรคบนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) ที่อุณหภูมิห้อง (27 ± 2 องศาเซลเซียส) พบว่า จุลินทรีย์ปฏิปักษ์แต่ละชนิดมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา *C. oryzae* Ce–NST–03 ในช่วง 38.07–79.34 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม โดยเฉพาะ *T. asperellum* NST–009 ที่ให้ประสิทธิภาพการยับยั้งเส้นใยราก่อโรคสูงที่สุดที่ 79.34 เปอร์เซ็นต์ ในการควบคุมโรคใบขีดสีน้ำตาลของข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 โดยใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในระดับโรงเรือนปลูกพืชทดลอง (ทั้งรูปแบบการใช้เพียงชนิดเดียวและการใช้ 2 ชนิดร่วมกัน) พบว่า ทุกกรรมวิธีที่ใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์สามารถลดความรุนแรงของโรคได้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในช่วง 26.83–73.17 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม 2 (ปลูกรา *C. oryzae*) โดยเฉพาะกรรมวิธีที่ใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *T. asperellum* NST–009 + *B. subtilis* NST–002 ที่พบว่า มีประสิทธิภาพในการลดความรุนแรงของโรคได้สูงที่สุด (73.17 เปอร์เซ็นต์) ในขณะที่กรรมวิธีที่ใช้สารเคมี carbendazim ลดความรุนแรงของโรคได้ที่ 70.73 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบว่า ทุกกรรมวิธีที่ใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทั้งรูปแบบการใช้เพียงชนิดเดียวและการใช้ 2 ชนิดร่วมกัน สามารถตรวจพบจุลินทรีย์ปฏิปักษ์บนใบข้าวในช่วง 0.17×10^6–9.22×10^6 CFU ต่อใบข้าว 1 กรัม โดยเฉพาะ 3 กรรมวิธีคือ ใช้รา *T. asperellum* NST–009 (ชนิดเดียว), *T. asperellum* NST–009 + *T. asperellum* CB–Pin–01 และ*T. asperellum* NST–009 + *B. subtilis* NST–002 (ใช้ 2 ชนิดร่วมกัน) ที่ตรวจพบการครอบครองใบข้าวสูงที่สุดในอัตราที่เท่ากันคือ 100.00 เปอร์เซ็นต์

คำสำคัญ: โรคใบขีดสีน้ำตาล, การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี, การใช้จุลินทรีย์ร่วมกัน, การครอบครองใบ

บทนำ

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นพืชอาหารหลักที่สำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทยและภูมิภาคเอเชีย เพราะนอกจากการปลูกเพื่อบริโภคภายในประเทศแล้วยังสามารถส่งออกยังตลาดโลกได้จำนวนมหาศาล สำหรับประเทศไทยพบการปลูกข้าวในทุกภูมิภาคของประเทศโดยปลูกทั้งข้าวนาปีและข้าวนาปรัง ซึ่งจังหวัดนครศรีธรรมราชจัดเป็นพื้นที่ปลูกข้าวที่สำคัญของภาคใต้ โดยเฉพาะในเขตลุ่มน้ำปากพนัง อำเภอปากพนังที่มีการปลูกทั้งข้าวพันธุ์พื้นเมืองและพันธุ์ส่งเสริม โดยข้าวทั้งสองกลุ่มนี้มีข้อดีและข้อจำกัดที่แตกต่างกันดังนี้ 1. กลุ่มข้าวพันธุ์พื้นเมืองของ

จังหวัดนครศรีธรรมราช (พันธุ์ลูกลาย ยาโค กาบดำ เล็บนก และไข่มดริ้น) มีความทนทานต่อโรคพืช แต่ให้ผลผลิตต่ำกว่าพันธุ์ส่งเสริมทั้งด้านปริมาณและคุณภาพ และ 2. กลุ่มข้าวพันธุ์ส่งเสริม (ปทุมธานี 1 ข้าวขาวดอกมะลิ 105 สุพรรณบุรี 60 และชัยนาท 1) ให้ผลผลิตสูง แต่อ่อนแอต่อโรคมากกว่าข้าวพันธุ์พื้นเมือง โดยเฉพาะเมื่อมีการระบาดของโรคต่าง ๆ เช่น โรคใบขีดสีน้ำตาล โรคไหม้ โรคกาบใบเน่า และโรคเมล็ดด่าง เป็นต้น ข้าวพันธุ์ส่งเสริมพบความเสียหายจำนวนมากกว่า โดยเฉพาะโรคใบขีดสีน้ำตาลที่เกิดจากรา *C. oryzae* ที่พบการระบาดกับต้นข้าวที่ปลูกในจังหวัดนครศรีธรรมราชเป็นจำนวนมาก และยังจัดเป็นโรคที่สร้างความเสียหายให้กับต้นข้าวมากถึง 90 เปอร์เซ็นต์ของผลิตข้าวทั้งหมด (Kumar *et al.*, 2017) และเมื่อเกิดปัญหาโรคพืชระบาดเกษตรกรนิยมแก้ปัญหาด้วยการใช้สารเคมีหลายชนิดและใช้ในปริมาณที่มากเกินความจำเป็นจึงนำมาซึ่งปัญหาทั้งด้านต้นทุนการผลิตที่สูงขึ้น การต้านทานสารเคมีของเชื้อก่อโรคพืช และการปนเปื้อนของสารเคมีในผลผลิตข้าว ตลอดจนการปนเปื้อนของสารเคมีในสภาพแวดล้อมอีกด้วย ปัจจุบันเกษตรกรในพื้นที่ลุ่มน้ำปากพนังจึงได้ตระหนักถึงปัญหาดังกล่าวมากขึ้น ทำให้มีการรวมกลุ่มเกษตรกรเพื่อปลูกข้าวปลอดภัยจากสารเคมีมากยิ่งขึ้น เพื่อเป็นการช่วยเหลือด้านข้อมูลและวิธีการควบคุมโรคที่สำคัญทางเศรษฐกิจของข้าวจึงเกิดการศึกษาวิจัยของหน่วยวิจัยพืชเขตร้อน มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์สายพันธุ์ต่าง ๆ ของหน่วยวิจัยฯ โดยเฉพาะรา *T. asperellum* NST–009 ที่แยกได้จากรากเฟิร์นมหาสดำที่เจริญบนเทือกเขาหลวง จังหวัดนครศรีธรรมราช ซึ่งผ่านการทดสอบว่ามีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมโรครากเน่าโคนเน่าทุเรียน โรครากเน่าโคนเน่าส้มเขียวหวาน โรคแอนแทรคโนสพริก โรคกาบใบเน่าข้าว โรคเมล็ดด่างของข้าว และโรคเน่าระดับดินมะเขือเทศ (Intana *et al*., 2016; Intana *et al*., 2009) โดยเปรียบเทียบกับราปฏิปักษ์สายพันธุ์การค้าและสารเคมีที่เกษตรกรนิยมใช้ อันจะนำมาซึ่งความสำเร็จในการจัดการโรคข้าวและการลดต้นทุนการผลิต และจะก่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดต่อการปลูกข้าวของเกษตรกรในพื้นที่ตลอดจนเกษตรกรผู้ปลูกข้าวทั่วประเทศต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. แยกและทดสอบความสามารถในการก่อโรคพืช

สำรวจและเก็บตัวอย่างใบข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 ในเขตลุ่มน้ำปากพนัง อำเภอปากพนัง จังหวัดนครศรีธรรมราช ที่เป็นโรคใบขีดสีน้ำตาลจำนวน 4 แปลงนา ก่อนนำมาแยกราสาเหตุโรคด้วยวิธี tissue transplanting technique (Agrios, 2005) โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) ที่เติม streptomycin (PDAS) ที่อุณหภูมิ 27 ± 2 องศาเซลเซียส จากนั้นนำราทุกไอโซเลตที่แยกได้มาเลี้ยงให้บริสุทธิ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ก่อนจำแนกชนิดโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพื่อคัดเลือกรา *C. oryzae* (Sattasakulchai *et al*., 2010)

เลี้ยงรา *C. oryzae* ทุกไอโซเลตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน จึงเติมน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ ก่อนใช้แปรงขนอูฐกวาดสปอร์ราไปกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No 1 พร้อมปรับความเข้มข้นของสปอร์ที่ระดับ 1.0 x 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร นำสปอร์แขวนลอยดังกล่าวปริมาตร 5 มิลลิลิตร ไปพ่นบนใบข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 ที่มีอายุ 1 เดือน ก่อนใช้ถุงพลาสติกใสชื้นคลุมต้นข้าวพร้อมกระถางเป็นเวลา 2 วัน จึงเปิดถุงพลาสติก และเมื่อ 14 วันหลังการพ่นสปอร์ราทดสอบจึงบันทึกความรุนแรงในการก่อโรค โดยเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่พ่นน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ (Prasad *et al.,* 2014) วางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) กรรมวิธี ๆ ละ 4 ซ้ำ (1 ซ้ำ คือ 1 กระถางที่ปลูกต้นข้าว 2 ต้น แต่ละต้นมีจำนวนใบทดสอบจำนวน 3 ใบ)

คำนวณเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคด้วยการดัดแปลงจากสูตรของ Sattasakulchai *et al*. (2010) คือ DS = (Nd/Nc) × 100 เมื่อ Nd คือ จำนวนใบข้าวที่เกิดโรคในแต่ละกรรมวิธี และ Nc คือ จำนวนใบข้าวทั้งหมดในแต่ละกรรมวิธี (24 ใบ)

2. จุลินทรีย์ปฏิปักษ์

จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ใช้ในการทดลองมี 4 สายพันธุ์ คือ *T. asperellum* NST–009 ซึ่งเป็นราปฏิปักษ์สายพันธุ์ท้องถิ่นที่มีประสิทธิภาพสูงมากในการควบคุมโรคและสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นข้าวได้ดี แบคทีเรีย *B. subtilis* NST–002 และ *B. subtilis* NST–008 เป็นแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ท้องถิ่นที่แยกได้จากรากข้าวพันธุ์สังข์หยดและมีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมโรคกาบใบเน่าของข้าว (Sattasakulchai *et al*., 2010) และรา *T. asperellum* CB–Pin–01 ที่เป็นสายพันธุ์การค้าในประเทศไทยปัจจุบัน ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการการควบคุมโรคพืชโดยชีวภาพ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม

3. ทดสอบการยับยั้งและคลุมทับเส้นใยราก่อโรค

3.1 สำหรับราปฏิปักษ์ เลี้ยงรา *T. asperellum* และ *C. oryzae* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุณหภูมิ 27 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 และ 5 วัน ตามลำดับ ก่อนเจาะบริเวณปลายเส้นใยราทั้ง 2 ชนิด ด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตร แล้วนำไปวางในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ในแนวตรงข้ามกันและห่างกัน 6.0 เซนติเมตร พร้อมบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 27 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน จึงคำนวณประสิทธิภาพราปฏิปักษ์ในการยับยั้งและคลุมทับเส้นใยราก่อโรค

3.2 สำหรับแบคทีเรียปฏิปักษ์ นำชิ้นวุ้นเส้นใยรา *C. oryzae* ดังในข้างต้นมาวางตรงกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA จากนั้นย้ายเซลล์เดี่ยว แบคทีเรีย *B. subtilis* แต่ละไอโซเลตมาแตะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยให้ห่างจากปลายเส้นใยของราก่อโรคเป็นระยะ 2 เซนติเมตร จำนวน 4 จุด ในแนวกากบาท บ่มจานเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 27 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จึงบันทึกบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ที่แบคทีเรีย *B. subtilis* สร้างขึ้นเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (น้ำนึ่งฆ่าเชื้อ)

คำนวณการยับยั้งโดยสูตร $[(P_C - P_T)/P_C] \times 100$ เมื่อ P_C คือ ค่าเฉลี่ยรัศมีเส้นใยรา *C. oryzae* ในกรรมวิธีควบคุม และ P_T คือ ค่าเฉลี่ยรัศมีเส้นใยรา *C. oryzae* ในกรรมวิธีทดสอบ และคำนวณอัตราคลุมทับเส้นใยราก่อโรคด้วยสูตร (D/T) เมื่อ D คือ ค่าเฉลี่ยรัศมีเส้นใยราปฏิปักษ์คลุมทับเส้นใยราก่อโรค โดยวัดเริ่มจากตำแหน่งที่เส้นใยราทั้งสองสัมผัสกัน (เซนติเมตร) และ T คือระยะเวลาตั้งแต่เส้นใยราทั้งสองสัมผัสกันจนถึงวันบันทึกผลการทดลอง (วัน) (Yenjit and Intana, 2013)

4. การเตรียมจุลินทรีย์เพื่อทดสอบการควบคุมโรค

4.1 รา เลี้ยงราทุกชนิด *(T. asperellum* และ *C. oryzae)* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุณหภูมิ 27 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ก่อนนำสปอร์ของราดังกล่าวมาทำสปอร์แขวนลอยที่ความเข้มข้น 1.0×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ทดลองต่อไป (Intana *et al*., 2016)

4.2 แบคทีเรีย เลี้ยงแบคทีเรีย *B. subtilis* บนอาหาร Nutrient glucose agar (NGA) ที่อุณหภูมิ 27 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนนำโคโลนีแบคทีเรียมาทำเซลล์แขวนลอยความเข้มข้น 1.0×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยค่าความขุ่นของเซลล์เมื่อวัดด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร มีค่า optical density (OD) เท่ากับ 0.2 (Yenjit and Intana, 2013)

5. ประสิทธิภาพการควบคุมโรค

ปลูกข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 ในกระถางขนาดกว้าง 12 นิ้ว จำนวน 3 ต้นต่อกระถาง เมื่อต้นข้าวมีอายุ 1 เดือน ตัดใบข้าวให้เหลือต้นละ 4 ใบ และทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมโรคใบขีดสีน้ำตาล โดยการพ่นสปอร์หรือเซลล์แขวนลอยของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (ดังที่เตรียมในข้อ 3) ปริมาตร 5 มิลลิลิตรต่อกระถาง (สำหรับกรรมวิธีที่ใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ 2 ชนิดร่วมกัน พ่นชนิดละ 2.5 มิลลิลิตรต่อกระถาง) จากนั้น 24 ชั่วโมง พ่นสปอร์แขวนลอยราก่อโรค *C. oryzae* Ce–NST–03 ปริมาตร 5 มิลลิลิตรต่อกระถาง ก่อนคลุมต้นข้าวทั้งกระถางด้วยถุงพลาสติกใสชื้นและเก็บกระถางข้าวไว้ในโรงเรือนปลูกพืชทดลองเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จึงนำถุงพลาสติกออก หลังจากนั้น 14 วัน พ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ บันทึกความรุนแรงของโรคใบขีดสีน้ำตาลแต่ละกรรมวิธี โดยเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม 2 (ใส่รา *C. oryzae*) และกรรมวิธีใช้สารเคมี carbendazim วางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (CRD) กรรมวิธี ๆ ละ 4 ซ้ำ (1 ซ้ำ คือ 1 กระถางที่ปลูกต้นข้าว 3 ต้น แต่ละต้นมีจำนวนใบข้าวทดสอบจำนวน 4 ใบ) คำนวณเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคดังสูตรในข้อ 1

สำหรับเปอร์เซ็นต์การลดความรุนแรงในการเกิดโรคคำนวณด้วยสูตร $100-(DS_T/DS_C) \times 100$ เมื่อ DS_T คือเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคในกรรมวิธีทดสอบ และ DS_C คือเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคในกรรมวิธีควบคุม 2 ใส่เฉพาะรา *C. oryzae* (Sattasakulchai *et al*., 2010)

6. บันทึกปริมาณและการครอบครองใบข้าวของจุลินทรีย์

หลังทดสอบการควบคุมโรค 30 วัน นำใบข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 ในแต่ละกรรมวิธีมาตรวจปริมาณและการครอบครองใบข้าวโดยจุลินทรีย์ ซึ่งในการตรวจปริมาณจุลินทรีย์ใช้วิธีการ dilution spread plate technique โดยนำตัวอย่างใบข้าวในแต่ละกรรมวิธีปริมาณ 5 กรัม มาผสมในน้ำนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 45 มิลลิลิตร ก่อนเขย่าด้วยเครื่องเขย่าดิจิตอล (ยี่ห้อ DAIHAN รุ่น SHO 2D) ความเร็ว 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเจือจางสารแขวนลอยใบข้าวที่ความเข้มข้น 10^{-4}–10^{-5} เท่า ดูดสารแขวนลอยใบข้าวปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มาเกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Martin's medium และ NGA สำหรับตรวจปริมาณรา และแบคทีเรียตามลำดับ ก่อนบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 27 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน จึงบันทึกปริมาณจุลินทรีย์ในแต่ละกรรมวิธี (Intana *et al*., 2009)

การครอบครองใบข้าวตรวจโดยนำใบข้าวในแต่ละกรรมวิธีมาตัดเป็นสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาด 0.5 x 0.5 เซนติเมตร จำนวน 40 ชิ้น (ซ้ำละ 10 ชิ้น จำนวน 4 ซ้ำ) ก่อนนำไปใส่ในขวดแก้วรูปชมพู่ที่บรรจุน้ำนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร พร้อมเขย่าด้วยเครื่องเขย่าดิจิตอล ความเร็ว 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนำชิ้นใบข้าวมาซับให้แห้งด้วยกระดาษทิชชูนึ่งฆ่าเชื้อ ก่อนนำใบข้าววางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และ NGA สำหรับตรวจรา และแบคทีเรีย ตามลำดับ โดยวางจานเลี้ยงเชื้อละ 5 ชิ้น จำนวน 8 จานเลี้ยงเชื้อต่อกรรมวิธี บ่มจานเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 27 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน ก่อนบันทึกเปอร์เซ็นต์การตรวจพบจุลินทรีย์ที่เจริญออกมาจากชิ้นใบข้าวในแต่ละกรรมวิธี (Intana *et al*., 2009)

7. การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของข้อมูลด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างสิ่งทดลองด้วยวิธี Dancan's New Multiple Range Test โดยใช้โปรแกรม SPSS version 10.0 (Institutes of Computer and Information Technology, 2010)

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. แยกและทดสอบความสามารถในการก่อโรคพืช

สามารถแยกรา *Cercospora* spp. ได้ทั้งหมด 4 ไอโซเลต (Ce–NST–01–04) จากตัวอย่างใบข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 ที่เป็นโรคใบขีดสีน้ำตาล ซึ่งแต่ละไอโซเลตเจริญได้เร็วปานกลางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุณหภูมิ 27 ± 2 องศาเซลเซียส โดยสามารถเจริญคลุมทั่วอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ในเวลา 8 วัน

เมื่อทดสอบความสามารถในการก่อโรคบนใบข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 อายุ 1 เดือน พบว่า ทุกไอโซเลตสามารถก่อโรคใบขีดสีน้ำตาลได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีความรุนแรงของโรคในช่วง 45.84–79.17 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (sterilized water) โดยเฉพาะไอโซเลต Ce–NST–03 ที่ก่อโรคได้รุนแรงที่สุดที่ 79.17 เปอร์เซ็นต์ (Table 1) สำหรับอาการของโรคที่พบคือใบข้าวเกิดรอยแผลแคบ ๆ สีน้ำตาลตามแนวยาวของใบ ซึ่งเป็นลักษณะที่เด่นชัดของโรคใบขีดสีน้ำตาล จากผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่ารา *Cercospora* spp. ที่แยกได้ทุกไอโซเลตเป็นเชื้อก่อโรคใบขีดสีน้ำตาลของข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 จึงระบุสปีชีส์ของราเป็น *C. oryzae*

Table 1 Disease severity of *Cercospora oryzae* on Pathum Thani 1 rice leaves after treatment for 14 days under greenhouse conditions

Treatments	Collection place	Disease severity (%)[1]
Ce–NST–01	Pak Panang district	54.17 [b]
Ce–NST–02	Pak Panang district	66.67 [ab]
Ce–NST–03	Pak Panang district	79.17 [a]
Ce–NST–04	Pak Panang district	45.84 [c]
Control (sterilized water)	–	0.00 [d]
CV (%)		16.14

Note: [1] Percentage of disease severity, by the formula: DS=(Nd/Nc) × 100, when Nd=numbers of rice leaves showed narrow brow spot and Nc=a total rice leaves in each treatment (24 leaves). Mean in each column followed by the same letter were not significantly different according to Duncan's Multiple Range Test DMRT (P = 0.05).

2. ทดสอบการยับยั้งและคลุมทับเส้นใยราก่อโรค

ราปฏิปักษ์ *T. asperellum* ทั้ง 2 สายพันธุ์ (NST–009 และ CB–Pin–01) สามารถยับยั้งและคลุมทับเส้นใยราก่อโรค *C. oryzae* Ce–NST–03 ได้อย่างสมบูรณ์ในระยะเวลา 6 วันหลังการทดลอง โดยรา *T. asperellum* NST–009 มีประสิทธิภาพการยับยั้งและคลุมทับเส้นใยราก่อโรคได้สูงที่สุดที่ 79.34 เปอร์เซ็นต์ และ 0.61 เซนติเมตรต่อวัน ตามลำดับ ในขณะที่ *T. asperellum* CB–Pin–01 มีประสิทธิภาพที่ 71.73 เปอร์เซ็นต์ และ 0.49 เซนติเมตรต่อวัน ตามลำดับ (Table 2)

สำหรับแบคทีเรีย *B. subtilis* พบว่าทั้ง 2 สายพันธุ์ (NST–002 และ NST–008) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา *C. oryzae*

Ce–NST–03 โดยการสร้างบริเวณใส (inhibition zone) ที่มีความกว้างในช่วง 4.14–5.32 มิลลิเมตร โดยเฉพาะแบคทีเรีย *B. subtilis* NST–002 ที่พบบริเวณใสของการยับยั้งกว้างสุดที่ 5.32 มิลลิเมตร อย่างไรก็ตาม พบว่า แบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 2 สายพันธุ์ ไม่สามารถเจริญคลุมทับเส้นใยราก่อโรคได้ (Table 2)

Table 2 Efficacy of antagonistic microorganisms to inhibit and overgrow mycelial of *Cercospora oryzae* Ce–NST–03 in the dual culture test at room temperature for 6 days

Treatments	Mycelial growth Inhibition (%)	Overgrow mycelial (mm per day)	Inhibition zone (mm)
T. asperellum NST–009	79.34[a]	0.61[a]	–
T. asperellum CB–Pin–01	71.73[b]	0.49[a]	–
B. subtilis NST–002	40.12[c]	–	5.32[a]
B. subtilis NST–008	38.07[c]	–	4.14[a]
CV (%)	13.52	3.76	3.61

Note: Mean in each column followed by the same letter were not significantly different according to Duncan's Multiple Range Test DMRT (P > 0.05)

3. ประสิทธิภาพการควบคุมโรค

จากการทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทั้ง 4 สายพันธุ์ ในการลดความรุนแรงของโรคใบขีดสีน้ำตาลของข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 ในสภาพโรงเรือนปลูกพืชทดลอง พบว่า ทุกกรรมวิธีที่ใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทั้งการใส่ชนิดเดียว และการใส่ 2 ชนิดร่วมกันสามารถลดความรุนแรงของโรคได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในช่วง 26.83–73.17 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม 2 (with *C. oryzae*) โดยกรรมวิธีที่ใช้ *T. asperellum* NST–009 + *B. subtilis* NST–002 สามารถลดความรุนแรงในการเกิดโรคได้สูงที่สุดที่ 73.17 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือกรรมวิธีที่ใช้ *T. asperellum* NST–009 + *T. asperellum* CB–Pin–01 ที่ลดความรุนแรงในการเกิดโรคที่ 68.30 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกรรมวิธีที่ใช้สารเคมี carbendazim สามารถลดความรุนแรงในการเกิดโรคที่ 70.73 เปอร์เซ็นต์ (Table 3) จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทั้งรา *T. asperellum* และแบคทีเรีย *B. subtilis* สามารถลดความรุนแรงของโรคใบขีดสีน้ำตาล ของข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 ได้ ซึ่งสอดคล้องกับหลายรายงานที่กล่าวว่า รา *Trichoderma* spp. เป็นราปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพสูงมากในการทำลายราในกลุ่ม *Cercospora* spp. โดยมีกลไกที่สำคัญคือการเป็นราปรสิต การสร้างสารปฏิชีวนะ และการสร้างเอนไซม์ นอกจากนี้ ในการควบคุมโรคพืชรา *Trichoderma* spp. ยังมีกลไกเพิ่มเติมคือการแข่งขันเพื่อแย่งปัจจัยในการดำรงชีวิต การชักนำให้เกิดความต้านทานในต้นพืช และการครอบครองส่วนต่าง ๆ ของพืช เช่น ใบ กิ่งก้าน ลำต้น ราก และส่วนผลผลิตพืช เป็นต้น ทำให้ประสิทธิภาพการควบคุมโรคสูงยิ่งขึ้น (Cerato *et al*., 2004; Hasan *et al*., 2016; Singh *et al*., 2015) เช่นเดียวกับแบคทีเรีย *B. subtilis* ที่มีรายงานว่าสามารถทำลายและควบคุมโรคพืชที่เกิดจากราในกลุ่ม *Cercospora* spp. ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยมีกลไกในการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของเส้นใย ยับยั้งการงอกของสปอร์ ตลอดจนการสร้างสารพิษ

ทำลายเส้นใยและสปอร์ราโรคพืชได้ (Chamswarng, 2017; Srimai and Akarapisarn, 2014; Ragachander *et al*., 2005) เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการลดความรุนแรงของโรคระหว่างการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *T. asperellum* ร่วมกับ *B. subtilis* กับการใช้สารเคมี carbendazim พบว่า การใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์สามารถลดความรุนแรงของโรคได้สูงกว่าแต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับการใช้สารเคมี ทั้งนี้เนื่องจากจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทั้ง 2 ชนิดมีกลไกที่หลากหลายในการควบคุมโรคที่แบ่งได้ 3 ประเภท คือ 1. การยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค (สร้างสารปฏิชีวนะ และสร้างเอนไซม์) 2. การทำลายเชื้อก่อโรค (เป็นราปรสิต สร้างสารพิษ และแย่งปัจจัยในการดำรงชีวิต) และ 3. การปกป้องหรือกระตุ้นความแข็งแรงในต้นพืช (การกระตุ้นภูมิคุ้มกันในต้นพืชและการเจริญครอบครองส่วนต่าง ๆ ของต้นพืช) จึงทำให้การควบคุมโรคพืชมีประสิทธิภาพสูงกว่าการใช้สารเคมีได้ (Chamswarng, 2017; Intana *et al*., 2016; Howell, 2002)

Table 3 Rice narrow brow spot disease severity and disease reduction after treatment with four strains of antagonistic microorganisms for 14 days under greenhouse conditions

Treatments	Disease severity (%)[1]	Disease reduction (%)[2]
T. asperellum NST–009	29.17 [bc]	65.85 [e]
T. asperellum CB–Pin–01	33.34 [bc]	60.97 [de]
B. subtilis NST–002	52.08 [d]	39.03 [c]
B. subtilis NST–008	62.50 [e]	26.83 [b]
T. asperellum NST–009 + *T. asperellum* CB–Pin–01	27.08 [bc]	68.30 [e]
T. asperellum NST–009 + *B. subtilis* NST–002	22.92 [b]	73.17 [f]
T. asperellum NST–009 + *B. subtilis* NST–008	41.67 [c]	51.22 [d]
T. asperellum CB–Pin–01 + *B. subtilis* NST–002	31.25 [bc]	63.42 [de]
T. asperellum CB–Pin–01 + *B. subtilis* NST–008	39.58 [c]	53.66 [d]
B. subtilis NST–002 + *B. subtilis* NST–008	54.17 [d]	36.58 [c]
Carbendazim	25.00 [b]	70.73 [f]
Control 1 without *C. oryzae*	0.00 [a]	100.00 [g]
Control 2 with *C. oryzae*	85.42 [f]	0.00 [a]
CV (%)	10.60	8.21

Note: [1] Percentage of rice narrow brow spot disease severity after treated with *C. oryzae* for 14 days
[2] Rice narrow brow spot reduction after treated with *C. oryzae* for 14 days
Mean in each column followed by the same letter were not significantly different according to Duncan's Multiple Range Test DMRT (P > 0.05)

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกรรมวิธีที่ใส่จุลินทรีย์ปฏิปักษ์เพียงชนิดเดียวกับกรรมวิธีที่ใส่ 2 ชนิดร่วมกัน พบว่า กรรมวิธีที่ใส่จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ 2 ชนิดร่วมกันให้ผลในการลดการเกิดโรคใบขีดสีน้ำตาลของข้าวได้มากกว่ากรรมวิธีที่ใส่เพียงชนิดเดียว แสดงให้เห็นว่า การใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *2* ชนิดร่วมกันทำให้ประสิทธิภาพการควบคุมโรคพืชสูงขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Harman (2000) และ Intana *et al*. (2016) ที่กล่าวว่าการนำจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มาใช้ร่วมกันในการควบคุมโรคพืช ทำให้ประสิทธิภาพการควบคุมโรคพืชดียิ่งขึ้น ซึ่งอาจเป็นเพราะจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เหล่านี้สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตซึ่งกันและกัน หรือจุลินทรีย์ปฏิปักษ์อาจสามารถเจริญเพิ่มปริมาณและเจริญครอบครองส่วนต่าง ๆ ของพืชได้ดียิ่งขึ้นจึงสามารถช่วยปกป้องต้นพืชจากเชื้อก่อโรคได้ดีกว่าการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์เพียงชนิดเดียว หรือ การใส่ร่วมกันทำให้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์มีกลไกการควบคุมโรคพืชหลากหลายมากยิ่งขึ้น เช่น ราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. มีกลไกที่สำคัญคือการเป็นราปรสิต การสร้างสารปฏิชีวนะ การสร้างเอนไซม์ การแข่งขันเพื่อแย่งปัจจัยในการดำรงชีวิต การชักนำให้เกิดความต้านทานในต้นพืช และการครอบครองส่วนต่าง ๆ ของพืช (ราก ลำต้น กิ่งก้าน ใบ และผลผลิตของพืช) ส่วนแบคทีเรีย *B. subtilis* มีกลไกที่สำคัญคือการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของเส้นใยและการงอกของสปอร์เชื้อก่อโรค การสร้างสารพิษทำลายเส้นใยและสปอร์เชื้อก่อโรค ตลอดจนการเพิ่มปริมาณและครอบครองส่วนต่าง ๆ ของพืชได้อย่างรวดเร็ว จึงส่งผลให้เมื่อนำมาใช้ร่วมกันมีประสิทธิภาพสูงกว่าการใช้เพียงชนิดเดียว (Chamswarng, 2017; Intana *et al*., 2016; Harman, 2005) และยังพบว่าแบคทีเรีย *B. subtilis* สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ร่วมกับรา *T. asperellum* NST–009 ได้ โดยเมื่อโคโลนีของจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิดเจริญชนกันเป็นเวลา 5 วัน พบว่าจุลินทรีย์ดังกล่าวยังมีชีวิตรอดเมื่อนำมาแยกให้บริสุทธิ์ (Sattasakulchai *et al*., 2010)

4. บันทึกปริมาณและการครอบครองใบข้าวของจุลินทรีย์

จากการตรวจปริมาณจุลินทรีย์บนใบข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 หลังทดสอบการควบคุมโรคเป็นเวลา 30 วัน พบว่า สามารถตรวจพบจุลินทรีย์ปฏิปักษ์บนใบข้าวในทุกกรรมวิธีที่ใส่จุลินทรีย์ดังกล่าว โดยตรวจพบในช่วง 0.17×10^5–9.22×10^6 CFU ต่อใบข้าว 1 กรัม โดยเฉพาะกรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรีย *B. subtilis* NST–002 + *B. subtilis* NST–008 ที่ตรวจพบปริมาณมากที่สุดที่ 9.22×10^6 CFU ต่อใบข้าว 1 กรัม รองลงมาคือ กรรมวิธีที่ใช้ *B. subtilis* NST–002 และ *B. subtilis* NST–008 ซึ่งตรวจพบในปริมาณ 8.72×10^6 และ 6.58×10^6 CFU ต่อใบข้าว 1 กรัม ตามลำดับ ในขณะที่กรรมวิธีที่ไม่ใส่จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (with carbendazim, Control 1 without *C. oryzae* และ Control 2 with *C. oryzae*) ไม่สามารถตรวจพบจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (Table 4) ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่า จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทุกสายพันธุ์สามารถมีชีวิตรอดและเจริญเพิ่มปริมาณได้บนใบข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 ที่เจริญเติบโตในโรงเรือนปลูกพืชทดลองหลังพ่นจุลินทรีย์ทดสอบเป็นระยะเวลา 30 วัน ซึ่งสอดคล้องกับหลายรายงานที่กล่าวว่า ทั้งรา *T. asperellum* และแบคทีเรีย *B. subtilis* เป็นจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในดิน (soil born fungi) ที่มีศักยภาพสูงมากในการปรับตัวให้อยู่รอดตามสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ทั้งในดินและบนส่วนต่าง ๆ ของต้นพืช รวมทั้งส่วนใบของพืช โดยคอยอาศัยสารต่าง ๆ ที่เซลล์พืชปล่อยออกสู่ภายนอกเซลล์ (plant exudates) เพื่อการเจริญเติบโตและเพิ่มปริมาณ อย่างไรก็ตาม ปริมาณจุลินทรีย์บนใบพืชดังกล่าวอาจมีความผันแปรมากกว่าในดิน เนื่องจากส่วนเหนือดินของพืชมีสภาพแวดล้อมที่มีความผันแปรสูงมาก โดยเฉพาะในช่วงเวลากลางวัน (Intana *et al*., 2016; Ragachander *et al*., 2005; Cerato *et al*., 2004; Howell, 2002)

สำหรับการครอบครองใบข้าว พบว่า ทุกกรรมวิธีที่ใส่จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ตรวจพบการครอบ

ครองใบข้าวในช่วง 53.00–100.00 เปอร์เซ็นต์ โดยเฉพาะกรรมวิธีที่ใส่จุลินทรีย์ *T. asperellum* NST–009, *T. asperellum* NST–009 + *T. asperellum* CB–Pin–01 และ *T. asperellum* NST–009 + *B. subtilis* NST–002 ที่พบการครอบครองใบข้าวสูงที่สุดที่ 100.00 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กรรมวิธีที่ไม่ใส่จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (with carbendazim, Control 1 without *C. oryzae* และ Control 2 with *C. oryzae*) ไม่สามารถตรวจพบการครอบครองใบข้าวของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (Table 4) ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทุกสายพันธุ์สามารถเจริญเพิ่มปริมาณและเข้าครอบครองผิวใบข้าวได้ (phylloplane) ซึ่งสอดคล้องกับหลายรายงานที่กล่าวว่าจุลินทรีย์ *T. asperellum* และ *B. subtilis* มีศักยภาพสูงมากในการเจริญเพิ่มปริมาณเข้าครอบครองรากหรือส่วนต่าง ๆ ของพืชได้ ทั้งลำต้น กิ่งก้าน ใบ และผลผลิตพืช ซึ่งคุณสมบัติการครอบครองส่วนของพืชนี้ถือเป็นกลไกที่เด่นและสำคัญที่ทำให้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ประสบความสำเร็จสูงมากเมื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการควบคุมโรคพืช เพราะทำให้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ดังกล่าวสามารถปกป้องส่วนต่าง ๆ ของพืชเพื่อไม่ให้เชื้อก่อโรคเข้ามาทำลายต้นพืชได้ (Chamswarng, 2017; Intana *et al*., 2016; Harman, 2005; Howell, 2002) Harman, 2000

Table 4 Populations of antagonistic microorganisms on rice leaf and rice leaf colonization after treatment for 30 days under greenhouse conditions

Treatments	Population of microorganisms ($x10^6$ CFU/g)[1]	Rice leaf colonization (%)[2]
T. asperellum NST–009	0.48	100.00 [a]
T. asperellum CB–Pin–01	0.17	97.50 [ab]
B. subtilis NST–002	8.72	67.00 [c]
B. subtilis NST–008	6.58	53.00 [d]
T. asperellum NST–009 + *T. asperellum* CB–Pin–01	0.26	100.00 [a]
T. asperellum NST–009 + *B. subtilis* NST–002	4.71	100.00 [a]
T. asperellum NST–009 + *B. subtilis* NST–008	4.42	91.50 [b]
T. asperellum CB–Pin–01 + *B. subtilis* NST–002	3.93	96.00 [ab]
T. asperellum CB–Pin–01 + *B. subtilis* NST–008	3.74	87.50 [b]
B. subtilis NST–002 + *B. subtilis* NST–008	9.22	60.00 [c]
Carbendazim	0.00 [e]	0.00 [e]
Control 1 without *C. oryzae*	0.00 [e]	0.00 [e]
Control 2 with *C. oryzae*	0.00 [e]	0.00 [e]
CV (%)	12.36	9.05

Note: [1] Population of microorganisms on rice leaf when assay by dilution spread plate technique using Martin's medium and Nutrient glucose agar

[2] Rice leaf colonization of antagonistic microorganisms after observe on Potato dextrose agar and Nutrient glucose agar

Mean in each column followed by the same letter were not significantly different according to Duncan's Multiple Range Test DMRT (P = 0.05)

สรุป

ราปฏิปักษ์ *T. asperellum* NST–009 และ *T. asperellum* CB–Pin–01 สามารถเจริญคลุมทับทำลายเส้นใยรา *C. oryzae* Ce–NST–03 ได้ และจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทั้ง 4 สายพันธุ์ (*T. asperellum* NST–009, T. asperellum CB–Pin–01, B. subtilis NST–002 และ B. subtilis NST–008) ยังสามารถยับยั้งการเจริญเส้นใยราก่อโรคได้ นอกจากนี้ จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทุกสายพันธุ์สามารถลดการเกิดโรคใบขีดสีน้ำตาลบนใบข้าว สามารถเจริญเพิ่มปริมาณบนใบข้าว และสามารถเจริญเข้าครอบครองใบข้าวได้ ซึ่งคุณสมบัติเหล่านี้ทำให้การใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมโรค ซึ่งจะนำมาสู่ความยั่งยืนและแนวทางในการเพิ่มประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคพืชโดยเฉพาะการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ 2 ชนิดร่วมกัน

กิตติกรรมประกาศ

ขอบคุณหน่วยวิจัยพืชเขตร้อนแห่งมหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ ที่สนับสนุนอุปกรณ์และอำนวยความสะดวกในการวิจัย และขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.จิระเดช แจ่มสว่าง ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตกำแพงแสน ที่อนุเคราะห์ราปฏิปักษ์สายพันธุ์การค้า

เอกสารอ้างอิง

Agrios, G.N. 2005. Plant Pathology. 5th ed. Academic Press. New York, USA. 922 p.

Cerato, C., P.L. Bruzi, S. Galletti, P. Stevanato and R. Ghedini. 2004. Integrated control of Cercospora leaf spot by *Trichoderma* spp. application on sugar beet leaves. pp. 59. *In* 67th IIRB congress, Brussels, Belgium.

Chamswarng, C. 2017. *Trichoderma* antagonistic fungus for plant disease control. Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University Kamphaeng Saen Campus. Nakhon Pathom, Thailand. (In Thai).

Harman, G.E. 2000. Myths and dogmas of biocontrol change in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T–22. Plant Dis. 84: 377–393.

Harman, G.E. 2005. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. Phytopathology 96(2): 190–194.

Hasan, M.M., N.B. Islam, S. Naznin, M.M. Islam and K.E. Mustarin. 2016. Management of Cercospora leaf spot of Indian Spinach (*Basella alba* L.) with BAU bio–fungicide and a plant growth promoting hormone. Univ. J. Plant Sci. 4(4): 43–49.

Howell, C.R. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. Plant Dis. 87: 4–10.

Institutes of Computer and Information Technology. 2010. IBM SPSS Statistics for Windows. King Mongkut's University of Technology North Bangkok. Bangkok, Thailand. (in Thai)

Intana, W., C. Chamswarng, C. Ngamriabsakul and K. Chantrapromma. 2009. The increased efficacy of tangerine root rot control by using combination of mutant strains of *Trichoderma harzianum*. Philipp. Agric. Scientist. 92 (1): 39–45.

Intana, W., A. Promwee and P. Yenjit. 2016. Using combination of wild type and mutant strains of *Trichoderma asperellum* for increasing the efficacy to control damping-off disease of tomato. Agricultural Sci. J. 47(3): 351–362. (in Thai).

Kumar, H., S. Ahmad, S. Zacharia, S. Kumar and A. Ali. 2017. Impact of different fungicides combination against brown leaf spot (*Drechslera oryzae*) of rice under the *in vitro* and *in vivo.* J. Pharmacogn. Phytochem. 6(1): 341–344.

Prasad, R., S. Acharya, S. Erickson and J. Thomas. Identification of Cercospora leaf spot resistance among fenugreek accessions and characterization of the pathogen. Aust. J. Crop Sci. 8(6): 822–830.

Raguchander, T., K. Prabakar and R. Samiyappan. 2005. Held evaluation of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* on the management of Cercospora leaf spot and powdery mildew in Urdbean. Legume Res. 28 (2): 137–139.

Sattasakulchai, S., M. Issarakraisila, S. Maneepong. and W. Intana. 2010. Efficacy of *Bacillus* spp. indigenous strains on the reduction of sheath rot disease and yield increment of rice. Agricultural Sci. J. 41(3): 309–318. (In Thai).

Singh, U. 2015. Biocontrol of Cercospora Leaf Spot on *Trigonella foenumgraecum L*. in Kota District Rajasthan. Int. J. Sci. Res. 78: 1650–1651.

Srimai, K. and A. Akarapisarn. 2014. *Bacillus subtilis* LBF02 as biocontrol agent against leaf spot diseases caused by *Cercospora lactucae–sativae* in lettuce. J. Agricultural Sci. 6(3): 151–158.

Yenjit, P. and W. Intana. 2013. Efficacy of fermented plants extracts using *Trichoderma viride* and *Rhizopus oligosporus* to control rice blast disease. Agricultural Sci. J. 44(3): 281–288. (in Thai)