

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: RMU5080019

ชื่อโครงการ : การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตพืชในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน

และความสามารถในการต่อต้านโรครากเน่าโดยวิธีการทางชีวภาพและเขตกรรม

ชื่อนักวิจัย : รศ.ดร.ถนิมนันต์ เจนอักษร และ ผศ.ดร.พรหมมาศ คุณากาญจน์

คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
กรุงเทพฯ

รศ.ดร.สุตฤดี ประเทืองวงศ์

คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ

E-mail Address : kjtanimn@kmitl.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : ธันวาคม 2549 – ธันวาคม 2552

เทคโนโลยีการปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน จัดเป็นระบบการผลิตพืชแบบหนึ่งที่ยั่งยืน โดยมีการใช้ปัจจัยในการผลิตต่างๆ อย่างคุ้มค่า ทำให้เกิดผลกระทบต่อสภาวะแวดล้อมน้อย อีกทั้งยังสามารถหลีกเลี่ยงเชื้อสาเหตุโรคทางดิน รวมทั้งแก้ไขข้อด้อยบางประการของการปลูกพืชในดินได้ แต่อย่างไรก็ตาม ปัญหาที่สำคัญประการหนึ่งของการปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินที่ยังประสบอยู่ในขณะนี้ คือ ปัญหาเรื่องโรครากเน่าที่เกิดจากเชื้อ *Pythium* spp. เนื่องจากในกรณีที่มีการปนเปื้อนของเชื้อดังกล่าวลงในระบบนี้ สารละลายธาตุอาหารพืชที่ใช้หมุนเวียนในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินจะกลายเป็นสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการดำรงชีพและแพร่กระจายของเชื้อสาเหตุโรค อีกทั้งเชื้อดังกล่าวจะฉวยโอกาสเข้าทำลายพืชในขณะที่พืชอ่อนแอหรือมีบาดแผล การนำแนวทางการป้องกันกำจัดโรคพืชแบบชีววิธีมาใช้ในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน น่าจะเป็นวิธีการที่ให้ผลดีและไม่ส่งผลกระทบต่อในทางลบต่อนิเวศน์วิทยาของระบบการผลิตพืช ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาการผลิตผักสลัด (Lettuce; *Lactuca sativa* L.) ในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินให้สอดคล้องกับการเกษตรยั่งยืน โดยมุ่งเน้นการนำชีววิธีและเขตกรรมมาใช้เพื่อควบคุมโรครากเน่าของผักสลัด งานวิจัยแบ่งออกเป็น 4 ส่วน กล่าวคือ ส่วนแรก จะเป็นการประเมินประสิทธิภาพของชีวผลิตภัณฑ์ 4 รูปแบบที่มีจำหน่ายในท้องตลาดสำหรับควบคุมโรคพืชที่ปลูกในดิน และแบคทีเรียเขตรากพืชที่เป็นประโยชน์ 4 สายพันธุ์ที่ผ่านการเผยแพร่แล้วว่ามีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคที่สำคัญหลายชนิด เพื่อควบคุมโรครากเน่าของผักสลัดในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน จากการทดลองพบว่าชีวผลิตภัณฑ์ทั้ง 4 รูปแบบนั้นไม่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคดังกล่าวในระบบ NFT ได้ ซึ่งไม่สอดคล้องกับผลงานวิจัยที่ผ่านมาที่ทดสอบในระบบ DFT น่าจะเป็นผลมาจากระบบ NFT ไม่เหมาะสมในการรักษาระดับปริมาณของเชื้อปฏิปักษ์ในคังที่และสูงเพียงพอที่จะใช้ควบคุมเชื้อสาเหตุโรคได้ และรูปแบบของชีวผลิตภัณฑ์ที่ไม่เหมาะสมกับการนำมาใช้ในระบบนี้ รวมทั้งตัวคุณภาพของชีวผลิตภัณฑ์ สำหรับการทดลองของเชื้อแบคทีเรียเขตรากพืชที่เป็นประโยชน์นั้น พบว่าจะไม่มี

ประสิทธิภาพในการควบคุมโรครากเน่าโดยการใช้โดยการใส่ลงในสารละลายธาตุอาหารพืชโดยตรง สำหรับการใช้คลุกเมล็ด พบว่าเชื้อ *Pseudomonas fluorescens* SP007s ให้ผลดีที่สุดในด้านการงอกของเมล็ด ส่งเสริมการเจริญของต้นกล้าผักสลัด green oak ภายใต้สภาพห้องปฏิบัติการ ยิ่งไปกว่านั้นหากนำมาใช้คลุกเมล็ดรวมกับการใส่ไปในสารละลายธาตุอาหารพืชจะให้ผลดีที่สุดในการยับยั้งการเกิดโรคและส่งเสริมการเจริญเติบโตของผักสลัด

จากข้อจำกัดข้างต้นของการนำชีวผลิตภัณฑ์ที่ใช้ควบคุมโรคพืชที่ปลูกในดินมาใช้ในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน จึงดำเนินการทดลองในส่วนที่ 2 และ 3 เพื่อสำรวจ คัดเลือกและประเมินประสิทธิภาพของเชื้อราและแบคทีเรียคุณภาพจากส่วนต่างๆ ของพืชและสารละลายธาตุอาหารพืชในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน เพื่อใช้ในการควบคุมโรครากเน่าดังกล่าวต่อไป จากการทดลองพบว่าสามารถแยกเชื้อราเขตรากพืชได้ 60 ไอโซเลท และมีเพียง 20 ไอโซเลทที่แสดงศักยภาพในการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ต่อเชื้อสาเหตุโรคใน bi-culture test โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อ *Pythium* spp. ที่อายุ 3 วัน ได้ไม่เกิน 40 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะเห็นว่าค่อนข้างต่ำ เนื่องจากเชื้อปฏิปักษ์ดังกล่าวมีอัตราการเจริญเติบโตช้า ในขณะที่เชื้อสาเหตุโรคเจริญเร็ว ดังนั้นกิจกรรมในการแข่งขัน (competition) ของเชื้อปฏิปักษ์กับเชื้อสาเหตุจึงไม่เด่นชัด แต่อย่างไรก็ตามสามารถตรวจพบประสิทธิภาพในการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ได้ดีของเชื้อราปฏิปักษ์ 3 ไอโซเลท คือ A003, A018 และ A 019 ในวันที่ 20 หลังจากการบ่มเชื้อ โดยเชื้อราปฏิปักษ์จะเจริญครอบคลุมเชื้อสาเหตุโรคได้เกือบทั้งหมด ซึ่งเป็นกลไกของ exploitation สำหรับการทดสอบในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน พบว่า เชื้อราปฏิปักษ์ทั้ง 3 ไอโซเลทนั้น แสดงศักยภาพในการลดความรุนแรงของโรคและเพิ่มผลผลิต น้ำหนักสดของผักสลัดเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ไม่ใช้เชื้อราปฏิปักษ์แต่มีการปลูกเชื้อสาเหตุโรค (Inoculated control) สำหรับงานวิจัยในส่วนที่สามเป็นการหาสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียชนิดใหม่ในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน (Indigenous antagonistic bacteria) ที่มีศักยภาพในการควบคุมโรครากเน่าในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียจากผิวใบภายในรากพืชและสารละลายธาตุอาหารในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินได้ทั้งหมด 468 ไอโซเลท และพบว่า 9 ไอโซเลทมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อ *Pythium* spp. โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ในช่วง 65.8-87.9 เปอร์เซ็นต์ โดยแบคทีเรียเขตรากพืช KUKL205 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อสาเหตุโรคได้สูงสุด โดยมีกลไกการยับยั้งใน Bi-culture test เป็นแบบ antibiosis และมีศักยภาพเท่าเทียมกับ *Pseudomonas fluorescens* SP007s ซึ่งเป็นสายพันธุ์ทางการค้า สำหรับการทดสอบในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน พบว่า ทุกกรรมวิธีที่มีการคลุกเมล็ดด้วยแบคทีเรียเขตรากพืช รวมทั้ง KUKL205 พืชไม่แสดงอาการรากเน่าเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ไม่ได้ใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ แต่อย่างไรก็ตามผลของการคลุกเมล็ดด้วยแบคทีเรียเขตรากพืชไม่ได้ดีไปกว่าพืชปกติ สำหรับการสะสมเอนไซม์ β -1, 3-glucanase พบว่าผลเป็นไปในทิศทางเดียวกับการเกิดโรคในกรณีของพืชที่ได้รับการคลุกเมล็ดด้วยแบคทีเรียเขตรากพืชทั้งสองชนิด (KUKL205 และ SP007s) และมีการปลูกเชื้อสาเหตุโรคจะแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ดังกล่าวสูงกว่าพืชที่มีการปลูกเชื้อสาเหตุโรคเพียงอย่างเดียว เท่าที่ได้มีการศึกษามา การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์

3- 1, 3-glucanase ในการทดลองนี้ เป็นงานวิจัยแรกที่ได้มีการรายงานเกี่ยวกับการชักนำให้เกิดความต้านทานโดยใช้ PGPR ในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน

สำหรับการทดลองในส่วนที่ 4 นี้ เป็นการประเมินประสิทธิภาพเชื้อแบคทีเรียร่วมกับเชื้อราเขตรากพืชชนิดใหม่จากระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน (new indigenous antagonist) ในการควบคุมโรครากเน่าของผักสลัดในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน โดยมุ่งเน้นไปที่ synergistic effect ของเชื้อปฏิปักษ์ทั้ง 2 กลุ่ม โดยใช้แบคทีเรียเขตรากพืช KUKL205 ในรูปแบบของการคลุกเมล็ด (10^6 CFU/ml) และใช้เชื้อราปฏิปักษ์ 3 ไอโซเลท ในรูปแบบของการจุ่มรากและใส่ลงในสารละลายธาตุอาหารพืช (10^8 CFU/ml) พบว่าสำหรับการใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ (KUKL205) เพียงอย่างเดียว (T1) ให้ผลในการลดความรุนแรงของโรคได้ดีไม่แตกต่างทางสถิติจากกรรมวิธีที่มีการใช้ร่วมกับเชื้อราปฏิปักษ์อีก 3 ไอโซเลท (T2, T3, T4) ในวันที่ 21 หลังจากปลูกเชื้อสาเหตุโรค แต่ดีกว่ากรรมวิธีที่มีการปลูกเชื้อสาเหตุเพียงอย่างเดียว (T5: Inoculated control) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นแสดงให้เห็นว่า การใช้ร่วมกันของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์และเชื้อราปฏิปักษ์อีก 3 ไอโซเลท ไม่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเพิ่มขึ้น (synergistic effect) แต่อย่างไรก็ตาม synergistic effect กลับตรวจพบได้ในด้านการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในกรรมวิธี T2 (KUKL205 + antagonistic fungus A003) ให้ผลน้ำหนักสดของต้นสูงกว่ากรรมวิธีที่ใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์เพียงอย่างเดียว (T1)

สำหรับจุลินทรีย์เขตรากพืชชนิดใหม่ที่เป็นประโยชน์ในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินที่ได้จากโครงการวิจัยนี้คือ เชื้อแบคทีเรียเขตรากพืช *Bacillus* sp. (จำแนกตามลักษณะทางชีวเคมี และ 16S rRNA-PCR) และเชื้อราปฏิปักษ์เขตรากพืช *Trichoderma harzianum* 2 ไอโซเลท และ *Gliocladium* sp. 1 ไอโซเลท

คำหลัก : โรครากเน่าผักสลัด, *Lactuca sativa* L., ระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน, PGPR, *Trichoderma harzianum*, *Gliocladium* sp.

Abstract

Project Code : RMU5080019

Project Title : Hydroponic crop improvement against root rot disease through biological and cultural measures

Investigator : Assoc. Prof. Dr. Tanimnun Jaenaksorn and

Asst. Prof. Dr. Prommart Koohakan

Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology
Ladkrabang, Bangkok, Thailand

Assoc. Prof. Dr. Sutruedee Prathuangwong

Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok, Thailand

E-mail Address : kjtanimn@kmitl.ac.th

Project Period : December 2006 – December 2009

Hydroponics originally came about to eliminate many of the variables that contribute to disease in the field, but other negative variables may have been created in the process. At present, *Pythium* causing root rot is a real problem in recirculating hydroponic systems as they provide ideal condition for rapid growth and spread of infectious propagules. Besides, it is an opportunistic disease which means that it is looking for weak or injured plants. Biological-based approach to hydroponic cultivation may probably provide a helping hand in managing the root disease and maintaining a more sustainable and hydroponic crop ecosystem. Therefore, the research was conducted to improve the hydroponic crop production against root rot disease of lettuce (*Lactuca sativa* L.) through biological and cultural measures. The research consisted of four parts. First, the evaluation were made on the efficacy of the four formulations of commercial fungal bioproducts presently available for conventional crops and the four reported-beneficial rhizosphere bacteria having high antagonistic potential in suppressing important pathogens for controlling *Pythium* root rot of lettuce grown in hydroponics. It was found that the four formulations of fungal bioproducts for soil-grown crops were in effective against *Pythium* root rot disease of lettuce in NFT which are not in line with recent observation with other DFT crops suggesting that the products might be host specific in controlling. Besides, it is possible that NFT might not provide the ideal condition to maintain the population of biocontrol agent in the system sufficient enough to control the disease compared to that in DFT. The unsuited formulation to hydroponics as well as quality of the product would possibly be attributed to the

experiment. For the four reported-beneficial rhizosphere bacteria, directly applying them into the hydroponic nutrient solution gave unsatisfactory result in controlling *Pythium* root rot of lettuce since their survival in the system were hardly detected. Applying the beneficial rhizosphere bacteria as seed treatment, *Pseudomonas fluorescens* (SP007s) gave the best result in terms of percent seed germination and growth of green oak seedling under laboratory condition. Seed treatment + directly adding into nutrient solution gave the best result in decreasing the disease incidence and increasing the crop growth.

Due to the efficacy limit of the forementioned-bioproducts for conventional crops to be used in hydroponics, therefore, the second and third parts of the research were conducted to find out and determine the new indigenous microorganisms including PGPR from hydroponic systems as biocontrol agents which would be an alternative biological-based approach for sustainable disease management. It was found that 60 indigenous fungal isolates were obtained from hydroponics and some of them showed the *in vitro* antagonistic ability against the mycelial growth of *Pythium* sp. at 3 days less than 40 percent growth inhibition which was rather low. This might due to the slow growth rate of these indigenous fungi. Hence, competition was not responsible for this regard. However, the *in vitro* abilities of fungal antagonists A003, A018 and A019 became quite satisfactory at 20 days since *Pythium* colony was almost covered by these 3 indigenous fungi and exploitation was observed. Furthermore, the three isolates of fungal antagonists also gave good results in decreasing the *Pythium* root rot disease severity and increasing shoot fresh weight of lettuce in hydroponics compared to that in inoculated control without tested antagonists. Regarding the new indigenous rhizobacteria, it was found that 468 strains of miscellaneous endophytic and epiphytic bacteria were obtained from recirculating hydroponic systems and some strains were shown to be effective in inhibiting the *in vitro* growth of *Pythium* about 65.8-87.9 percent. KUKL205 showed the best potential to produce secondary metabolite equivalent to commercial strain *Pseudomonas fluorescens* SP007s for suppressing the target pathogen in bi-culture test. In hydroponic trial, all the bacterial treated plants as seed treatment (KUKL205 included) showed no symptom of root rot compared to the non-treated plants. In line with disease incidence, it was found that the accumulation of β -1, 3 glucanase, a defense-related enzyme was greater in bacterial antagonists-treated plants compared to that in inoculated control. To our knowledge, this is the first report about induced systemic resistance under hydroponics with plant growth promoting rhizobacteria.

The fourth part was conducted to determine the efficacy of the obtained-beneficial indigenous fungal antagonists (3 isolates) together with the indigenous PGPR (KUKL205)

for controlling *Pythium* root rot of lettuce grown in the DFT. The emphasis was placed on synergistic effect between antagonistic bacterium and antagonistic fungus. Indigenous KUKL205 was used as seed treatment (10^6 CFU/ml), while the 3 isolates of indigenous fungal antagonists were applied as root-dip solution and added into DFT nutrient solution at the concentration of 10^8 CFU/ml (10 ml per plant). The results showed that the application of the indigenous KUKL205 alone (T1) and with the 3 isolates of indigenous fungal antagonists (T2, T3 and T4) did provide significant control (on 21 dpi) of root rot disease compared to that in the inoculated control. No synergistic effect between the indigenous KUKL205 and the 3 indigenous isolates of fungal antagonists (A003, A018 and A019) was noted on disease control efficacy. However, synergistic effect on plant growth was significantly noted in T2 (KUKL205 and antagonistic fungus A003).

The beneficial indigenous rhizosphere microorganisms obtained from this research are as follow: KUKL205 indentified as *Bacillus* sp. (base on biochemical and 16S rRNA-PCR characterization), antagonistic fungi A003, A018 and A019 indentified as 2 isolates of *Trichoderma harzianum* and 1 isolate of *Gliocladium* sp.

Keywords : *Pythium* root rot, lettuce, *Lactuca sativa* L., hydroponics, PGPR, *Trichoderma harzianum*, *Gliocladium* sp.