



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตพืชในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน
และความสามารถในการต่อต้านโรครากเน่าโดยวิธีการ
ทางชีวภาพและเขตกรรม

**Hydroponic Crop Improvement Against Root Rot Disease
Through Biological and Cultural Measures**

โดย

รศ.ดร.ถนิมฉันทน์ เจนอักษร

ผศ.ดร.พรหมมาศ คุณหากาญจน์

รศ.ดร.สุดฤดี ประเทืองวงศ์

มกราคม 2553

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตพืชในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน
และความสามารถในการต่อต้านโรครากเน่าโดยวิธีการ
ทางชีวภาพและเขตกรรม

Hydroponic Crop Improvement Against Root Rot Disease
Through Biological and Cultural Measures

โดย

รศ.ดร.ณิมนันต์ เจนอักษร

ผศ.ดร.พรหมมาศ คุณหาญจัน

คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร
ลาดกระบัง

รศ.ดร.สุฤดี ประเทืองวงศ์

คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

และสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัย (สกว.) และ สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) ที่สนับสนุนทุนวิจัยในการดำเนินงานโครงการวิจัยนี้

ขอขอบคุณคณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และ คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่สนับสนุนด้านอุปกรณ์ เครื่องมือและครุภัณฑ์ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาเขาหินซ้อน โครงการส่วนพระองค์ จ. ฉะเชิงเทรา, โครงการพัฒนาส่วนพระองค์ ตำบลบางแตน อ. บ้านสร้าง จ. ปราจีนบุรี, ศูนย์ศึกษาการพัฒนาเขาหินซ้อนฯ อ. พนมสารคาม จ. ฉะเชิงเทรา, แหล่งปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินตามโครงการพระราชดำริ หลังร้าน Golden place งามคำแหง กรุงเทพฯ, ฟาร์ม Higreen กรุงเทพฯ, สวน ส.ส. อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา, แหล่งปลูกผักไฮโดรโปนิกส์บางปู จ.สมุทรปราการ และ โครงการส่วนพระองค์ลูกพระดาบส จ. สมุทรปราการ แหล่งปลูกผักไฮโดรโปนิกส์ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ในการเก็บตัวอย่างมาทำการวิจัยนี้

สุดท้ายนี้ ขอขอบคุณนักศึกษาปริญญาเอกและปริญญาโท ห้องปฏิบัติการโรคพืช สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่มีส่วนร่วมในงานวิจัยนี้

คุณค่าและประโยชน์อันพึงได้รับจากโครงการวิจัยเล่มนี้ คณะผู้วิจัยขอมอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

คณะผู้วิจัย

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 สารละลายธาตุอาหารพืชที่ใช้หมუნเวียนในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินจะกลายเป็นสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการดำรงชีพและแพร่กระจายของเชื้อสาเหตุโรค 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 สำหรับการใส่คลุกเมล็ด พบว่าเชื้อ *Pseudomonas fluorescens* SP007s ให้ผลดีที่สุดในการงอกของเมล็ด ส่งเสริมการเจริญของต้นกล้าผักสลัด green oak ภายใต้สภาพห้องปฏิบัติการ ยิ่งไปกว่านั้นหากนำมาใช้คลุกเมล็ดรวมกับการใส่ลงในสารละลายธาตุอาหารพืชจะให้ผลดีที่สุดในการยับยั้งการเกิดโรคและส่งเสริมการเจริญเติบโตของผักสลัด

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) ในการควบคุมโรคเน่าของผักสลัดในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน 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 : โรคเน่าของผักสลัด, *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.

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	v
สารบัญ.....	viii
สารบัญตาราง	x
สารบัญภาพ.....	xii
คำนำ.....	1
1. การสำรวจโรครากเน่าของผักสลัด การประเมินประสิทธิภาพในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินของชีวผลิตภัณฑ์ราและแบคทีเรียเขตรากพืชที่ใช้ในดินที่ผ่านการเผยแพร่แล้ว	3
1.1 การทดสอบเบื้องต้น	3
1.1.1 การสำรวจโรครากเน่าที่เกิดจากเชื้อ <i>Pythium</i> spp. ในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน.....	3
1.1.2 การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค (Pathogenicity) ที่เกิดจากเชื้อ <i>Pythium</i> spp. บนผักสลัดในระบบ Deep Flow Technique (DFT).....	3
1.2 การประเมินประสิทธิภาพชีวผลิตภัณฑ์รา (biocontrol products) ที่มีจำหน่ายในท้องตลาด ในการควบคุมโรครากเน่าของผักสลัดในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน	13
1.3 การประเมินประสิทธิภาพสายพันธุ์แบคทีเรียเขตรากพืชที่ได้รับการเผยแพร่แล้วในการควบคุมโรครากเน่าของผักสลัดในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน	18
1.3.1 การประเมินประสิทธิภาพสายพันธุ์แบคทีเรียเขตรากพืชที่ได้รับการเผยแพร่แล้วในการควบคุมโรครากเน่าของผักสลัด Cos ที่ปลูกใน NFT	18
1.3.2 การประเมินประสิทธิภาพสายพันธุ์แบคทีเรียเขตรากพืชที่ได้รับการเผยแพร่แล้วในการควบคุมโรครากเน่าของผักสลัด Green oak ที่ปลูกใน DRFT	22
2. การหาสายพันธุ์เชื้อราชนิดใหม่ในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน (Indigenous antagonistic fungi) ที่มีศักยภาพในการควบคุมโรครากเน่าในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน	26
2.1 การสำรวจ เก็บรวบรวมสายพันธุ์เชื้อราในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน.....	26
2.2 การทดสอบประสิทธิภาพในการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์ในสภาพห้องปฏิบัติการ.....	26
2.3 การทดสอบประสิทธิภาพในการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์ในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน	31

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
3. การหาสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียชนิดใหม่ในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน (Indigenous antagonistic bacteria) ที่มีศักยภาพในการควบคุมโรครากเน่าในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน.....	41
3.1 การเก็บรวบรวม แยกเชื้อ และจัดกลุ่มแบคทีเรียที่มีประโยชน์.....	41
3.1.1 การแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์.....	41
3.1.2 จัดกลุ่มแบคทีเรียที่มีประโยชน์.....	42
3.2 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียในการยับยั้งเชื้อ <i>Pythium</i> spp. สาเหตุโรครากเน่าของผักในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน ระดับห้องปฏิบัติการ.....	44
3.3 การประเมินประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียเขตรากพืช (new indigenous, KUKL205) ในการควบคุมโรค <i>Pythium</i> root rot ของผักสลัดในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน (DRFT)	46
4. การประเมินประสิทธิภาพเชื้อแบคทีเรียร่วมกับเชื้อราปฏิปักษ์เขตรากพืชชนิดใหม่จากระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน (new indigenous antagonist) ในการควบคุมโรครากเน่าของผักสลัดในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน	50
5. รายละเอียดของเชื้อจุลินทรีย์เขตรากพืชที่เป็นประโยชน์ในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินที่ได้จากโครงการวิจัย	57
สรุปและข้อเสนอแนะ.....	59
บรรณานุกรม	63
Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.	66
ภาคผนวก	67

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1.1 ลักษณะอาการผิดปกติของรากที่เกิดจากเชื้อ <i>Pythium</i> spp. ในผักสลัด Cos ที่ปลูกในระบบ DFT	6
1.2 ลักษณะอาการผิดปกติของรากที่เกิดจากเชื้อ <i>Pythium</i> spp. ในผักสลัด Red oak ที่ปลูกในระบบ DFT	7
1.3 การเจริญเติบโตของผักสลัด COS ในสารละลายธาตุอาหารพืชของระบบ DFT ที่มีการปลูกเชื้อ <i>Pythium</i> spp.	9
1.4 การเจริญเติบโตของผักสลัด Red oak ในสารละลายธาตุอาหารพืชของระบบ DFT ที่มีการปลูกเชื้อ <i>Pythium</i> spp.	10
1.5 แสดงการเข้าครอบครองรากของเชื้อ <i>Pythium</i> spp. ในผักสลัด Cos และ Red oak หลังจากทำการปลูกเชื้อไปเป็นเวลา 1 และ 4 สัปดาห์	12
1.6 ประสิทธิภาพของชีวผลิตภัณฑ์ต่อความรุนแรงของโรครากเน่าของผักสลัด Cos ที่ปลูกในระบบ NFT	15
1.7 การเจริญเติบโตและผลผลิตในวันเก็บเกี่ยวของผักสลัด Cos ที่ปลูกในระบบ NFT ที่มีการใช้ชีวผลิตภัณฑ์เพื่อควบคุมโรครากเน่า	16
1.8 ความรุนแรงของโรครากเน่าของผักสลัด Cos ใน NFT ที่มีการใส่เชื้อแบคทีเรียเขตรากพืชที่ได้รับการเผยแพร่แล้ว 4 สายพันธุ์ และ ชีวผลิตภัณฑ์ 1 ชนิด	19
1.9 การเจริญเติบโตและผลผลิตของผักสลัด Cos ใน NFT ที่มีการใส่เชื้อแบคทีเรียเขตรากพืชที่ได้รับการเผยแพร่แล้ว 4 สายพันธุ์ และ ชีวผลิตภัณฑ์ 1 ชนิด เพื่อควบคุมโรค <i>Pythium</i> root rot	21
1.10 ประสิทธิภาพการควบคุมเมล็ดด้วยแบคทีเรียเขตรากพืช 4 สายพันธุ์ (PGPR) ต่อการงอกและการเจริญของกล้าผักสลัด green oak ในสภาพห้องปฏิบัติการ	22
1.11 การทดสอบความเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อแบคทีเรียเขตรากพืชต่อการเจริญทางเส้นใยของ <i>Pythium</i> spp.	23
1.12 ความมีชีวิตของ <i>Pseudomonas fluorescens</i> (SP007s) ในสารละลายธาตุอาหารพืช	24
1.13 ผลของ <i>Pseudomonas fluorescens</i> (SP007s) ต่อการเกิดโรค <i>Pythium</i> root rot ของผักสลัด green oak ที่ปลูกใน DRFT	25
2.1 การสำรวจและเก็บรวบรวมเชื้อราในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน	28
2.2 แหล่งที่มาและจำนวนไอโซเลทของเชื้อราที่แยกได้	30
2.3 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญทางเส้นใยเชื้อ <i>Pythium</i> spp. ของการทดสอบ Bi-culture test ของเชื้อราเขตรากพืชของระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน ที่อายุ 3 วัน	31
2.4 แสดงการเกิดโรครากเน่าของผักสลัดจากเชื้อ <i>Pythium</i> spp. ในระบบ DRFT	35

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
2.5 แสดงปริมาณเชื้อราปฏิปักษ์ และ <i>Pythium</i> spp. ที่อยู่รอดที่รากพืชในระบบ DRFT ในวันเก็บเกี่ยว.....	38
2.6 การเจริญเติบโตและผลผลิตของผักสลัด butterhead ที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหารของระบบ DRFT ที่ใส่เชื้อราปฏิปักษ์และเชื้อราสาเหตุโรค.....	39
3.1 ลักษณะพื้นฐานทางด้านสัณฐานวิทยาของโคโลนี (รูปร่าง ขนาด และสี) ของแบคทีเรียที่เจริญบนผิวหน้าอาหารบนอาหาร NA ที่แยกได้จากส่วนต่างๆ ของพืช (ใบ ต้นและราก) สารละลายธาตุอาหารพืชที่ใช้ในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน.....	43
3.2 ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียที่มีคุณภาพจากระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินในการยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของ <i>Pythium</i> spp. ด้วยวิธี dual culture ในสภาพห้องปฏิบัติการ.....	45
4.1 ประสิทธิภาพร่วมของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราเขตรากพืชชนิดใหม่จากระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินต่อความรุนแรงของโรครากเน่าของผักสลัด Cos ที่ปลูกในระบบ mini-DRFT.....	54
4.2 การเจริญเติบโตและผลผลิตของผักสลัด Cos เมื่อเก็บเกี่ยว (อายุ 42 วัน).....	56

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1.1 แสดงอาการผิดปกติของรากที่เกิดจากเชื้อ <i>Pythium</i> spp. ในผักสลัด Cos ที่ปลูกในระบบ DFT	7
1.2 แสดงอาการผิดปกติของรากที่เกิดจากเชื้อ <i>Pythium</i> spp. ในผักสลัด Red oak ที่ปลูกในระบบ DFT	8
1.3 แสดงอิทธิพลของเชื้อ <i>Pythium</i> spp. ต่อการเจริญเติบโต (น้ำหนักสดของต้นและราก) ของผักสลัด Cos ที่ปลูกในระบบ DFT ในวันเก็บเกี่ยว.....	11
1.4 แสดงอิทธิพลของเชื้อ <i>Pythium</i> spp. ต่อการเจริญเติบโต (น้ำหนักสดของต้นและราก) ของผักสลัด Red oak ที่ปลูกในระบบ DFT ในวันเก็บเกี่ยว	11
1.5 ความอยู่รอดของเชื้อสาเหตุโรคและ BCAs ในสารละลายธาตุอาหารพืชในระหว่างการปลูกผักสลัด Cos ในระบบ NFT รวมทั้งปริมาณเชื้อดังกล่าวที่อยู่รอดที่รากพืชในวันเก็บเกี่ยว.....	16
1.6 การเจริญเติบโตในช่วงสัปดาห์ที่ 1, 2 และ เมื่อเก็บเกี่ยวของผักสลัด Cos ที่ปลูกในระบบ NFT ที่มีการใช้ชีวผลิตภัณฑ์เพื่อควบคุมโรครากเน่า (A); C2, T1, T2, T3 และ T4 แสดงอาการผิดปกติที่รากและเน่า (B).....	17
1.7 ความอยู่รอดของ <i>Pythium</i> spp. ในสารละลายธาตุอาหารพืชระหว่างการปลูกพืชใน NFT	20
1.8 การตรวจสอบกลับของความเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อ pathogen ของ BCA หลังจากใส่ลงในระบบปลูกพืช โดยวิธี Bi-culture.....	20
1.9 การเจริญเติบโตในวันเก็บเกี่ยวของผักสลัด Cos ที่ปลูกใน NFT ที่มีการใส่เชื้อแบคทีเรียเขตรากพืชที่ได้รับการเผยแพร่แล้ว 4 สายพันธุ์ และ ชีวผลิตภัณฑ์ 1 ชนิด เพื่อควบคุมโรค <i>Pythium</i> root rot	21
1.10 ผลของ <i>Pseudomonas fluorescens</i> (SP007s) ต่อการเจริญเติบโตทางเส้นใยของ <i>Pythium</i> spp. ใน Dual culture (A), Control (B) และ Mixed culture (A), Control (B)	23
1.11 ระบบ DRFT สำหรับประเมินประสิทธิภาพของแบคทีเรียเขตรากพืชในการควบคุมโรครากเน่าของผักสลัด green oak.....	25
1.12 การเจริญเติบโตและผลผลิตของผักสลัด green oak ที่ปลูกใน DRFT และใส่ <i>Pseudomonas fluorescens</i> (SP007s)	25
2.1 การทดสอบ Bi-culture test โดยใช้เชื้อราเขตรากพืชต่อต้านเชื้อ <i>Pythium</i> spp. สาเหตุโรครากเน่า.....	30

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
2.2 อาการโรครากเน่าของผักสลัด butterhead ที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหารของระบบ DRFT ที่ใส่เชื้อราปฏิปักษ์และเชื้อราสาเหตุโรค ในวันที่ 1, 3, 6 และ 8 หลังจากปลูกเชื้อสาเหตุโรคครั้งที่ 2	36
2.3 อาการโรครากเน่าของผักสลัด butterhead (A และ B) ที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหารของระบบ DRFT ที่ใส่เชื้อราปฏิปักษ์และเชื้อราสาเหตุโรค ในวันเก็บเกี่ยวผลผลิต.....	37
2.4 ระบบ DRFT ที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ในการควบคุมโรครากเน่าของผักสลัด	40
2.5 ผักสลัด butterhead ที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหารของระบบ DRFT ที่ใส่เชื้อราปฏิปักษ์และเชื้อราสาเหตุโรค ที่วันเก็บเกี่ยว	40
3.1 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของโคโลนี (รูปร่าง ขนาด และสี) ของกลุ่มแบคทีเรียที่เจริญบนผิวหน้าอาหารบนอาหาร NA ที่แยกได้จากส่วนต่างๆ ของพืช (ใบ ต้นและราก) สารละลายธาตุอาหารพืชที่ใช้ในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน	44
3.2 ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียที่มีคุณภาพ (KUKL 205) จากระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน ในการยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของ <i>Pythium</i> spp. ด้วยวิธี dual culture ในสภาพห้องปฏิบัติการ	46
3.3 ระบบ DRFT ที่ใช้ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียเขตรากพืช.....	47
3.4 ผลของการคลุกและไม่คลุกเมล็ดด้วยแบคทีเรียเขตรากพืช (KUKL205 และ SP007s) และ elicitor (SA) ต่อการควบคุมโรค <i>Pythium</i> root rot ของผักสลัด.....	48
3.5 กิจกรรมของ β -1, 3-glucanase ในผักสลัดที่คลุกและไม่คลุกเมล็ดด้วยแบคทีเรียเขตรากพืช (KUKL205 และ SP007s) และ elicitor (SA) เป็นเวลา 6 วัน (เริ่มหลังจากปลูกเชื้อสาเหตุโรค)	49
4.1 ลักษณะโรงเรือนและระบบ DRFT ที่ใช้ทดสอบประสิทธิภาพร่วมของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราปฏิปักษ์เขตรากพืชชนิดใหม่จากระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน (new indigenous antagonist) ในการควบคุมโรครากเน่าของผักสลัด.....	52
4.2 ผักสลัด Cos แสดงอาการรากเน่าที่เกิดจากเชื้อ <i>Pythium</i> spp. ในวันที่ 2, 11 และ 21 หลังจากปลูกเชื้อสาเหตุโรค.....	54
4.3 ความอยู่รอดของเชื้อ <i>Pythium</i> (A) และ เชื้อราปฏิปักษ์ (B) ที่รากผักสลัด Cos ในวันเก็บเกี่ยว	55
4.4 แสดงการเจริญเติบโตของผักสลัด Cos ในระบบ DRFT	55
5.1 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียเขตรากพืชในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน <i>Bacillus</i> sp. KUKL205 บนอาหาร NA	57

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
5.2 ลักษณะโคโลนีและลักษณะโครงสร้างของเชื้อราเขตรากพืชในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน ที่กำลังขยาย 400 เท่า (A) <i>Gliocladium</i> sp. A003 (B และ C) <i>Trichoderma harzianum</i> A018 และ 019 ตามลำดับ เลี้ยงบนอาหาร PDA.....	58

คำนำ

การผลิตทางการเกษตรในปัจจุบัน มีแนวโน้มที่จะปรับเปลี่ยนมาเป็นระบบการผลิตเชิงอุตสาหกรรมที่มีมาตรฐาน และความสามารถในการแข่งขันสูง ทั้งนี้สืบเนื่องมาจากนโยบายของรัฐในเรื่องของอาหารปลอดภัย (Food safety) และความพยายามในการผลักดันให้ประเทศไทยเป็นครัวของโลก (World kitchen) เหตุผลดังกล่าวทำให้การปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินเป็นเทคโนโลยีหนึ่งที่มีความสนใจจากเกษตรกรและผู้ประกอบการหลายราย และถูกนำมาใช้ในการผลิตเชิงการค้ามากขึ้น ซึ่งภายใต้กระบวนการผลิตดังกล่าว ผลผลิตที่ได้จะมีความสด สะอาด และปลอดภัยต่อผู้บริโภค มีสิ่งปนเปื้อนทางเคมี และทางชีวภาพน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับกระบวนการผลิตแบบดั้งเดิม การผลิตพืชโดยใช้ระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินยังเป็นการใช้ปัจจัยการผลิตต่างๆ ได้อย่างคุ้มค่า ทำให้เกิดผลกระทบต่อสภาพแวดล้อมน้อย ในขณะที่ยังคงให้ผลผลิตที่สูงต่อหนึ่งหน่วยพื้นที่ปลูกเมื่อเปรียบเทียบกับ การปลูกพืชในดิน ดังนั้นการนำเทคโนโลยีปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินนี้มาปรับใช้ให้เหมาะสมกับการเกษตรในประเทศไทย ก็จะเป็นทางหนึ่งที่จะช่วยลดการบุกรุกทำลายป่าเพื่อทำการเกษตรแบบดั้งเดิมลงได้ ซึ่งถือได้ว่าเป็นระบบการผลิตแบบหนึ่งที่ยั่งยืน อย่างไรก็ตาม ปัญหาที่สำคัญประการหนึ่งของการปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินที่ยังประสบอยู่ก็คือปัญหาเรื่องโรครากเน่าที่เกิดจากเชื้อ *Pythium* spp. เนื่องจากลักษณะการดำรงชีพและการแพร่กระจายของเชื้อสาเหตุชนิดนี้ มีความเหมาะสมต่อสภาพแวดล้อมของการปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน ในกรณีของการปลูกผักสลัดเป็นการค้าในประเทศไทย ที่ส่วนใหญ่มักกระทำในระบบปลูกแบบ Nutrient film technique (NFT) นั้น เชื้อดังกล่าวมีผลโดยตรงต่อผลผลิตโดยอย่างน้อยที่สุดจะทำให้การเจริญเติบโตลดลงไปในราว 40-60 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้ยังไม่รวมถึงความสูญเสียเนื่องจากพืชเป็นโรคตาย หากมีอุบัติการณ์ของโรคและการแพร่ระบาดเกิดขึ้น ในการป้องกันกำจัดโรคโคนเน่ารากเน่าในอดีตที่ผ่านมา จะใช้วิธีการจัดการต่างๆ เพื่อลดการปนเปื้อนของเชื้อสาเหตุเข้ามาในระบบ รวมไปถึงการฆ่าเชื้อในสารละลายธาตุอาหาร ซึ่งในปัจจุบันพบว่า เทคโนโลยีดังกล่าวก้าวหน้าไปมาก ในฟาร์มขนาดใหญ่ที่มีการผลิตภายในโรงเรือนปิดที่มีระบบการฆ่าเชื้อและสุขาภิบาลเป็นอย่างดี ที่ดูแล้วไม่น่าจะมีการปนเปื้อนของเชื้อสาเหตุเข้าไปในระบบการผลิตได้เลย แต่ก็ยังคงมีปัญหาของโรครากเน่าอยู่ แสดงให้เห็นว่าเชื้อสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคนี้อาจเป็นเชื้อที่มีอยู่แล้วในระบบปลูก ข้อสันนิษฐานดังกล่าวสอดคล้องกับผลการศึกษาที่ได้ทำไปแล้วพบว่า เชื้อ *Pythium* sp. ที่เป็นสาเหตุโรครากเน่าในผักสลัดที่ทำการปลูกเป็นการค้านั้น จะสามารถตรวจแยกได้ทั้งจากรากพืชจากต้นที่สมบูรณ์แข็งแรง และต้นที่เป็นโรครากเน่า แต่จะมีความแตกต่างในเรื่องของปริมาณเท่านั้น แสดงให้เห็นว่า *Pythium* sp. ที่เป็นสาเหตุโรครากเน่าในผักสลัดนั้นน่าจะเป็นพวก opportunistic microorganism และการแพร่ระบาดของโรคก็จะเริ่มจากเชื้อที่มีอยู่แล้วเดิมในรากพืชตามปกติ เพิ่มจำนวนขึ้นมาเมื่อได้รับสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเกิดโรค จนพืชดังกล่าวแสดงอาการของโรค จากนั้นก็จะมีการแพร่ระบาดไปยังส่วนอื่นๆ ต่อไป ดังนั้นการป้องกันกำจัดที่ได้ผลนั้น ควรจะกระทำที่ต้นตอของสาเหตุ นั่นคือควบคุมปริมาณเชื้อสาเหตุที่มีอยู่แล้วในต้นพืชให้อยู่ในระดับที่ไม่ก่อให้เกิดโรค หรือปรับปรุงสภาพแวดล้อมให้พืชมีความแข็งแรง อีกเหตุผลหนึ่งที่ทำให้ระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินค่อนข้างที่จะ susceptible ต่อการติด

เชื้อที่รากก็คือ การขาดสิ่งทีเรียกว่า “biological buffer” โดยจุลินทรีย์รอบๆ รากพืชที่ค่อนข้างมีอยู่น้อย กล่าวคือ มี biodiversity ค่อนข้างต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับพืชที่ปลูกในดิน เหตุผลดังกล่าวทำให้คณะผู้วิจัยเห็นว่าการควบคุมโดยชีววิธีโดยใช้จุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ จะเป็นแนวทางหนึ่งที่สำคัญในการลดความเสียหายเนื่องจากโรครากเน่าที่เกิดจากเชื้อ *Pythium* spp. และเพิ่มประสิทธิภาพของการผลิตพืชในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินได้ อีกทั้งในปัจจุบันชีวผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่ที่มีอยู่ในท้องตลาดก็จำกัดอยู่แค่ใช้ควบคุมโรคพืชที่ปลูกในดิน ซึ่งชีวผลิตภัณฑ์ดังกล่าวอาจยังไม่เหมาะสมกับการนำมาใช้ในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน จากปัญหาดังกล่าวจึงน่าจะมีการสำรวจและศึกษาถึงศักยภาพของจุลินทรีย์ท้องถิ่น (indigenous microorganisms) ที่มีอยู่แล้วในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน และพัฒนามาเป็นสารควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีตลอดจนวิธีการจัดการต่างๆ ในระหว่างการปลูก (cultural measures) เนื่องจากจุลินทรีย์ดังกล่าวจะไม่ทำอันตรายต่อพืชปลูก มีความดีเด่นในเรื่องของการเข้าครอบครอง (colonization) การปรับตัวและอยู่รอด (survival) ตลอดจนการตั้งรกรากถิ่นฐาน (establishment) ได้ดี จุลินทรีย์อีกกลุ่มหนึ่งที่มีความน่าสนใจได้แก่แบคทีเรียที่เข้าครอบครองภายใน (endophytic bacteria) และแบคทีเรียสนับสนุนการเจริญเติบโตของพืช (plant growth promoting rhizobacteria: PGPR) ซึ่งหลายรายงานระบุว่ามีความเหมาะสมในการสนับสนุนการเจริญเติบโตของพืชหรือชักนำพืชให้เกิดความต้านทาน (induced systemic resistance) ดังนั้นวัตถุประสงค์ในงานวิจัยนี้ เพื่อศึกษาและรวบรวมเชื้อจุลินทรีย์ (เชื้อราและเชื้อแบคทีเรีย) เชตรากพืชชนิดใหม่ที่เป็นประโยชน์จากระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน และประเมินประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าวที่ได้รับจากการรวบรวม เพื่อควบคุมเชื้อสาเหตุโรครากเน่าของผักสลัดในสภาพห้องปฏิบัติการและในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน อีกทั้งมีการประเมิน synergistic effect ของเชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าว ศึกษารูปแบบการใช้ แนวทางการพัฒนานำมาใช้ประโยชน์ในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน

การทดลอง

งานวิจัยครั้งนี้แบ่งการทดลองเป็น 4 ส่วน ดังนี้

1. การสำรวจโรครากเน่าของผักสลัด การประเมินประสิทธิภาพในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินของชีวผลิตภัณฑ์ราและแบคทีเรียเขตรากพืชที่ใช้ในดินที่ผ่านการเผยแพร่แล้ว

1.1 การทดสอบเบื้องต้น

1.1.1 การสำรวจโรครากเน่าที่เกิดจากเชื้อ *Pythium* spp. ในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน

ทำการสำรวจโรครากเน่าที่เกิดจากเชื้อ *Pythium* spp. ของผักที่ปลูกในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน ณ ฟาร์ม Higreen กรุงเทพฯ และ สวน สส. อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา โดยเก็บพืชผักสลัด Cos และ Red oak ที่แสดงอาการโรครากเน่า ต้นเหี่ยว มาแยกเชื้อสาเหตุโรคโดยวิธี tissue transplanting technique

1.1.2 การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค (Pathogenicity) ที่เกิดจากเชื้อ *Pythium* spp. บนผักสลัดในระบบ Deep Flow Technique (DFT)

เพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่รุนแรงของเชื้อ *Pythium* ซึ่งเป็นเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าของผักสลัดหลายชนิด จึงทำการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค (Pathogenicity) ของเชื้อ *Pythium* 3 สายพันธุ์ ที่แยกได้มาจากระบบ DRFT และ NFT กับผักสลัด 2 ชนิด คือ ผักสลัด Cos และ Red oak

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design ประกอบด้วย 4 ทรีทเมนต์ (ของเชื้อ *Pythium*) 2 ซ้ำๆ ละ 5 ต้น และทดลองกับผักสลัด 2 ชนิด

อุปกรณ์

- เชื้อ *Pythium* spp. 3 Isolates
 - Isolate 1 แยกได้จากผักสลัด Cos ที่เป็นโรครากเน่า จากระบบ DRFT และ NFT
 - Isolate 2 แยกได้จากผักสลัด Red oak ที่เป็นโรครากเน่า จากระบบ DRFT และ NFT
 - *Pythium aphanidermatum* ได้จาก stock ของห้อง Lab
- พืชผักสลัด
 - ผักสลัด Cos (*Lactuca sativa* L.) สายพันธุ์ Tiberius RZ
 - ผักสลัด Red oak (*Lactuca sativa* L.) สายพันธุ์ Mondai RZ
- ระบบ DFT
 - กะละมัง
 - สายยาง
 - ป้อนอากาศ

- ตัวปรับแรงดัน
 - แผ่นโฟม
 - เครื่องมือวัดการนำไฟฟ้า
 - เครื่องมือวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH-meter)
 - กรดไนตริก
 - สายละลายธาตุอาหารพืช
4. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ
- plate
 - test tube
 - อาหาร Potato Dextrose Agar (PDA)
 - อาหาร V-8 Broth
 - selective-media สำหรับ *Pythium*

วิธีการ

1. การปลูกพืช

1.1 การเตรียมระบบ DFT

ใส่น้ำลงในกะละมังให้ได้ปริมาตร 15 ลิตร แล้วผสมสารละลายอาหารสำหรับผักกินใบ Benoit (1992) ปรับค่า EC = 1.55 mS/cm และ ค่า pH อยู่ในช่วง 5.8-6.2

1.2 การเพาะเมล็ด

เพาะเมล็ดผักสลัด 2 ชนิด ได้แก่ ผักสลัด Red oak และ ผักสลัด Cos ลงในฟองน้ำชนิดละ 30 เมล็ด รดด้วยน้ำเป็นเวลา 4 วัน หลังจากนั้นรดด้วยสารละลายปุ๋ยที่มีค่า EC = 0.7 mS/cm และ pH 5.8 เป็นเวลา 3 วัน ก่อนที่จะย้ายลงระบบอนุบาลที่สารละลายปุ๋ยที่มีค่า EC = 0.7 mS/cm และ pH ในช่วง 5.8-6.2 อีกเป็นเวลา 1 สัปดาห์

1.3 การย้ายพืชลงระบบ DFT

ย้ายกล้าลงระบบ DFT ที่มีสารละลายที่มีค่า EC 1.55 mS/cm และค่า pH อยู่ในช่วง 5.8-6.2 ทำการดูแล ตรวจสอบเช็คสารละลายและปรับสารละลายใหม่เพื่อรักษาสภาพค่า EC และ pH ให้อยู่ในช่วงดังกล่าวทุกวันในช่วงเช้า

2. การปลูกเชื้อลงในระบบ

นำเชื้อ *Pythium* spp. แต่ละ Isolate เลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นเจาะเชื้อด้วย cork borer เบอร์ 2 ลงในอาหาร V-8 Broth แล้วนำไปวางบนเครื่องเขย่า วันละ 8 ชม. เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นเตรียม spore suspension ให้ได้ 4.8×10^6 sporangium/ml และใส่ลงในระบบปลูกพืชในแต่ละทรีทเมนต์

3. การตรวจสอบเชื้อสาเหตุในระบบในระหว่างการทดลอง

เพื่อยืนยันอีกครั้งหนึ่งว่า เชื้อสาเหตุในแต่ละทรีทเมนต์ยังเป็นเชื้อเดิมอยู่ ดังนั้น ในระหว่างการทดลอง (ในสัปดาห์ที่ 1 และ 4 หลังจากปลูกเชื้อ) จึงมีการนำรากที่แสดงอาการโรคมายกเชื้อสาเหตุอีกครั้งหนึ่ง โดยใช้ selective media พร้อมทั้งคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การครอบครองราก

การบันทึกผลและการเก็บข้อมูล

1. ข้อมูลทางด้านโรค

1.1 บันทึกอาการโรคทุกสัปดาห์หลังจากทำการปลูกเชื้อ

1.2 คำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การครอบครองรากพืชของเชื้อ *Pythium* spp. หลังจากปลูกเชื้อ 1 และ 4 สัปดาห์

2. ข้อมูลทางด้านพืช

2.1 การเจริญเติบโต (วัดทุกสัปดาห์)

2.1.1 จำนวนใบแท้

2.1.2 ความกว้าง และความยาวของใบ

2.1.3 ความสูงของต้น

2.2 ผลผลิต (เก็บผักสลัดเมื่ออายุ 6 สัปดาห์) โดยชั่งน้ำหนักสดต้นและราก

3. ข้อมูลทางสภาพแวดล้อม

3.1 คุณสมบัติของสารละลาย (EC, pH, อุณหภูมิ) ทำการตรวจวัดทุกวัน

3.2 ความเข้มแสง อุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์ในโรงเรือน

4. วิเคราะห์ผลทางสถิติ

ผลการทดลอง

จากการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค (Pathogenicity) ของเชื้อ *Pythium* 3 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากระบบ DRFT และ NFT กับผักสลัด 2 ชนิด คือ ผักสลัด Cos และ Red oak ที่ปลูกในระบบ DFT พบว่า เชื้อ *Pythium* ทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถทำให้เกิดโรครากเน่าต่างกัันดังแสดงในตารางที่ 1.1 และ 1.2 ภาพที่ 1.1 และ 1.2 อีกทั้งยังทำให้การเจริญเติบโต (ความสูงของต้น ขนาด และจำนวนใบ) และผลผลิตลดลง ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1-4 หลังจากปลูกเชื้อ pathogen แล้ว ดังตารางที่ 1.3 และ 1.4 ภาพที่ 1.3 และ 1.4 โดยจะพบว่า เชื้อ *Pythium* isolate1 นอกจากจะทำให้ผักสลัด Cos และ Red oak แสดงอาการโรคที่รากรุนแรงที่สุดแล้ว ยังส่งผลให้การเจริญเติบโตและผลผลิตของผักสลัดทั้งสองชนิดต่ำที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ *Pythium* isolate อื่นๆ ที่ทำการทดสอบ

จากการตรวจสอบเชื้อสาเหตุในระบบในระหว่างการทดลอง เพื่อยืนยันอีกครั้งหนึ่งว่าเชื้อสาเหตุในแต่ละทรีทเมนต์ยังเป็นเชื้อเดิมอยู่ โดยการแยกเชื้อสาเหตุจากรากผักสลัด เพื่อดูเปอร์เซ็นต์การครอบครองราก พบว่า ในสัปดาห์ที่ 1 เปอร์เซ็นต์การครอบครองรากของเชื้อ *Pythium* ทั้ง 3 ไอโซเลต ก่อนขำงต่ำ (0-6 เปอร์เซ็นต์) ในผักสลัดทั้ง 2 ชนิด ต่อมาในสัปดาห์ที่ 4 พบว่าเปอร์เซ็นต์

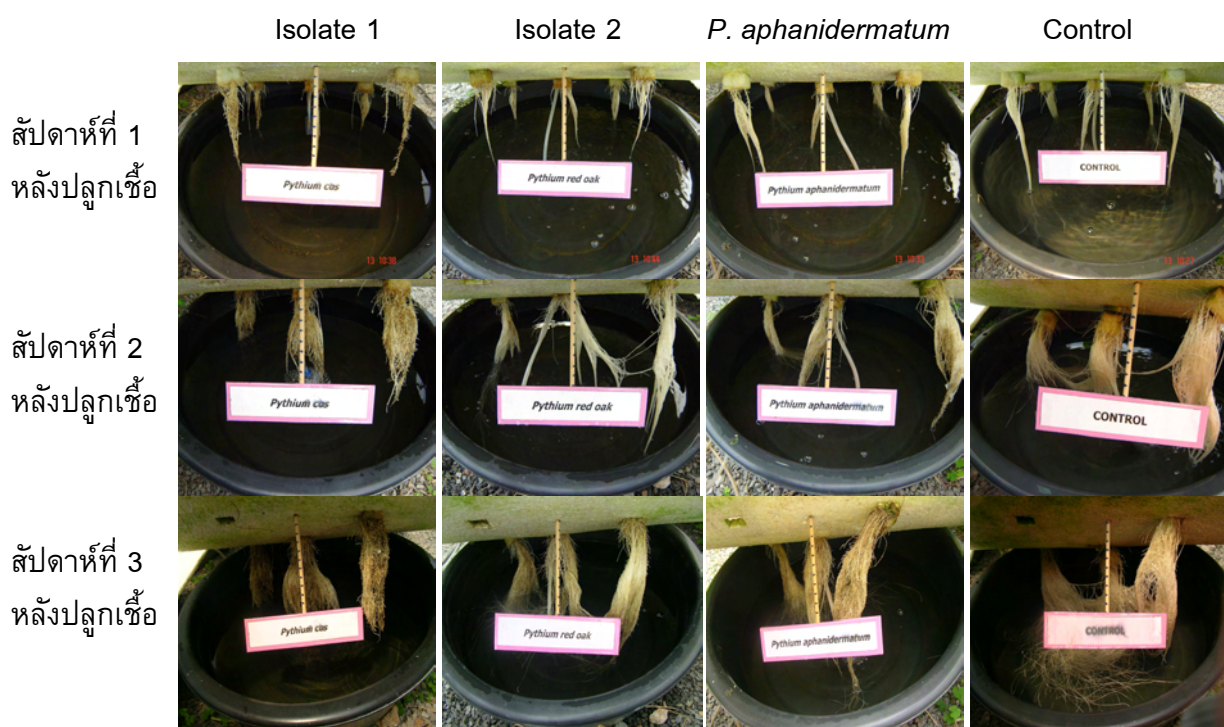
การครอบครองรากสูงขึ้นในทุกทรีทเมนต์ โดยในผักสลัด Cos มีเปอร์เซ็นต์การครอบครองรากสูงกว่าในผักสลัด Red oak โดยเฉพาะ *Pythium* ไอโซเลท 1 ยังมีเปอร์เซ็นต์การครอบครองรากสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับไอโซเลทอื่นๆ อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสังเกตว่า ในทรีทเมนต์ที่ไม่ได้ปลูกเชื้อ (Healthy control) กลับตรวจพบการครอบครองรากของเชื้อ *Pythium* ในเปอร์เซ็นต์ค่อนข้างสูงในสัปดาห์สุดท้าย ซึ่งน่าจะเป็น non-pathogenic *Pythium* เพราะว่าพืชดังกล่าวไม่ได้แสดงอาการโรคแต่อย่างใด (ตารางที่ 1.5)

ตารางที่ 1.1 ลักษณะอาการผิดปกติของรากที่เกิดจากเชื้อ *Pythium* spp. ในผักสลัด Cos ที่ปลูกในระบบ DFT

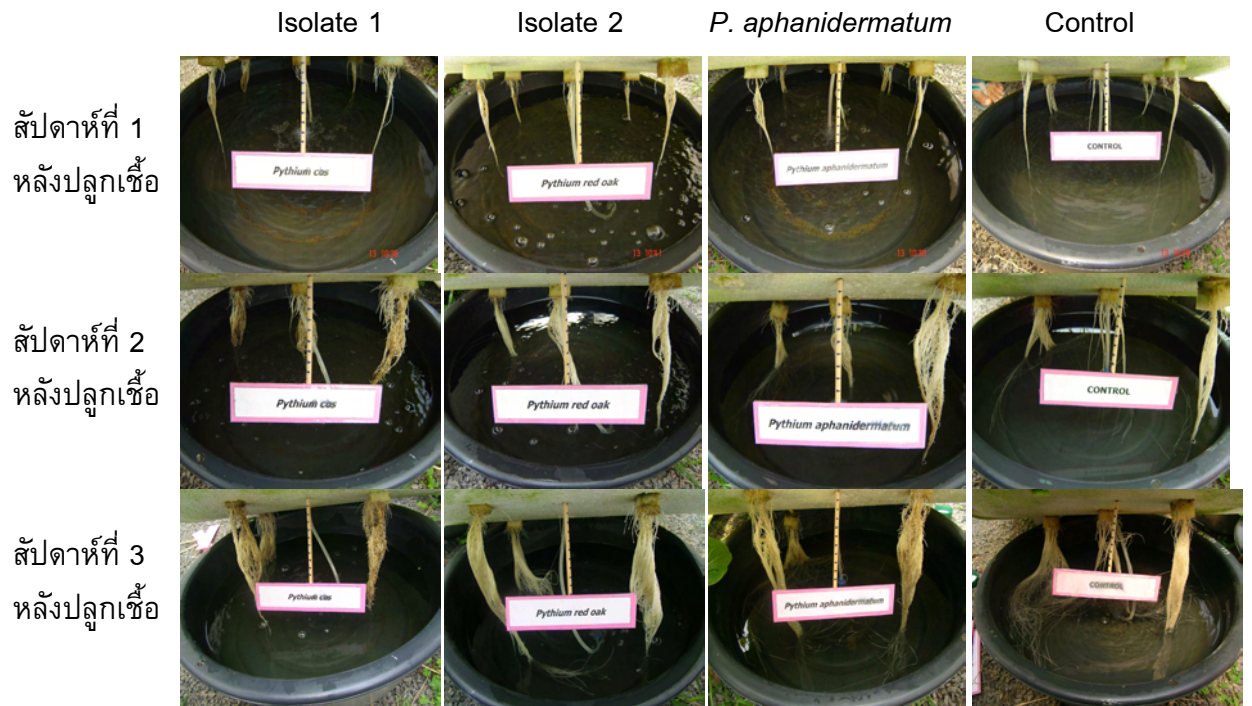
เวลา	Isolate 1	Isolate 2	<i>P.</i> <i>aphanidermatum</i>	Healthy Control
สัปดาห์ที่ 1 หลังปลูกเชื้อ	กลุ่มรากค่อนข้างดำรากเริ่มมูกุด ปลายรากมีสีน้ำตาลดำประมาณ 20%	ปลายรากมีจุดสีน้ำตาลดำ	ปลายรากฝอยมีจุดสีน้ำตาลดำขนาดประมาณ 1 ม.ม.	รากมีสีขาว
สัปดาห์ที่ 2 หลังปลูกเชื้อ	รากกุดและกลุ่มรากมีสีน้ำตาลประมาณ 50 %	รากขาวแต่ก็มีปลายรากฝอยเป็นสีน้ำตาลบ้างแต่น้อยมาก	รากเป็นสีน้ำตาลบริเวณปลายรากแสดงอาการประมาณ 10 %	รากยาวขึ้นและมีสีขาว
สัปดาห์ที่ 3 หลังปลูกเชื้อ	รากกุดมากและโทรมเป็นสีน้ำตาลเน่าทั้งหมด 100%	รากยาว สีขาวเกือบจะปกติ แต่ยังมีสีน้ำตาลบริเวณปลายรากเล็กน้อยประมาณ 10%	รากโทรมมากขึ้นและกุดมากขึ้นประมาณ 60%	รากยาวขึ้นและมีสีขาว

ตารางที่ 1.2 ลักษณะอาการผิดปกติของรากที่เกิดจากเชื้อ *Pythium* spp. ในผักสลัด Red oak ที่ปลูกในระบบ DFT

เวลา	Isolate 1	Isolate 2	<i>P. aphanidermatum</i>	Healthy Control
สัปดาห์ที่ 1 หลังปลูกเชื้อ	ปลายรากมีจุดสีน้ำตาลดำ	กลุ่มรากมีสีน้ำตาลดำ ปลายรากเป็นจุดสีน้ำตาลดำ	ปลายรากฝอยมีจุดสีน้ำตาลดำ	รากมีสีขาว
สัปดาห์ที่ 2 หลังปลูกเชื้อ	รากฝอยกุดและมีสีน้ำตาลประมาณ 45 %	รากขาวแต่ก็มีปลายรากฝอยเป็นสีน้ำตาลบ้างแต่น้อยมาก	ปลายรากฝอยเป็นสีน้ำตาลแต่เบาบาง เพราะรากที่งอกใหม่มีสีขาวปกติ	รากยาวขึ้นและมีสีขาว
สัปดาห์ที่ 3 หลังปลูกเชื้อ	รากกุดมาก รากเป็นสีน้ำตาลประมาณ 95 %	ปลายรากแทบจะไม่แสดงอาการ	ปลายรากฝอยกุด เป็นสีน้ำตาลและบริเวณรากช่วงบนประมาณ 45 %	รากยาวขึ้นและมีสีขาว



ภาพที่ 1.1 แสดงอาการผิดปกติของรากที่เกิดจากเชื้อ *Pythium* spp. ในผักสลัด Cos ที่ปลูกในระบบ DFT



ภาพที่ 1.2 แสดงอาการผิดปกติของรากที่เกิดจากเชื้อ *Pythium* spp. ในผักสลัด Red oak ที่ปลูกในระบบ DFT

ตารางที่ 1.3 การเจริญเติบโตของผักสลัด COS ในสารละลายธาตุอาหารพืชของระบบ DFT ที่มีการปลูกเชื้อ *Pythium* spp.

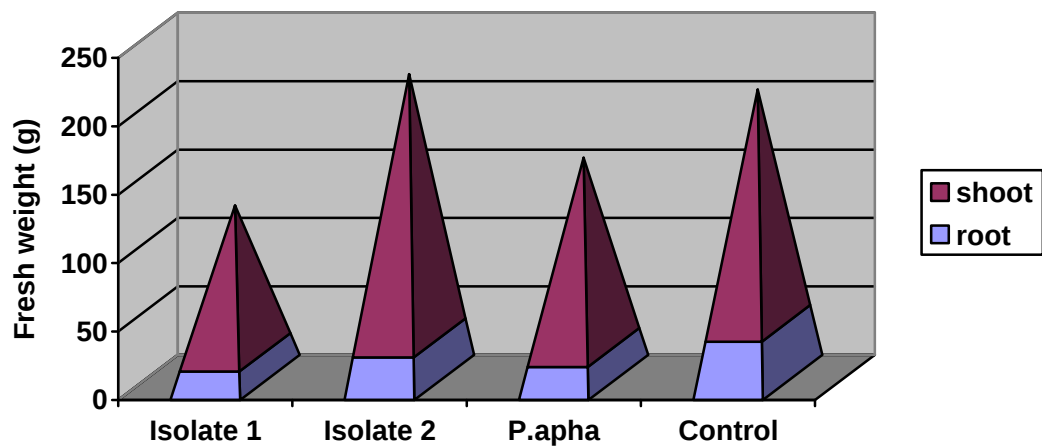
Treatment	Height (cm)				Leaf								Fresh weight (g) at harvest	
					Number				Area (w x h, cm ²)					
	Before	After inoculation			Before	After inoculation			Before	After inoculation			Stem	Root
	inoculation	1 wk	2 wk	3 wk	inoculation	1 wk	2 wk	3 wk	inoculation	1 wk	2 wk	3 wk		
Isolate1	8.44a ^{1/}	12.02b	18.13b	21.47a	4a	7.8a	13.3b	20.3a	3.06a x 5.14a	4.9c x 10.2a	7.3c x 14.6b	9.6b x 17.5a	107.30d	18.41d
Isolate2	7.92a	13.14ab	20.43ab	25.30a	4a	7.4a	13.3b	21.0a	2.9a x 4.38a	4.9c x 10.8a	8.4bc x 17.2a	10.7ab x 19.2a	192.83a	28.85b
P. aphanidermatum	8.18a	14.22a	23.5a	25.37a	4a	8.6a	14.3ab	21.0a	2.9a x 5.3a	5.6b x 11.6a	8.9b x 17.9a	10.0b x 20.6a	138.63c	21.85c
Healthy	7.42a	13.36ab	22.23a	27.57a	4a	7.6a	15.3a	22.3a	2.74a x 4.78a	6.2a x 11.8a	10.8a x 15.7a	11.7a x 20.4a	170.83b	39.48a
Control														
CV.	6.64	6.88	5.93	9.42	7.02	8.00	4.09	6.95	8.64, 10.49	5.29, 7.97	5.76, 5.09	5.21, 7.73		

^{1/}Means of 3 replications within the column followed by the same letter are not significantly different according to DMRT (P<0.01)

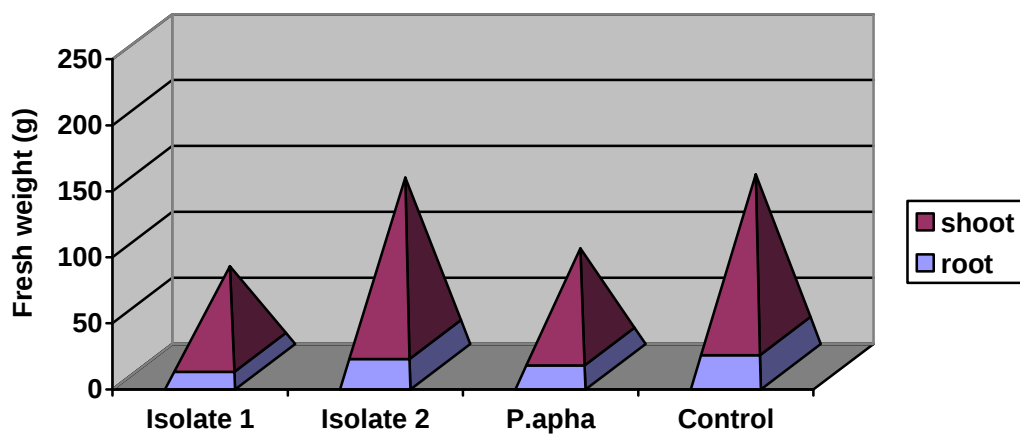
ตารางที่ 1.4 การเจริญเติบโตของผักสลัด Red oak ในสารละลายธาตุอาหารพืชของระบบ DFT ที่มีการปลูกเชื้อ *Pythium* spp.

Treatment	Height (cm)				Leaf								Fresh weight (g) at harvest	
					Number				Area (w x h, cm ²)					
	Before inoculation	After inoculation			Before inoculation	After inoculation			Before inoculation	After inoculation			Stem	Root
		1 wk	2 wk	3 wk		1 wk	2 wk	3 wk		1 wk	2 wk	3 wk		
Isolate1	5.74a	9.26a	15.03a	14.00a	3.2a	6.6a	11.0a	14.0b	2.8a x 3.4a	6.2a x 7.5a	11.5a x 12.7a	15.1a x 14.3a	65.13c	10.78c
Isolate2	5.36a	9.04a	16.57a	14.87a	3.0a	6.8a	10.3a	17.7ab	2.9a x 3.5a	6.3a x 7.6a	13.3a x 13.4a	18.7a x 16.6a	122.67a	20.45a
<i>P. aphanidermatum</i>	5.58a	10.34a	14.97a	14.27a	3.6a	7.2a	12.7a	16.0ab	3.0a x 3.6a	6.6a x 8.2a	14.3a x 14.2a	18.8a x 13.7a	74.23b	15.25b
Healthy Control	5.36a	9.50a	14.57a	15.50a	3.6a	7.0a	12.3a	19.0a	3.0a x 3.7a	6.7a x 7.7a	13.6a x 13.9a	19.1a x 14.4a	122.53a	23.18a
CV.	12.17	8.36	7.27	8.47	13.35	11.9	12.2	9.64	11.34, 14.06	11.01, 9.04	15.43, 9.78	12.45, 12.69		

^{1/} Means of 3 replications within the column followed by the same letter are not significantly different according to DMRT (P<0.01)



ภาพที่ 1.3 แสดงอิทธิพลของเชื้อ *Pythium* spp. ต่อการเจริญเติบโต (น้ำหนักสดของต้นและราก) ของผักสลัด Cos ที่ปลูกในระบบ DFT ในวันเก็บเกี่ยว



ภาพที่ 1.4 แสดงอิทธิพลของเชื้อ *Pythium* spp. ต่อการเจริญเติบโต (น้ำหนักสดของต้นและราก) ของผักสลัด Red oak ที่ปลูกในระบบ DFT ในวันเก็บเกี่ยว

ตารางที่ 1.5 แสดงการเข้าครอบครองรากของเชื้อ *Pythium* spp ในผักสลัด Cos และ Red oak หลังจากทำการปลูกเชื้อไปเป็นเวลา 1 และ 4 สัปดาห์

Treatment	เปอร์เซ็นต์การเข้าครอบครองราก			
	Cos		Red oak	
	1 สัปดาห์	4 สัปดาห์	1 สัปดาห์	4 สัปดาห์
Isolate 1	0	96.67	3.38	91.67
Isolate 2	0	96.67	6.25	41.67
<i>P. aphanidermatum</i>	6.25	75	0	75
<i>Healthy Control</i>	0	91.67	0	58.3

สรุปผลการทดลอง

1. ในผักสลัด Cos พบว่า เชื้อ Isolate 1 (ที่แยกมาจากผักสลัด Cos) มีผลทำให้รากผักสลัด Cos เป็นโรครุนแรงสูงที่สุด
2. ในผักสลัด Red oak พบว่า เชื้อ Isolate 1 (ที่แยกมาจากผักสลัด Cos) มีผลทำให้รากผักสลัด Red oak เป็นโรครุนแรงสูงที่สุดเช่นกัน
3. อาการโรคบนรากของผักสลัด Cos รุนแรงมากกว่า ในผักสลัด Red oak
4. เปอร์เซ็นต์การเข้าครอบครองรากของเชื้อ *Pythium* isolate 1 ที่มีต่อผักสลัด Cos และ Red oak สูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ *Pythium* isolate อื่นๆ ที่ทำการทดสอบ
5. ดังนั้นจึงเลือก เชื้อ Isolate 1 และผักสลัด Cos มาทำการทดลองต่อไป
6. จากการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค (Pathogenicity) สามารถสรุปประเมินระดับความรุนแรงของโรคได้ดังนี้
 - 0 = รากมีสีขาวปกติ (0%)
 - 1 = รากพืชถูกทำลายบางส่วน เป็นสีน้ำตาลเล็กน้อยบริเวณปลายราก (25%)
 - 2 = ประมาณครึ่งหนึ่งของรากถูกทำลาย รากกุดและเน่าเป็นสีน้ำตาล (50%)
 - 3 = รากพืชส่วนใหญ่ถูกทำลาย กุดและเน่าเป็นสีน้ำตาลเกือบหมด (75%)
 - 4 = รากพืชทั้งหมดถูกทำลาย รากกุดสั้นและเน่าเป็นสีน้ำตาลเกือบหมด (100%)

1.2 การประเมินประสิทธิภาพชีวผลิตภัณฑ์รา (biocontrol products) ที่มีจำหน่ายในท้องตลาด ในการควบคุมโรครากเน่าของผักสลัดในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน

ทำการทดสอบชีวผลิตภัณฑ์รา *Trichoderma harzianum* ที่มีจำหน่ายในท้องตลาดทั้ง 4 ผลิตภัณฑ์ คือ ชีวผลิตภัณฑ์ 1 (หัวเชื้อสด) T1, ชีวผลิตภัณฑ์ 2 (ผงละลายน้ำ) T2, ชีวผลิตภัณฑ์ 3 (ผงละลายน้ำ) T3, ชีวผลิตภัณฑ์ 4 (สปอร์น้ำแขวนลอย) T4 ในการควบคุมโรครากเน่าโคนเน่าที่เกิดจาก *Pythium* spp. บนผักสลัด Cos (*Lactuca sativa* L.) ในระบบ NFT

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design ประกอบด้วย 6 กรรมวิธี 2 ซ้ำๆ ละ 9 ต้น รายละเอียดกรรมวิธีมีดังนี้

กรรมวิธี 1 (C1)	ไม่ใส่ชีวผลิตภัณฑ์, ไม่ปลูกเชื้อ pathogen
กรรมวิธี 2 (C2)	ไม่ใส่ชีวผลิตภัณฑ์, ปลูกเชื้อ pathogen
กรรมวิธี 3 (T1)	ชีวผลิตภัณฑ์ 1 (หัวเชื้อสด), ปลูกเชื้อ pathogen
กรรมวิธี 4 (T2)	ชีวผลิตภัณฑ์ 2 (ผงละลายน้ำ), ปลูกเชื้อ pathogen
กรรมวิธี 5 (T3)	ชีวผลิตภัณฑ์ 3 (ผงละลายน้ำ), ปลูกเชื้อ pathogen
กรรมวิธี 6 (T4)	ชีวผลิตภัณฑ์ 4 (สปอร์น้ำแขวนลอย), ปลูกเชื้อ pathogen

อุปกรณ์และวิธีการ

1) การปลูกพืช

1.1) การเตรียมระบบ NFT

ใส่น้ำลงในถังน้ำให้ได้ปริมาตร 11.6 ลิตร แล้วผสมสารละลายธาตุอาหารสำหรับผักกินใบ (Benoit, 1992) ปรับค่า EC = 1.55 mS/cm และ ค่า pH ในช่วง 5.8-6.2

1.2) การเพาะเมล็ด

เพาะเมล็ดผักสลัด Cos ลงในฟองน้ำ 120 เมล็ด รดด้วยน้ำเป็นเวลา 4 วัน จากนั้นรดด้วยสารละลายปุ๋ยที่มีค่า EC = 0.7 mS/cm และ ค่า pH 5.8 เป็นเวลา 3 วัน ก่อนที่จะย้ายลงระบบอนุบาลที่มีค่า EC = 0.7 mS/cm และ ค่า pH 5.8-6.2 อีกเป็นเวลา 1 สัปดาห์

1.3) การย้ายพืชลงระบบ NFT

ย้ายกล้าลงระบบ NFT ที่มีสารละลายที่มีค่า EC = 1.55 mS/cm และ ค่า pH 5.8-6.2 ทำการดูแล ตรวจสอบเช็คสารละลายและปรับสารละลายใหม่เพื่อรักษาสภาพค่า EC และ pH ให้อยู่ในช่วงดังกล่าวทุกวันในช่วงเช้า

2) การปลูกเชื้อ BCA ลงในระบบ กระทำเมื่อ 1 วันหลังจากย้ายพืชลงระบบ NFT

T1 ความเข้มข้น 3.5×10^6 sporangium/ml ปริมาณ 200 มิลลิลิตร

T2 ปริมาณ 30 กรัม

T3 ปริมาณ 30 กรัม

T4 ปริมาณ 3.6 มิลลิลิตร

3) การปลูกเชื้อ pathogen ลงในระบบ

นำเชื้อ *Pythium* spp. เลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นเจาะชั้นวุ้นเชื้อด้วย cork borer เบอร์ 2 และใส่ลงในอาหาร V8 broth และนำไปวางบนเครื่องเขย่าวันละ 8 ชั่วโมงเป็นเวลา 5 วัน จากนั้นเตรียม spore suspension ให้ได้ 5×10^6 sporangium/ml และใส่ลงในระบบปลูกพืชในกรรมวิธีที่ 2-6 หลังจากใส่ BCA แล้ว 2 วัน

4) การตรวจสอบเชื้อ BCA และเชื้อสาเหตุในระบบในระหว่างการทดลอง

เพื่อยืนยันอีกครั้งหนึ่งว่าเชื้อสาเหตุในแต่ละทรีทเมนต์ยังมีปริมาณเท่าเดิมอยู่หรือไม่ ดังนั้นในระหว่างการทดลองจึงมีการนำสารละลายในแต่ละกรรมวิธีมาแยกเชื้อ BCA และเชื้อสาเหตุอีกครั้งหนึ่งในทุกสัปดาห์ โดยใช้อาหาร Martin's medium และ selective media เพื่อตรวจนับเชื้อ BCA และเชื้อสาเหตุ ตามลำดับ

5) การตรวจสอบการคงประสิทธิภาพของเชื้อ BCA

โดยการทำ Bi-culture test บนอาหาร PDA ในครั้งแรกที่ใส่ BCA และในวันเก็บผลผลิต

การบันทึกข้อมูล

1) ข้อมูลด้านโรค

- 1.1) บันทึกอาการโรคทุกสัปดาห์หลังจากปลูกเชื้อ
- 1.2) บันทึกปริมาณเชื้อ BCA และ pathogen ในระบบ
- 1.3) บันทึกผลของ Bi-culture test

2) ข้อมูลทางด้านพืช

- 2.1) การเจริญเติบโต (จำนวนใบ ความกว้าง ความยาวของใบ ความสูงของต้น) (วัดทุกสัปดาห์)
- 2.2) ผลผลิต (เก็บผักสลัดเมื่ออายุ 5 สัปดาห์) โดยใช้น้ำหนักสดของต้นและราก

3) ข้อมูลทางสภาพแวดล้อม

- 3.1) คุณสมบัติของสารละลาย (EC, pH, อุณหภูมิ) ทำการตรวจวัดทุกวัน
- 3.2) ความเข้มแสง อุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์ในโรงเรือน

4) วิเคราะห์ผลทางสถิติ โดยวิธี Analysis of variance (ANOVA) โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test

ผลการทดลองและวิจารณ์

ไม่พบอาการผิดปกติที่รากของพืชในกรรมวิธี (C1) ที่ไม่มีการปลูกเชื้อ pathogen และ ไม่ได้ใส่ BCA สำหรับการใส่ BCA ในทุกกรรมวิธีพบว่า ไม่สามารถควบคุมอาการโรคที่รากได้เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่มีการปลูกเชื้อ pathogen (C2) ดังตารางที่ 1.6 แต่อย่างไรก็ตามความอยู่

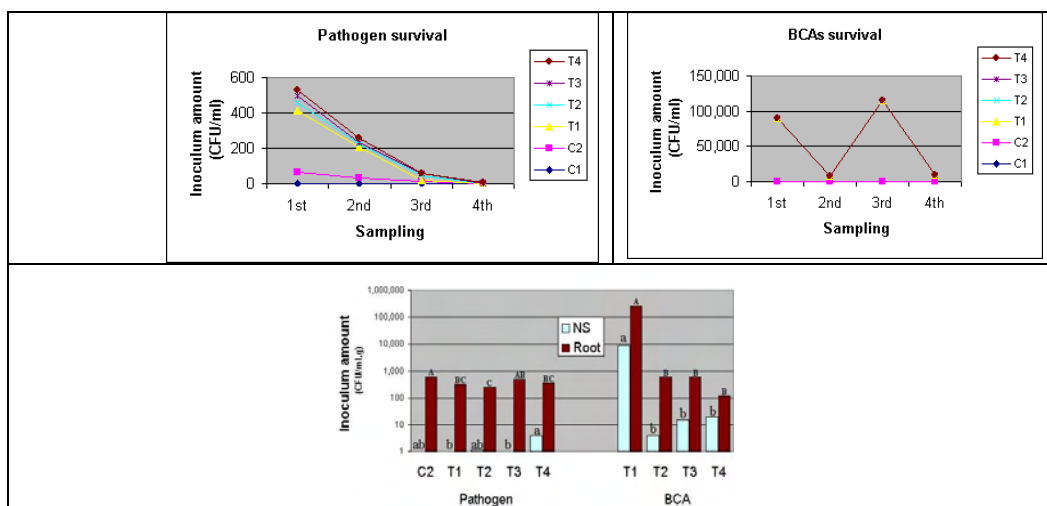
รอดของเชื้อ pathogen ในระบบมีปริมาณลดลงอย่างรวดเร็วในสัปดาห์ที่ 1 และ 2 และยังคงลดลงไปเรื่อยๆ จนถึงระยะเก็บเกี่ยว ซึ่งแตกต่างจากความอยู่รอดของเชื้อ BCA ในระบบที่มีปริมาณทั้งลดลงและเพิ่มขึ้นไม่สม่ำเสมอตลอดระยะเวลาการปลูก (ภาพที่ 1.5) และเป็นที่น่าสังเกตว่าในช่วง 1-3 วันหลังจากใส่เชื้อ BCA ลงไปในระบบ พบว่าชีวผลิตภัณฑ์ T2, T3 และ T4 แทบจะไม่สามารถตรวจพบความอยู่รอดได้เลยในสารละลายธาตุอาหารพืช ผลดังกล่าวนี้สอดคล้องกับรายงานของ Thinggaard (1989) ที่กล่าวว่า จำนวนประชากรของ *Trichoderma harzianum* จะลดลงเรื่อยๆ หลังจากใส่ลงไปในระบบเพื่อควบคุมโรค black rot ของแตงกวา ซึ่งเกิดจากเชื้อ *Phomopsis sclerotioides* ในทางกลับกัน เมื่อสิ้นสุดการทดลองสามารถตรวจพบปริมาณความอยู่รอดของเชื้อ BCA ที่รากสูงกว่าในสารละลายธาตุอาหารพืชอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 1.5) แม้ว่าจะมีการใส่เชื้อ BCA ลงในถังสารละลายธาตุอาหารพืช ก็ยังสามารถตรวจพบปริมาณของเชื้อ BCA ที่รากได้ ดังนั้นพอจะสรุปได้ว่าระบบ NFT เป็นระบบที่เหมาะสมให้เชื้อ BCA เข้าครอบครองรากพืชได้ แต่ปริมาณที่เข้าครอบครองรากจะมากเพียงพอที่จะควบคุมโรคได้หรือไม่ ซึ่งควรคำนึงถึงในประเด็นนี้ เช่นเดียวกับรายงานของ Koochakan and Nantagij (2005) ที่กล่าวว่า ชีวผลิตภัณฑ์ที่ทดสอบทั้งหมดรวมทั้งชีวผลิตภัณฑ์ *Trichoderma harzianum* ไม่สามารถลดความรุนแรงของโรครากเน่าที่เกิดจากเชื้อ *Pythium* spp. ของผักสลัดที่ปลูกในระบบ DFT ยิ่งไปกว่านั้นถ้าใช้ชีวผลิตภัณฑ์ในปริมาณมากเกินไปจะทำความเสียหายให้แก่รากพืชได้

ในด้านการเจริญเติบโตของผักสลัด อิทธิพลของชีวผลิตภัณฑ์ที่ทดสอบให้ผลไปในทิศทางเดียวกับด้านควบคุมโรค กล่าวคือ ชีวผลิตภัณฑ์ทุกชนิดไม่ส่งผลสนับสนุนการเจริญเติบโตของผักสลัดทั้งในด้านความสูงของลำต้น ขนาดและจำนวนใบ รวมทั้งผลผลิตเมื่อเปรียบเทียบกับ Inoculated control (ตารางที่ 1.7 ภาพที่ 1.6) ผลการทดลองนี้ขัดแย้งกับงานวิจัยที่ได้ทดสอบกับพืชผักชนิดอื่นๆ ในระบบ DFT (Pariyaporn and Jaenaksorn, 2007; Rachniyom and Jaenaksorn, 2007)

ตารางที่ 1.6 ประสิทธิภาพของชีวผลิตภัณฑ์ต่อความรุนแรงของโรครากเน่าของผักสลัด Cos ที่ปลูกในระบบ NFT

Treatment	Disease severity ^{1/}		
	1 st Week	2 nd Week	3 rd Week
Non-inoculated control C1	0	0	0
Inoculated control C2	1	1.5	2.5
T1	1	1.72	2.72
T2	1	1.4	2.3
T3	1	1.1	2.6
T4	1	1.0	2.4

^{1/} Based on pathogenicity test, disease severity was assessed from incidence of brown root tips and percent total roots with brown discoloration using increment scale of 0-5.



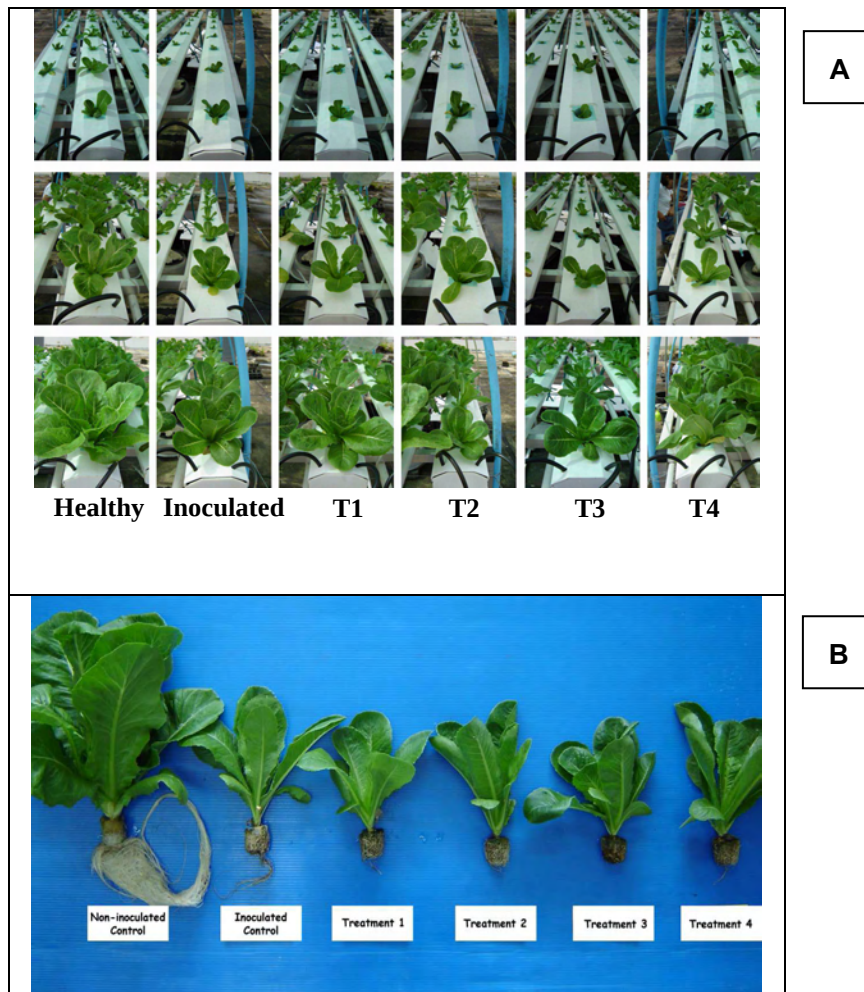
^{1/}Bars in each group labeled by the same letter are not significantly different according to DMRT ($P < 0.01$).

ภาพที่ 1.5 ความอยู่รอดของเชื้อสาเหตุโรคและ BCAs ในสารละลายธาตุอาหารพืชในระหว่างการปลูกผักสลัด Cos ในระบบ NFT รวมทั้งปริมาณเชื้อดังกล่าวที่อยู่รอดที่รากพืชในวันเก็บเกี่ยว

ตารางที่ 1.7 การเจริญเติบโตและผลผลิตในวันเก็บเกี่ยวของผักสลัด Cos ที่ปลูกในระบบ NFT ที่มีการใช้ชีวผลิตภัณฑ์เพื่อควบคุมโรครากเน่า

Treatment	Growth				Yield (g)		
	Shoot height (cm)	Leaf no..	Leaf size (cm)		Root length (cm)	Shoot fresh wt.	Root fresh wt.
			Width	Length			
Non-inoculated control	19.04 ^{1/} a	18a	10.15a	14.30a	48.45a	118.62a	20.48a
Inoculated control	12.11b	12b	6.41bc	8.90b	10.31b	19.30bc	8.11b
T1	11.95b	13b	4.92de	6.44cd	8.77b	14.12bc	6.20b
T2	12.26b	13b	5.47cd	7.31c	5.79b	17.46bc	7.78b
T3	9.60c	13b	4.22de	5.27d	4.20b	8.56c	5.51b
T4	13.16b	14b	6.55b	9.76b	6.80b	23.02b	7.60b
CV	4.9%	5.7%	4.1%	4.8%	18.7%	10.1%	15.6%

^{1/}Means within the column followed by the same letter are not significantly different according to DMRT ($P < 0.01$)



ภาพที่ 1.6 การเจริญเติบโตในช่วงสัปดาห์ที่ 1, 2 และ เมื่อเก็บเกี่ยวของผักสลัด Cos ที่ปลูกในระบบ NFT ที่มีการใช้ชีวผลิตภัณฑ์เพื่อควบคุมโรครากเน่า (A); C2, T1, T2, T3 และ T4 แสดงอาการผิดปกติที่รากและเน่า (B)

สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองครั้งนี้ พบว่าชีวผลิตภัณฑ์ราที่จำหน่ายในท้องตลาดทั้ง 4 ชนิด ไม่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรครากเน่าของผักสลัดที่เกิดจากเชื้อ *Pythium* spp. อีกทั้งไม่ส่งผลดีต่อการเจริญเติบโตของพืชดังกล่าว ซึ่งขัดแย้งกับงานวิจัยที่ผ่านมาที่ทดสอบกับพืชผักชนิดอื่นและปลูกในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินที่ต่างกัน ทั้งนี้อาจมีสาเหตุจาก 1) ความเฉพาะเจาะจงระหว่างเชื้อ BCA กับ พืช 2) ระบบ NFT ไม่สามารถรักษาระดับของ BCA ให้คงที่และสูงเพียงพอที่จะควบคุมโรคเมื่อเทียบกับระบบ DFT 3) รูปแบบของชีวผลิตภัณฑ์ดังกล่าวไม่เอื้อหรือเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในระบบ NFT โดยเฉพาะชีวผลิตภัณฑ์รูปแบบผง (WP) จะไปเกาะติดที่ผิวรากพืช ทำให้ขัดขวางการดูดซึมธาตุอาหารของรากพืช 4) คุณภาพของชีวผลิตภัณฑ์ ก็น่าจะมีผลต่อการทดสอบประสิทธิภาพในครั้งนี้ เพราะผลจากการตรวจสอบ (monitoring) ความอยู่รอด (survival) ของเชื้อจากชีวผลิตภัณฑ์เริ่มแรกเมื่อใส่ลงในระบบปลูก พบว่าความมีชีวิตอยู่รอดของเชื้อแทบจะไม่มีอยู่เลย

หรือค่อนข้างต่ำมากเมื่อเทียบกับข้อมูลที่ระบุไว้บนฉลากของชีวผลิตภัณฑ์นั้นๆ แต่อย่างไรก็ตาม ในระหว่างการปลูกพืชกลับตรวจพบปริมาณความมีชีวิตอยู่รอดของเชื้อในระบบ (ในสารละลายธาตุอาหารพืช) สูงขึ้น อีกทั้งยังตรวจพบว่าเชื้อดังกล่าวสามารถเจริญเข้าครอบครองรากพืชได้ด้วยแม้ว่าไม่ได้มีการใส่ชีวผลิตภัณฑ์ที่รากโดยตรง เพียงแต่ใส่ชีวผลิตภัณฑ์ลงในสารละลายธาตุอาหารพืชเท่านั้น (Koohakan and Nantagij, 2005)

1.3 การประเมินประสิทธิภาพสายพันธุ์แบคทีเรียเขตรากพืชที่ได้รับการเผยแพร่แล้วในการควบคุมโรครากเน่าของผักสลัดในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน

1.3.1 การประเมินประสิทธิภาพสายพันธุ์แบคทีเรียเขตรากพืชที่ได้รับการเผยแพร่แล้วในการควบคุมโรครากเน่าของผักสลัด Cos ที่ปลูกใน NFT

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อจะนำแบคทีเรียเขตรากพืชสายพันธุ์ที่ได้รับการเผยแพร่และรายงานว่ามีคุณสมบัติเป็นเชื้อปฏิปักษ์ต่อเชื้อสาเหตุโรคในดินหลายชนิด (Buensanteai *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2000; Pan *et al.*, 1991; Prathuangwong, 2007) มาใช้ควบคุมโรคของพืชในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน ดังนั้น จึงมีการประเมินประสิทธิภาพของแบคทีเรียเขตรากพืชดังกล่าวในการควบคุมโรค Pythium root rot ของผักสลัด Cos ในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน (NFT กลางแจ้ง)

เชื้อแบคทีเรียเขตรากพืชที่นำมาศึกษาได้แก่ *Bacillus amyloliquefaciens* (KPS46), *Paenibacillus pabuli* (SW01/4), *Pseudomonas fluorescens* (SP007s), *B. lichiniiformis* (SP009s) (Prathuangwong, 2007) และ ชีวผลิตภัณฑ์แบคทีเรีย 1 ชนิด โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomize Design จำนวน 3 ซ้ำๆ ละ 9 ต้น มีการตรวจและปรับค่า pH และ EC ของสารละลายธาตุอาหารพืชทุกวัน การใส่เชื้อแบคทีเรียเขตรากพืชดังกล่าวจะกระทำโดยใส่ลงในสารละลายธาตุอาหารพืชในปริมาณ OD 0.1 120 มิลลิลิตร ก่อน 2 วัน ที่จะทำให้การปลูกเชื้อสาเหตุโรคด้วย 5×10^5 sporangium/ml ของเชื้อ *Pythium* spp. จะทำการประเมินผลโดยบันทึกความรุนแรงของโรค (Disease severity) การเจริญเติบโตของพืชทุกอาทิตย์ และมีการตรวจสอบความอยู่รอดในระบบของเชื้อ BCA และเชื้อสาเหตุโรค รวมทั้งประเมินการคงความสามารถเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อ BCA ดังกล่าวในวันเก็บเกี่ยว โดยวิธี Bi-culture test ในสภาพห้องปฏิบัติการ

ผลการทดลองและวิจารณ์

ในการทดลองพบว่า ในวิธีการที่มีการปลูกเชื้อสาเหตุโรค พืชได้แสดงอาการผิดปกติที่ระบบรากเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการที่ไม่ได้ใส่เชื้อสาเหตุโรค โดยอาการเน่าดังกล่าวจะพบเนื้อเยื่อบางส่วนของรากและหลุดออกจากดิน สำหรับการประเมินประสิทธิภาพของแบคทีเรียเขตรากพืชที่ได้มีการเผยแพร่แล้วและชีวผลิตภัณฑ์แบคทีเรีย ผลที่ได้รับไม่เป็นไปตามที่คาดหวัง กล่าวคือแบคทีเรียเขตรากพืชทุกตัวที่ทำการทดสอบไม่สามารถลดความรุนแรงของโรคได้เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการที่มีการปลูกเชื้อสาเหตุโรค (Inoculated control) (ตารางที่ 1.8)

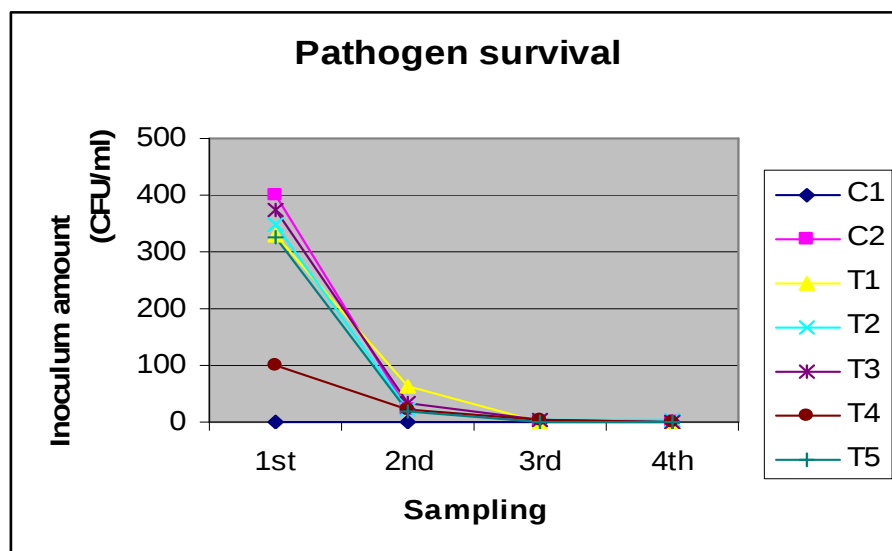
สำหรับความอยู่รอดของเชื้อสาเหตุโรคในระบบของทุกวิธีการลดลงอย่างรวดเร็วในสัปดาห์ที่ 1 และ 2 จากนั้น จะลดลงเรื่อยๆ จนถึงระยะเก็บเกี่ยว และเป็นที่น่าสังเกตว่าความอยู่รอดของแบคทีเรียเขตรากพืช (BCA) ที่ใส่ลงไปในระบบมีปริมาณน้อยมากจนถึงไม่สามารถตรวจพบได้ (ภาพที่ 1.7) แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวจากระบบมาประเมินการคงความเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อสาเหตุโรคในสภาพห้องปฏิบัติการโดยวิธี Bi-culture test พบว่าเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวยังคงมีความสามารถเป็นเชื้อปฏิปักษ์อยู่ (ภาพที่ 1.8)

ในด้านการเจริญเติบโตของพืช แม้ว่าเชื้อแบคทีเรียเขตรากพืชที่นำมาทดสอบนั้นเคยได้รับการรายงานว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช แต่ผลที่ได้กลับไม่สอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมา (Buensanteai *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2000; Pan *et al.*, 1991; Prathuangwong, 2007) กล่าวคือ เชื้อแบคทีเรียเขตรากพืชดังกล่าวไม่มีผลส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชแต่อย่างใด เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการที่มีการปลูกเชื้อสาเหตุโรค (Inoculated control) (ตารางที่ 1.9 ภาพที่ 1.9) ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นผลมาจากความอยู่รอดในระบบปลูกพืชนี้พบค่อนข้างต่ำมาก ไม่เพียงพอต่อการควบคุม แต่อย่างไรก็ตามข้อที่น่าสังเกตที่ข้อหนึ่ง คือ ถึงแม้ว่าเชื้อแบคทีเรียเขตรากพืชดังกล่าวจะอยู่รอดได้ไม่ดีในระบบแต่ยังคงความสามารถเป็นเชื้อปฏิปักษ์ต่อเชื้อ *Pythium* spp. ได้เป็นอย่างดี ดังนั้น ถ้าหากมีการปรับปรุงเชื้อแบคทีเรียเขตรากพืชดังกล่าวข้างต้นสามารถอยู่รอดในระบบได้ดีก็จะทำให้มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคดังกล่าวได้

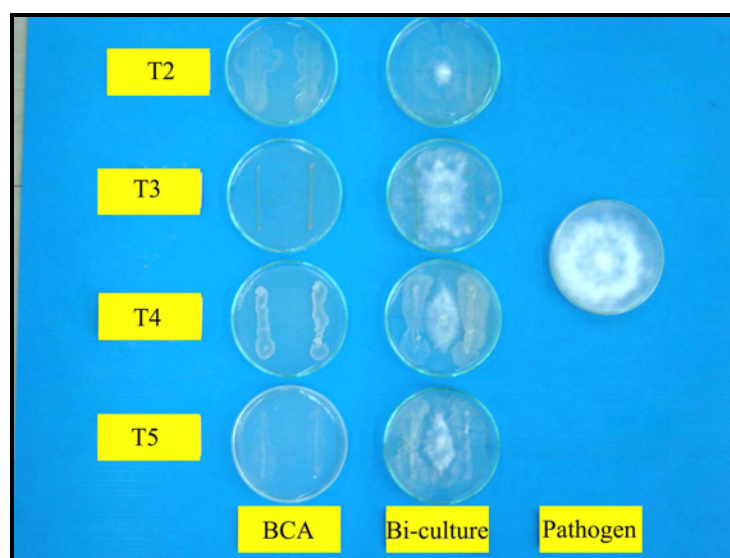
ตารางที่ 1.8 ความรุนแรงของโรครากเน่าของผักสลัด Cos ใน NFT ที่มีการใส่เชื้อแบคทีเรียเขตรากพืชที่ได้รับการเผยแพร่แล้ว 4 สายพันธุ์ และ ชีวผลิตภัณฑ์ 1 ชนิด

Treatment	Disease severity ^{1/}		
	1 st week	2 nd week	3 rd week
Non-inoculated control	0	0	0
Inoculated control	1.05	3.50	2.56
T1	0.94	2.72	3.17
T2	0.80	2.89	3.00
T3	1.06	2.89	3.39
T4	1.11	2.83	2.67
T5	1.22	3.22	3.22

^{1/} Based on pathogenicity test, disease severity was assessed from incidence of brown root tips and percent total roots with brown discoloration using increment scale of 0-5.



ภาพที่ 1.7 ความอยู่รอดของ *Pythium* spp. ในสารละลายธาตุอาหารพืชระหว่างการปลูกพืชใน NFT

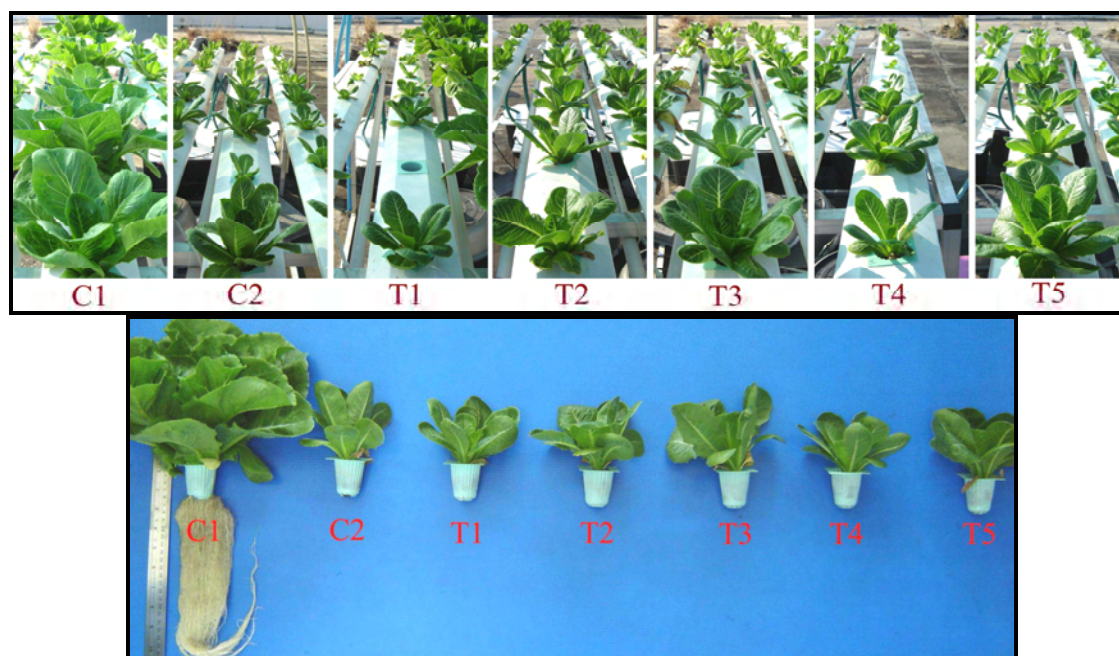


ภาพที่ 1.8 การตรวจสอบกลับของความเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อ pathogen ของ BCA หลังจากใส่ลงในระบบปลูกพืช โดยวิธี Bi-culture

ตารางที่ 1.9 การเจริญเติบโตและผลผลิตของผักสลัด Cos ใน NFT ที่มีการใส่เชื้อแบคทีเรียเขตรากพืชที่ได้รับการเผยแพร่แล้ว 4 สายพันธุ์ และ ชีวผลิตภัณฑ์ 1 ชนิด เพื่อควบคุมโรค Pythium root rot

Treatment	Growth (At 35 days)					Yield (g)	
	Shoot height (cm)	Leaf no.	Leaf size (cm)		Root length (cm)	Shoot fresh wt.	Root fresh wt.
			Width	Length			
Non-inoculated control	15.81 ^{1/a}	19.3a	8.48a	11.45a	42.50a	93.82a	23.45a
Inoculated control	10.69bc	11.9b	4.91b	7.17b	6.43b	10.03b	5.06b
T1	9.54bc	11.7b	4.50b	5.83bc	4.68b	7.51b	4.61b
T2	10.61bc	12.1b	4.87b	6.40bc	4.90b	10.17b	5.04b
T3	9.93bc	11.8b	4.79b	6.08bc	4.82b	9.50b	4.05b
T4	9.08c	10.3b	3.89b	5.24c	5.79b	6.43b	2.51b
T5	10.90b	12.0b	4.97b	6.32bc	5.90b	11.51b	4.93b
CV	16.72%	25.37%	24.37%	21.30%	55.92%	130.92%	81.70%

^{1/}Means within the column followed by the same letter are not significantly different according to DMRT (P<0.01)



ภาพที่ 1.9 การเจริญเติบโตในวันเก็บเกี่ยวของผักสลัด Cos ที่ปลูกใน NFT ที่มีการใส่เชื้อแบคทีเรียเขตรากพืชที่ได้รับการเผยแพร่แล้ว 4 สายพันธุ์ และ ชีวผลิตภัณฑ์ 1 ชนิด เพื่อควบคุมโรค Pythium root rot

1.3.2 การประเมินประสิทธิภาพสายพันธุ์แบคทีเรียเขตรากพืชที่ได้รับการเผยแพร่แล้วในการควบคุมโรครากเน่าของผักสลัด **Green oak** ที่ปลูกใน DRFT

1) ทดสอบความสามารถในการส่งเสริมการงอกและการเจริญเติบโตของกล้า **Green oak**

นำแบคทีเรียเขตรากพืช 4 สายพันธุ์ที่ได้รับการเผยแพร่แล้ว (KPS46, SW01/4, SP007s, SP009s) มาทดสอบความสามารถในการส่งเสริมการงอกและการเจริญเติบโตของกล้า โดยใช้เมล็ดผักสลัดมาฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย Clorox 10% 5 นาที จากนั้นแช่ด้วยน้ำกลั่นมาเชื้อเป็นเวลา 3 นาที 2 ครั้ง จากนั้นแช่ลงใน bacterial suspension ความเข้มข้น 10^6 CFU/ml เป็นเวลา 10 นาที ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง นำเมล็ดที่ผ่านการแช่แล้วไปทดสอบความงอกโดยวิธี Blotter method บันทึกผลอัตราการงอก ความยาวราก ความสูงของกล้า และนำมาเปรียบเทียบกับเมล็ดที่ไม่ได้แช่ bacterial suspension

ผลการทดลอง

จากการศึกษาพบว่า การคลุกเมล็ดด้วยแบคทีเรียเขตรากพืชทั้ง 4 สายพันธุ์ สามารถส่งเสริมการงอกของเมล็ด ความสูงของต้นกล้าและความยาวของรากในสภาพห้องปฏิบัติการเมื่อเปรียบเทียบกับ control โดยแบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescens* (SP007s) ให้ผลดีที่สุด ดังตารางที่ 1.10

ตารางที่ 1.10 ประสิทธิภาพการคลุกเมล็ดด้วยแบคทีเรียเขตรากพืช 4 สายพันธุ์ (PGPR) ต่อการงอกและการเจริญของกล้าผักสลัด green oak ในสภาพห้องปฏิบัติการ

Treatment	Laboratory condition		
	Seed germination (%)	Shoot length (cm)	Root length (cm)
T1 (KPS46)	98b	4.43b	4.10b
T2 (SW01/4)	100a	4.43b	4.95a
T3 (SP007s)	100a	5.47a	5.26a
T4 (SP009s)	98b	4.87b	4.98a
Control ^{2/}	92c	3.48c	3.86c

^{1/} Means of 10 replications. Means in a column followed by the same letter are not significantly different according to DMRT.

^{2/} Without seed bacterization.

2) ทดสอบความสามารถในการต่อต้านเชื้อ *Pythium* spp. ในสภาพห้องปฏิบัติการ

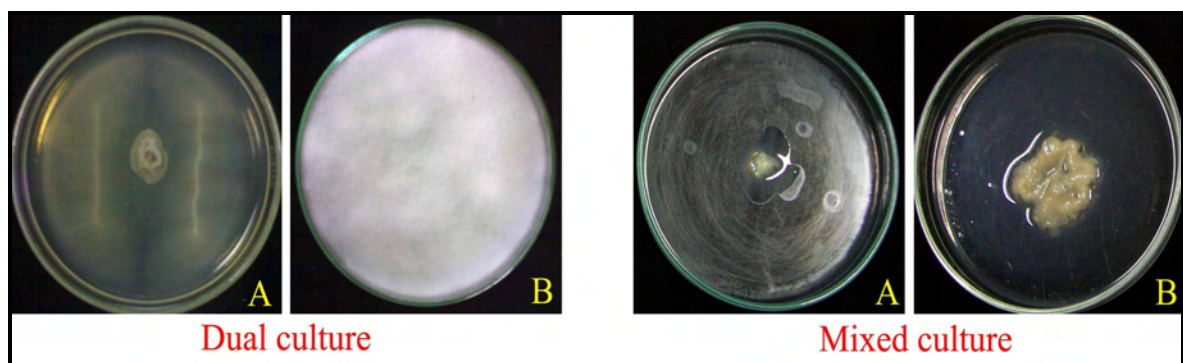
นำแบคทีเรียเขตรากพืชทั้ง 4 สายพันธุ์มาทดสอบความสามารถในการต่อต้านเชื้อ *Pythium* spp. โดยวิธี dual culture และ mixed culture

ผลการทดลอง

จากการทดลองพบว่า แบคทีเรียเขตรากพืช *Pseudomonas fluorescens* (SP007s) ให้ผลดีที่สุด (75 เปอร์เซ็นต์) ในการยับยั้งการเจริญเติบโตทางเส้นใยของเชื้อ *Pythium* spp. ทั้งใน dual culture และ mixed culture (ตารางที่ 1.11 ภาพที่ 1.10)

ตารางที่ 1.11 การทดสอบความเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อแบคทีเรียเขตรากพืชต่อการเจริญทางเส้นใยของ *Pythium* spp.

Treatment	Growth inhibition of <i>Pythium</i> spp. (%)
T1 (KPS46)	55.56c
T2 (SW01/4)	66.67b
T3 (SP007s)	75.00a
T4 (SP009s)	62.00b
Control	0c



ภาพที่ 1.10 ผลของ *Pseudomonas fluorescens* (SP007s) ต่อการเจริญเติบโตทางเส้นใยของ *Pythium* spp. ใน Dual culture (A), Control (B) และ Mixed culture (A), Control (B)

3) ทดสอบความมีชีวิต (Viability) ในสารละลายธาตุอาหารพืช

นำแบคทีเรียเขตรากพืชสายพันธุ์ที่ให้ผลดีจากข้อ 1) และ 2) มาทดสอบความอยู่รอด (โดยใช้ความเข้มข้น 10^6 และ 10^9 CFU/ml) ใน flask ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่บรรจุสารละลายธาตุอาหารพืช บ่มไว้ที่อุณหภูมิบนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 1 เดือน ตรวจสอบความมีชีวิตทุกอาทิตย์

ผลการทดลอง

จากการทดลองพบว่า แบคทีเรียเขตรากพืช *Pseudomonas fluorescens* (SP007s) สามารถมีชีวิตอยู่ได้ถึง 21 วัน หลังจากนั้นจำนวนของเซลล์แบคทีเรียเริ่มลดลง (ตารางที่ 1.12)

ตารางที่ 1.12 ความมีชีวิตของ *Pseudomonas fluorescens* (SP007s) ในสารละลายธาตุอาหารพืช

O.D.	Cell amount (cfu/ml)				
	0 day	7 days	14 days	21 days	28 days
0.1	2.3×10^4	3.1×10^6	1.1×10^8	2.3×10^6	1.2×10^3
0.2	3.2×10^6	4.3×10^8	3.2×10^9	6.1×10^7	2.1×10^4

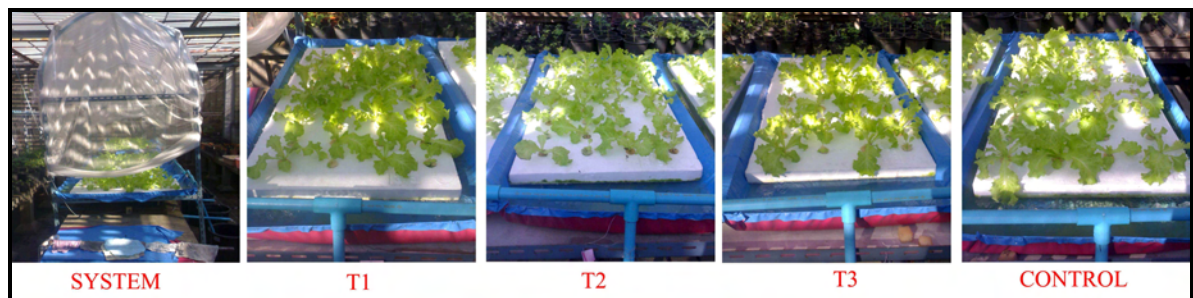
4) ประเมินความสามารถของแบคทีเรียเขตรากพืช *Pseudomonas fluorescens* (SP007s) ในการควบคุมโรครากเน่าของผักสลัด green oak ที่ปลูกใน DRFT

จากผลการทดลองที่ 1), 2) และ 3) พบว่า *Pseudomonas fluorescens* (SP007s) ได้ผลดีที่สุด จึงนำมาประเมินความสามารถในการควบคุมโรครากเน่าของผักสลัด green oak ใน DRFT (ภาพที่ 1.11) โดยทำการประเมินรูปแบบวิธีการใช้ที่เหมาะสมที่สุด ซึ่งมีวิธีการดังนี้ T1: คลุกเมล็ด, T2: ใส่ลงในสารละลายธาตุอาหารพืช, T3: คลุกเมล็ด + ใส่ลงในสารละลายธาตุอาหารพืช, T4: ไม่ใส่ *P. fluorescens* (SP007s) (control) โดยมีการวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design 3 ซ้ำๆ ละ 20 ต้น ทุกวิธีการทำการปลูกเชื้อ *Pythium* spp. 5×10^5 sporangium/ml ในระหว่างการปลูกมีการตรวจและปรับค่า pH และ EC ของสารละลายธาตุอาหารของพืช บันทึกการเกิดโรค (disease incidence) และการเจริญเติบโตของพืช (ความสูงต้น ความยาวราก และ น้ำหนักสดของต้น)

ผลการทดลอง

การใส่เชื้อ *Pseudomonas fluorescens* (SP007s) ทุกวิธีการทำให้การเกิดโรค (disease incidence) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ control (ตารางที่ 1.13) โดยเฉพาะอย่างยิ่งวิธีการร่วมระหว่างการคลุกเมล็ดและใส่ลงในสารละลายธาตุอาหารพืช (T3) ให้ผลดีที่สุด (disease incidence = 15 เปอร์เซ็นต์) ในด้านการเจริญเติบโตของพืชดังกล่าวพบว่า เป็นไปใน

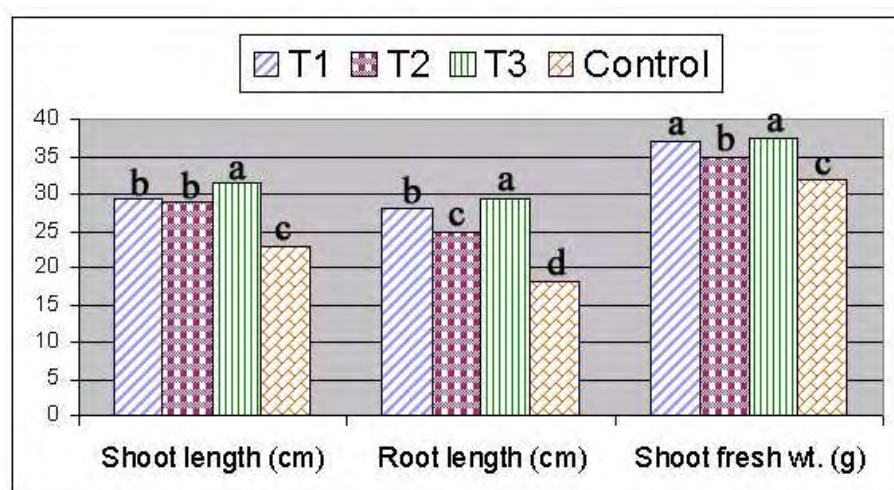
ทิศทางเดียวกับผลของการเกิดโรค กล่าวคือ วิธีการร่วมระหว่างการคลุกเมล็ดและใส่ลงในสารละลายธาตุอาหารพืช (T3) มีการเจริญเติบโตสูงที่สุด (ภาพที่ 1.12)



ภาพที่ 1.11 ระบบ DRFT สำหรับประเมินประสิทธิภาพของแบคทีเรียเขตรากพืชในการควบคุมโรครากเน่าของผักสลัด green oak

ตารางที่ 1.13 ผลของ *Pseudomonas fluorescens* (SP007s) ต่อการเกิดโรค Pythium root rot ของผักสลัด green oak ที่ปลูกใน DRFT

Treatment	Disease incidence (%)
Seed treatment (T1)	35c
Application into nutrient solution (T2)	25b
Seed trt + Application into nutrient solution (T3)	15a
Control	85d



ภาพที่ 1.12 การเจริญเติบโตและผลผลิตของผักสลัด green oak ที่ปลูกใน DRFT และใส่ *Pseudomonas fluorescens* (SP007s)

สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดลอง 1.3.1 และ 1.3.2 ซึ่งให้เห็นว่าวิธีการใช้แบคทีเรียเขตรากพืช (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) ในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน มีบทบาทที่สำคัญต่อประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

การใช้ PGPR โดยใส่ลงในสารละลายธาตุอาหารพืชโดยตรง พบว่า ไม่ให้ผลเป็นที่น่าพอใจในการควบคุมโรค Pythium root rot ของผักสลัด อีกทั้งแทบจะไม่พบปริมาณความอยู่รอดของ PGPR ในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน

การใช้ PGPR โดยการคลุกเมล็ดก่อนปลูก พบว่า ให้ผลดีต่อการงอกของเมล็ดและการเจริญเติบโตของกล้าผักสลัด green oak ในสภาพห้องปฏิบัติการ อีกทั้งการใช้ PGPR คลุกเมล็ดควบคู่กับการใส่ลงในสารละลายธาตุอาหารพืชโดยตรงจะให้ผลดีที่สุดในการลดเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค (disease incidence) และเพิ่มการเจริญเติบโตของพืชด้วย

2. การหาสายพันธุ์เชื้อราชนิดใหม่ในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน (Indigenous antagonistic fungi) ที่มีศักยภาพในการควบคุมโรครากเน่าในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน

2.1 การสำรวจ เก็บรวบรวมสายพันธุ์เชื้อราในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน

ทำการสำรวจ เก็บรวบรวมสายพันธุ์เชื้อราชนิดต่างๆ จากส่วนต่างๆ ของพืช และสารละลายธาตุอาหารพืชจากแหล่งปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน ได้แก่ ศูนย์วิจัยและพัฒนาเขาคินซอน โครงการส่วนพระองค์ จ. ฉะเชิงเทรา โครงการพัฒนาส่วนพระองค์ ตำบลบางแตน อ. บ้านสร้าง จ. ปราจีนบุรี ศูนย์ศึกษาการพัฒนาเขาคินซอนฯ อ. พนมสารคาม จ. ฉะเชิงเทรา แหล่งปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินตามโครงการพระราชดำริ หลังร้าน Golden place रामคำแหง กรุงเทพมหานคร สวน ส.ส. อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมา แหล่งปลูกผักไฮโดรโปนิกส์บางปู จ. สมุทรปราการ และ โครงการส่วนพระองค์ลูกพระดาบส จ. สมุทรปราการ โดยเก็บรวบรวมตัวอย่างผัก (ใบ และราก) ได้แก่ บัตเตอร์เฮด (butterhead) กรีนคอส (green cos) ผักโขมแก้ว ผักโขมแดง ผักโขมเขียว สะระแหน่ ผักสลัดเรดโอ๊ค (red oak) กรีนโอ๊ค (green oak) เรดโครัล (red coral) ฟินเลย์ Water cress, Dai-Tokyo คื่นช่าย และ ผักกาดขาว ที่มีความสมบูรณ์ไม่แสดงอาการเป็นโรคใดๆ ในโต๊ะปลูกที่มีพืชเป็นโรค รวมทั้งเก็บสารละลายธาตุอาหารในระบบปลูกหลายๆ แบบ เช่น NFT, DFT, DRFT, water culture เพื่อแยกเชื้อราที่มีประโยชน์ โดยเก็บตัวอย่างแต่ละชนิดใส่ถุงพลาสติกที่ปลอดเชื้อ รัดปากถุงให้แน่น เขียนข้อมูลรายละเอียด ได้แก่ พันธุ์ อายุ วันเดือนปีที่เก็บ เพื่อจัดเป็นข้อมูลพื้นฐาน ใส่กล่องโฟมบรรจุน้ำแข็งเพื่อป้องกันพืชเหี่ยวก่อนนำไปแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการด้วยวิธีการ tissue transplanting technique ร่วมกับ selective media

2.2 การทดสอบประสิทธิภาพในการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์ในสภาพห้องปฏิบัติการ

นำเชื้อราที่ได้จากการสำรวจและเก็บรวบรวมจากข้อ 2.1 จำนวน 56 ไอโซเลท มาทดสอบประสิทธิภาพความเป็นเชื้อราปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรครากเน่า *Pythium* spp. ในสภาพ

ห้องปฏิบัติการโดยวิธี Bi-culture test ดังนี้ ทำการเลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรครากเน่า ไส้เลที่เกิดโรครุนแรงที่สุดจากการทดลองที่ 1 และ เชื้อราปฏิปักษ์ที่แยกได้ทุกไอโซเลทบนอาหาร PDA บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25-32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 3 วันสำหรับเชื้อสาเหตุโรค และ 7 วันสำหรับเชื้อราปฏิปักษ์ สำหรับการทำให้ Bi-culture test เริ่มจากใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ลนไฟผ่าเชื้อ เจาะบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อราสาเหตุและเชื้อราปฏิปักษ์ จากนั้นย้ายชิ้นส่วนของเชื้อราทั้งสองชนิดมาวางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ตรงข้ามกันให้มีระยะห่างพอประมาณเป็นจานอาหารเลี้ยงเชื้อร่วม (Bi-culture plate) จากนั้นทำการเลี้ยงเชื้อราปฏิปักษ์และเชื้อราสาเหตุโรคแต่ละชนิดแยกจากกันบนอาหาร PDA เป็นตัวเปรียบเทียบ บ่มจานอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 วัน

การทดลองครั้งนี้วางแผนแบบ Completely Randomized Design จำนวน 5 ซ้ำ ทดสอบกับเชื้อราปฏิปักษ์จำนวน 56 ไอโซเลท

บันทึกผลการทดลอง โดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี และนับจำนวน oospore ของเชื้อราสาเหตุโรค แล้วนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโต (Growth inhibition, GI) ดังนี้

$$GI = (R1-R2)/R1 \times 100$$

โดย R1 = ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี หรือจำนวน oospore ของเชื้อราสาเหตุโรคในจานอาหารเปรียบเทียบ

R2 = ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี หรือจำนวน oospore ของเชื้อราสาเหตุโรคในจานอาหารเลี้ยงเชื้อร่วม

ผลการทดลอง

จากการสำรวจและเก็บรวบรวมเชื้อราในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน จากแหล่งต่างๆ ดังที่กล่าวไปแล้วข้างต้นนั้น เชื้อราที่รวบรวมได้ จำนวน 60 ไอโซเลท ดังตารางที่ 2.1 และ 2.2 ได้แก่ เชื้อราในกลุ่ม *Trichoderma* spp., *Gliocladium* sp., *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. และ *Curvularia* spp.

จากการทดสอบประสิทธิภาพในการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์ของเชื้อราที่แยกได้จากระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินทั้ง 60 ไอโซเลท โดยวิธี Bi-culture test พบว่า เชื้อราที่นำมาทดสอบจำนวนหนึ่งไม่แสดงศักยภาพการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์ สำหรับอีกจำนวนหนึ่ง แสดงศักยภาพในการยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อ *Pythium* spp. ได้ในระดับหนึ่งในช่วง 3 วันแรก (เปอร์เซ็นต์ยับยั้งสูงไม่เกิน 40 เปอร์เซ็นต์) ดังตารางที่ 2.3 ซึ่งอาจจะเป็นผลมาจากการที่เชื้อสาเหตุโรคเจริญค่อนข้างเร็ว ดังนั้นกลไกการยับยั้งไม่น่าจะเป็นการแข่งขัน (competition) ดังนั้นจึงมีการสังเกตกลไกของการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์ต่อไปอีกระยะหนึ่ง โดยบ่มจานอาหารเลี้ยงเชื้อร่วมไว้จนถึง 20 วัน พบว่า เชื้อราปฏิปักษ์ 3 ไอโซเลท ได้แก่ A003, A018 และ A019 สามารถเจริญครอบคลุมเชื้อสาเหตุโรคได้เกือบสมบูรณ์ (exploitation) จนกระทั่งไม่สามารถนับจำนวน oospore ของเชื้อสาเหตุโรคได้ (ภาพที่ 2.1)

ตารางที่ 2.1 การสำรวจและเก็บรวบรวมเชื้อราในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน

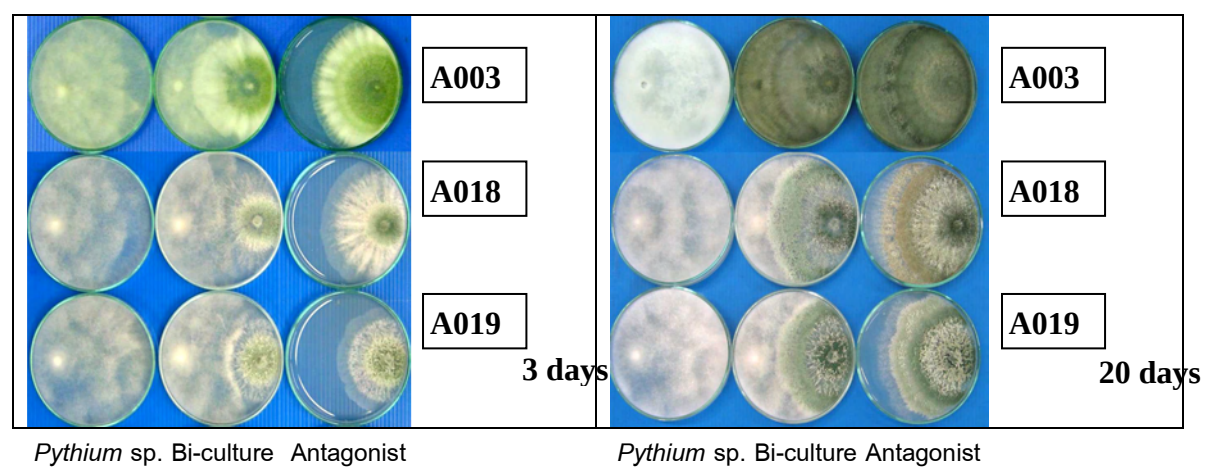
Isolates	Isolated plant part	Location	Hydroponic type
RK-K1	Celery root	Ramkamhang, BKK	DFT
RK-K2	Celery root	Ramkamhang, BKK	DFT
RK-K3	Celery root	Ramkamhang, BKK	DFT
RK-DK1	Dai-Tokyo root	Ramkamhang, BKK	DFT
RK-DK2	Dai-Tokyo root	Ramkamhang, BKK	DFT
RK-DK3	Dai-Tokyo root	Ramkamhang, BKK	DFT
RKPG-NS	Nutrient solution DFT	Ramkamhang, BKK	DFT
RKDK-NS1	Nutrient solution DFT	Ramkamhang, BKK	DFT
RKDK-NS2	Nutrient solution DFT	Ramkamhang, BKK	DFT
RKDK-NS3	Nutrient solution DFT	Ramkamhang, BKK	DFT
RKK-NS1	Nutrient solution of celery	Ramkamhang, BKK	DFT
RKK-NS2	Nutrient solution of celery	Ramkamhang, BKK	DFT
RKK-NS3	Nutrient solution of celery	Ramkamhang, BKK	DFT
RKK-NS4	Nutrient solution of celery	Ramkamhang, BKK	DFT
RKK-NS5	Nutrient solution of celery	Ramkamhang, BKK	DFT
BT-NS1	Nutrient solution of pak-khome	Bangtan, Prachinburi	DFT
PNS-MNS1	Nutrient solution of peppermint	Panomsarakam, Chachoengsao	DFT
PNS-MNS2	Nutrient solution of peppermint	Panomsarakam, Chachoengsao	DFT
PNS-MNS3	Nutrient solution of peppermint	Panomsarakam, Chachoengsao	DFT
BT-KG1	Pak-khome (green) root	Bangtan, Prachinburi	DFT
BT-KG2	Pak-khome (green) root	Bangtan, Prachinburi	DFT
BT-KR1	Pak-khome (red) root	Bangtan, Prachinburi	DFT
BT-KW1	Pak-khome (white) root	Bangtan, Prachinburi	DFT
BT-KW2	Pak-khome (white) root	Bangtan, Prachinburi	DFT
PNS-M1	Peppermint root	Panomsarakam, Chachoengsao	DFT
PNS-M2	Peppermint root	Panomsarakam, Chachoengsao	DFT
PNS-M3	Peppermint root	Panomsarakam, Chachoengsao	DFT
PNS-M4	Peppermint root	Panomsarakam, Chachoengsao	DFT
Trichoderma PNS-BH1	Butterhead root	Panomsarakam, Chachoengsao	NFT
Trichoderma PNS-BH2	Butterhead root	Panomsarakam, Chachoengsao	NFT
BP-BH	Butterhead root	Bangpoo, Samutprakarn	NFT
RK-BH	Butterhead root	Ramkamhang, BKK	NFT

ตารางที่ 2.1 การสำรวจและเก็บรวบรวมเชื้อราในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน (ต่อ)

Isolates	Isolated plant part	Location	Hydroponic type
BP-C	Cos root	Bangpoo, Samutprakarn	NFT
RK-C	Cos root	Ramkamhang, BKK	NFT
PNS-FL1	Frillice root	Panomsarakam, Chachoengsao	NFT
PNS-FL2	Frillice root	Panomsarakam, Chachoengsao	NFT
PNS-FL3	Frillice root	Panomsarakam, Chachoengsao	NFT
BP-FL	Frillice root	Bangpoo, Samutprakarn	NFT
PNS-GO1	Green oak root	Panomsarakam, Chachoengsao	NFT
PNS-GO2	Green oak root	Panomsarakam, Chachoengsao	NFT
PNS-GO3	Green oak root	Panomsarakam, Chachoengsao	NFT
Trichoderma PNS-GO	Green oak root	Panomsarakam, Chachoengsao	NFT
RK-GO1	Green oak root	Ramkamhang, BKK	NFT
RK-GO2	Green oak root	Ramkamhang, BKK	NFT
RK-GO3	Green oak root	Ramkamhang, BKK	NFT
RK-GO4	Green oak root	Ramkamhang, BKK	NFT
RK-NS1	Nutrient solution in NFT	Ramkamhang, BKK	NFT
RK-NS2	Nutrient solution in NFT	Ramkamhang, BKK	NFT
BP-NS1	Nutrient solution	Bangpoo, Samutprakarn	NFT
BP-NS2	Nutrient solution	Bangpoo, Samutprakarn	NFT
BP-RC	Red coral root	Bangpoo, Samutprakarn	NFT
RK-RC1	Red coral root	Ramkamhang, BKK	NFT
RK-RC2	Red coral root	Ramkamhang, BKK	NFT
RK-RC3	Red coral root	Ramkamhang, BKK	NFT
RK-RC4	Red coral root	Ramkamhang, BKK	NFT
RK-RC5	Red coral root	Ramkamhang, BKK	NFT
BP-RO1	Red coral root	Bangpoo, Samutprakarn	NFT
BP-RO2	Red coral root	Bangpoo, Samutprakarn	NFT
BP-RO3	Red coral root	Bangpoo, Samutprakarn	NFT

ตารางที่ 2.2 แหล่งที่มาและจำนวนไอโซเลทของเชื้อราที่แยกได้

Hydroponic type	Source	Isolate amount
DFT	Celery	4
	Dai-Tokyo	3
	Pak-khome	5
	Peppermint	4
	DFT solution	13
NFT	Butterhead	4
	Cos	2
	Frillice	4
	Green oak	8
	Red coral	9
	NFT solution	4
Total		60



ภาพที่ 2.1 การทดสอบ Bi-culture test โดยใช้เชื้อราเขตรากพืชต่อต้านเชื้อ *Pythium* spp. สาเหตุโรครากเน่า

ตารางที่ 2.3 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญทางเส้นใยเชื้อ *Pythium* spp. ของการทดสอบ Bi-culture test ของเชื้อราเขตรากพืชของระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน ที่อายุ 3 วัน

Source code	Isolate code	% growth inhibition
Th uniseed	A001	26.25
BR-BH 3	A002	21.75
Tr tomato	A003	22.25
Th trisan	A004	24.13
Thm WC	A005	21.38
RK-K1	A006	0.00
RK-DK3	A007	14.25
DK-DK1	A008	0.00
RK-DK2	A009	17.25
RK-DK NS3	A010	16.75
WC3	A011	32.63
BP-C	A012	29.63
RK-RC5	A013	29.00
BP-R02	A014	29.13
BP-RC	A015	28.75
WC1	A016	27.75
WC2	A017	25.50
TR8 durian	A018	35.38
WC4	A019	29.25
BP-NS2	A020	21.13

สรุปผลการทดลอง

จากการสำรวจ รวบรวมและคัดเลือกเชื้อราเขตรากพืช จำนวน 60 ไอโซเลท จากแหล่งต่างๆ ของระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน เพื่อจะนำมาใช้เป็นเชื้อราปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อ *Pythium* spp. พบว่า เชื้อราปฏิปักษ์ 3 ไอโซเลท ได้แก่ A003, A018 และ A019 มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคในสภาพห้องปฏิบัติการได้ดี จึงควรนำไปทดสอบต่อในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินต่อไป

2.3 การทดสอบประสิทธิภาพในการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์ในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะนำเชื้อราที่แยกได้จากระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินและแสดงความสามารถในการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ต่อเชื้อสาเหตุโรครากเน่าในสภาพห้องปฏิบัติการจากข้อ 2.2 มาประเมินประสิทธิภาพในการควบคุมโรครากเน่าในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design ประกอบด้วย 5 กรรมวิธี 5 ซ้ำๆ ละ 2 ต้น รายละเอียดกรรมวิธีมีดังนี้

- กรรมวิธี 1 (T1): Healthy control
- กรรมวิธี 2 (T2): Inoculated control with *Pythium* spp.
- กรรมวิธี 3 (T3): ใส่เชื้อราปฏิปักษ์ A003 และปลูกเชื้อ *Pythium* spp.
- กรรมวิธี 4 (T4): ใส่เชื้อราปฏิปักษ์ A018 และปลูกเชื้อ *Pythium* spp.
- กรรมวิธี 5 (T5): ใส่เชื้อราปฏิปักษ์ A019 และปลูกเชื้อ *Pythium* spp.

1) การปลูกพืช

1.1) การเตรียมระบบ DRFT

ใช้กระบะพลาสติกสีดำขนาด 17 x 43 x 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร แล้วผสมสารละลายธาตุอาหารสำหรับผักกินใบ (Benoit, 1992) ปรับค่า EC = 1.55 mS/cm และ ค่า pH ในช่วง 5.8-6.2

1.2) การเพาะเมล็ด

เพาะเมล็ดผักสลัด Cos ลงในฟองน้ำ 60 เมล็ด รดด้วยน้ำเป็นเวลา 4 วัน จากนั้นรดด้วยสารละลายปุ๋ยที่มีค่า EC = 0.7 mS/cm และ ค่า pH 5.8 เป็นเวลา 3 วัน ก่อนที่จะย้ายลงระบบอนุบาลที่มีค่า EC = 0.7 mS/cm และ ค่า pH 5.8-6.2 อีกเป็นเวลา 1 สัปดาห์

1.3) การย้ายพืชลงระบบ DRFT

ย้ายกล้าลงระบบ DRFT ที่มีสารละลายที่มีค่า EC = 1.55 mS/cm และ ค่า pH 5.8-6.2 ทำการดูแล ตรวจเช็คสารละลายและปรับสารละลายใหม่เพื่อรักษาสภาพค่า EC และ pH ให้อยู่ในช่วงดังกล่าวทุกวันในช่วงเช้า

2) การใส่เชื้อ BCA (เชื้อราปฏิปักษ์) ลงในระบบ

เริ่มจากการเตรียม spore suspension ของเชื้อราปฏิปักษ์ทั้ง 3 ไอโซเลท เริ่มจากเลี้ยงเชื้อบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นขูด spore มาใส่ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อเพื่อทำ spore suspension และนับปริมาณ spore และปรับให้ได้ 1×10^6 spore/ml โดยใช้ haemocytometer จากนั้นนำรากพืชแช่ใน spore suspension ดังกล่าวเป็นเวลา 5 นาที โดยใช้ในปริมาณ 10 มิลลิลิตร ต่อต้น จากนั้นเทลงในระบบปลูก

3) การปลูกเชื้อ pathogen ลงในระบบ

นำเชื้อ *Pythium* spp. เลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นเจาะชั้นวุ้นเชื้อด้วย cork borer เบอร์ 2 และใส่ลงในอาหาร V8 broth และนำไปวางบนเครื่องเขย่าวันละ 8 ชั่วโมงเป็นเวลา 5 วัน จากนั้นเตรียม spore suspension ให้ได้ 5×10^6 sporangium/ml และใส่ลงในระบบปลูกพืชหลังจากใส่ BCA แล้ว 2 วัน ตามกรรมวิธีที่ระบุข้างต้น

4) การตรวจสอบเชื้อ BCA และเชื้อสาเหตุในระบบในระหว่างการทดลอง

เพื่อยืนยันอีกครั้งหนึ่งว่าเชื้อสาเหตุในแต่ละทรีทเมนต์ยังมีปริมาณเท่าเดิมอยู่หรือไม่ ดังนั้นจึงมีการนำสารละลายในแต่ละกรรมวิธีมาแยกเชื้อ BCA และเชื้อสาเหตุ เมื่อสิ้นสุดการทดลอง สำหรับปริมาณความอยู่รอดของเชื้อราปฏิปักษ์ โดยวิธี โดยใช้อาหาร Martin's medium และ selective media เพื่อตรวจนับเชื้อ BCA และเชื้อสาเหตุ ตามลำดับ

การบันทึกผลและการเก็บข้อมูล

1. ข้อมูลทางด้านโรค
 - 1.1 บันทึกอาการโรคเป็นเวลา 8 วัน หลังจากทำการปลูกเชื้อสาเหตุโรค
 - 1.2 บันทึกความอยู่รอดของเชื้อสาเหตุโรคและเชื้อราปฏิปักษ์ ที่วันเก็บเกี่ยว
2. ข้อมูลทางด้านพืช
 - 2.1 การเจริญเติบโต (วัดทุกสัปดาห์หลังจากลงระบบและที่วันเก็บเกี่ยว)
 - 2.1.1 จำนวนใบแท้
 - 2.1.2 ความกว้าง และความยาวของใบ
 - 2.1.3 ความสูงของต้น
 - 2.1.4 Leaf SPAD value
 - 2.2 ผลผลิต (เก็บเมื่ออายุ 6 สัปดาห์) โดยชั่งน้ำหนักสดต้นและราก ความยาวราก
3. ข้อมูลทางสภาพแวดล้อม
 - 3.1 คุณสมบัติของสารละลาย (EC, pH, อุณหภูมิ) ทำการตรวจวัดทุกวัน
 - 3.2 ความเข้มแสง อุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์ในโรงเรือน
4. วิเคราะห์ผลทางสถิติ

ผลการทดลอง

จากการประเมินประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ (3 isolates) ที่ได้จากระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน พบว่า หลังจากทำการปลูกเชื้อสาเหตุโรค (*Pythium* spp.) ครั้งแรกเมื่อวันที่ 18 หลังจากเพาะเมล็ดแล้ว พืชในกรรมวิธีที่ปลูกเชื้อสาเหตุโรคอย่างเดียว (Inoculated control, T2) แสดงอาการเป็นโรคสูงสุดเพียงระดับ 2.5 (Disease severity) ดังนั้น จึงทำการปลูกเชื้อสาเหตุโรคซ้ำอีกครั้งหนึ่งในวันที่ 28 หลังจากเพาะเมล็ด เพื่อให้พืชแสดงอาการโรคชัดเจนยิ่งขึ้น ซึ่งน่าจะส่งผลให้การประเมินประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ได้ถูกต้อง แม่นยำขึ้น แต่อย่างไรก็ตาม หลังจากการปลูกเชื้อสาเหตุโรคครั้งที่ 2 เพียง 1 วัน ความรุนแรงของโรคสูงขึ้นเป็นระดับ 2.8 จากนั้นความรุนแรงของโรคก็ลดลงอีกเช่นเดิม จนกระทั่งวันที่ 8 หลังจากปลูกเชื้อสาเหตุโรคครั้งที่ 2 พบว่า กรรมวิธีที่ปลูกเชื้อสาเหตุโรคเพียงอย่างเดียวจะแสดงอาการโรครากเน่ารุนแรงประมาณระดับ 2.2 ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับพืชปกติ (ไม่เป็นโรค) สำหรับพืชในทุกกรรมวิธีที่ใช้เชื้อราปฏิปักษ์ทั้ง 3 ชนิด แสดงความรุนแรงของโรครากเน่าไม่ต่างกันทางสถิติ (ประมาณ 1.2) แต่รุนแรงน้อยกว่ากรรมวิธีที่

ไม่ได้ใช้เชื้อราปฏิปักษ์ (Inoculated control) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ดังกล่าวไม่ให้ผลดีเท่ากับ พืชปกติ (healthy control) ตารางที่ 2.4 ภาพที่ 2.2 และ 2.3

สำหรับความอยู่รอดของเชื้อราปฏิปักษ์และเชื้อราสาเหตุโรคที่รากพืช ในวันเก็บเกี่ยว พบว่าความอยู่รอดของเชื้อราสาเหตุโรคที่รากพืชมีสูงที่สุดในกรรมวิธีที่ปลูกเชื้อราสาเหตุโรคเพียงอย่างเดียว และสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีที่มีการใช้เชื้อราปฏิปักษ์ร่วมด้วย แสดงว่าเชื้อราปฏิปักษ์มีผลในการยับยั้งและทำให้ความอยู่รอดของเชื้อราสาเหตุโรคลดลง อย่างไรก็ตาม เชื้อ *Pythium* spp. ก็ยังพบในรากของพืชปกติได้ในปริมาณเพียงเล็กน้อย ซึ่งอาจจะเป็น non-pathogenic *Pythium* spp. (ตารางที่ 2.5) ส่วนความอยู่รอดของเชื้อราปฏิปักษ์ ที่รากพืชมีความสัมพันธ์กันในทางลบ (negative correlation) กับปริมาณความอยู่รอดของเชื้อราสาเหตุโรค *Pythium* spp. กล่าวคือ จะพบความอยู่รอดของเชื้อราปฏิปักษ์สูง และพบความอยู่รอดของ *Pythium* spp. ต่ำในกรรมวิธีที่มีการใส่เชื้อราปฏิปักษ์ ดังตารางที่ 2.5

ภาพที่ 2.4 แสดงระบบ DRFT ที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ในการควบคุมโรครากเน่าของผักสลัด สำหรับด้านการเจริญเติบโต โดยเฉพาะน้ำหนักสดของต้นเมื่อระยะเก็บเกี่ยว พบว่า เป็นไปในทิศทางเดียวกับความรุนแรงของโรค กล่าวคือ น้ำหนักสดของทุกกรรมวิธีที่มีการใช้เชื้อราปฏิปักษ์ (T3, T4 และ T5) ให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติ และสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกรรมวิธีที่ปลูกเชื้อราสาเหตุโรคอย่างเดียว ยิ่งไปกว่านั้นจะพบว่าการใช้เชื้อราปฏิปักษ์ดังกล่าว สามารถลดความรุนแรงของโรคและทำให้ผลผลิตดีไม่แตกต่างกันทางสถิติกับพืชปกติได้ กล่าวคือ มีผลส่งเสริมการเจริญเติบโต ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ แพรทอง และคณะ, 2548; Thinggaard, 1988; Kleifeld and Chet, 1992; Yedidia *et al.*, 1999; Pariyaporn and Jaenaksorn, 2007; Rachniyom and Jaenaksorn, 2007; Jaenaksorn and Rachniyom, 2008 สำหรับกรรมวิธีที่ใส่เชื้อราสาเหตุโรคอย่างเดียวแม้ว่าจะแสดงอาการโรคสูงสุด แต่พืชในกลุ่มนี้สามารถปรับตัวและงอกรากขึ้นมาใหม่ได้ ส่งผลให้การเจริญเติบโตด้านน้ำหนักสด สูงขึ้นมาได้ระดับหนึ่ง (ตารางที่ 2.6) น่าจะเป็นผลมาจากสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมต่อการพัฒนาการของโรคนี้ เช่น อุณหภูมิในสารละลายธาตุอาหารอยู่ในช่วง 25-28 องศาเซลเซียส อีกทั้งอายุของพืชเกินระยะที่จะอ่อนแอ (susceptible) ต่อโรคนี้

ตารางที่ 2.4 แสดงการเกิดโรครากเน่าของผักสลัดจากเชื้อ *Pythium* spp. ในระบบ DRFT

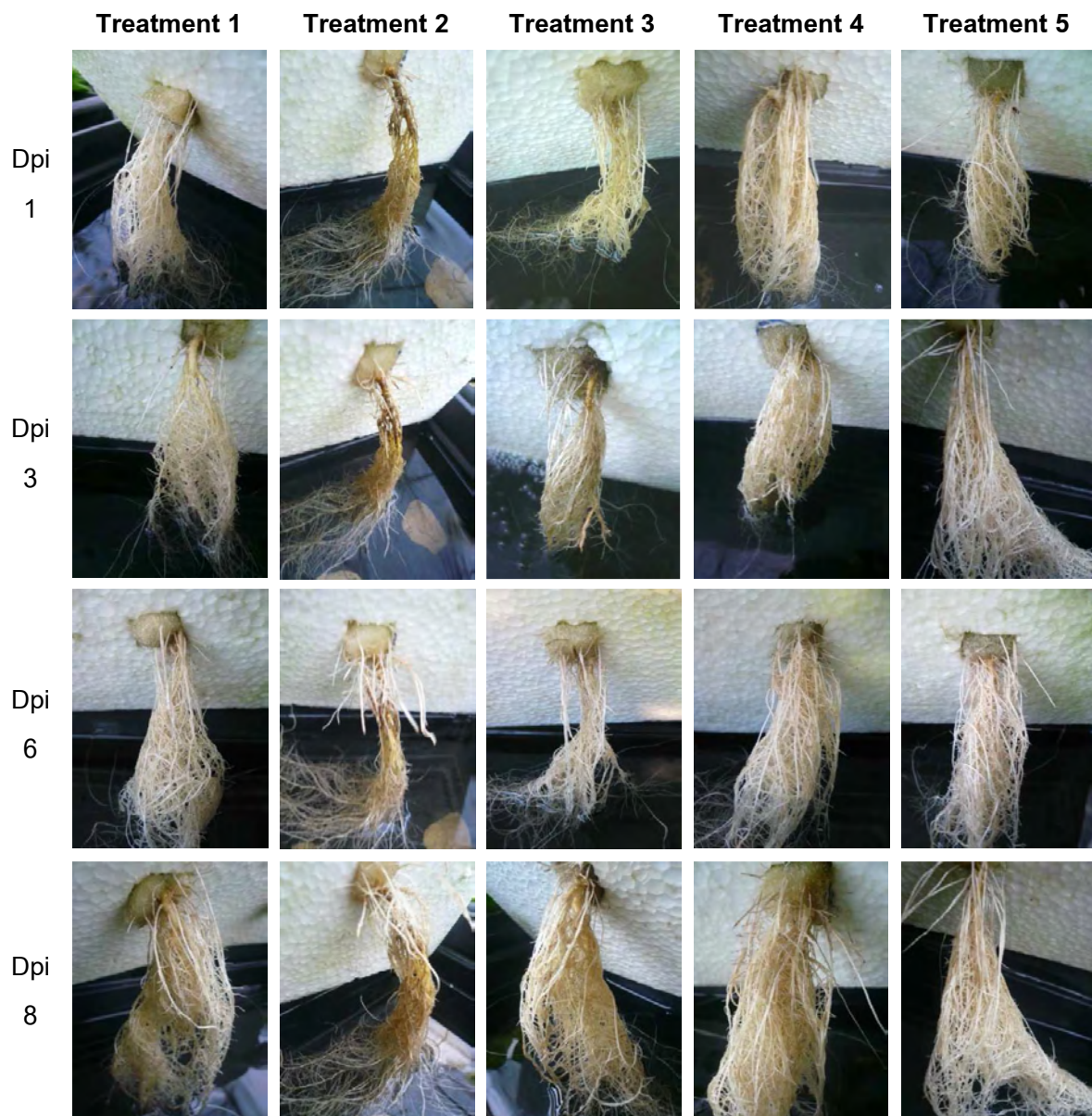
Treatment ^{1/}	Disease severity ^{2/} (1 st inoculation)							
	Dpi 1	Dpi 2	Dpi 3	Dpi 4	Dpi 5	Dpi 6	Dpi 7	Dpi 8
T1 (Healthy control)	0.0c ^{3/}	0.0d	0.0d	0.0d	0.0c	0.0c	0.2c	0.2c
T2 (<i>Pythium</i> spp.)	2.7a	2.7a	2.3a	2.1a	1.9a	1.9a	2.2a	2.5a
T3 (A003+ <i>Pythium</i> spp.)	2.2ab	2.3ab	2.1ab	1.7ab	1.4ab	1.3b	1.4b	1.7b
T4 (A018+ <i>Pythium</i> spp.)	2.3a	1.8bc	1.6bc	1.2bc	1.1b	1.2b	1.5b	1.3b
T5 (A019+ <i>Pythium</i> spp.)	1.6b	1.5c	1.2c	1.0c	1.0b	1.0b	1.4b	1.3b

Treatment ^{1/}	Disease severity ^{2/} (2 nd inoculation)							
	Dpi 1	Dpi 2	Dpi 3	Dpi 4	Dpi 5	Dpi 6	Dpi 7	Dpi 8
T1 (Healthy control)	0.2c ^{3/}	0.2c	0.0c	0.0c	0.0c	0.0c	0.0c	0.0c
T2 (<i>Pythium</i> spp.)	2.8a	2.6a	2.9a	2.4a	2.4a	2.5a	2.4a	2.2a
T3 (A003+ <i>Pythium</i> spp.)	2.2b	1.9b	1.7b	1.5b	1.4b	1.4b	1.4b	1.2b
T4 (A018+ <i>Pythium</i> spp.)	2.3b	1.4b	1.2b	1.3b	1.1b	1.2b	1.4b	1.3b
T5 (A019+ <i>Pythium</i> spp.)	1.9b	1.8b	1.5b	1.6b	1.7ab	1.7b	1.5b	1.1b

^{1/} Pathogen was inoculated twice on 18 days, 28 days after seeding. Antagonistic fungi were treated on 16 days after seeding. Dpi = Days post 2nd inoculation

^{2/} Disease severity rated as 0 = healthy root, 1 = diseased root 1-20%, 2 = diseased root 21-40%, 3 = diseased root 41-60%, 4 = diseased root 61-80% and 5 = diseased root 100% (rot)

^{3/} Means of 10 replications. Means in a column followed by the same letter are not significantly different according to DMRT.



ภาพที่ 2.2 อาการโรครากเน่าของผักสลัด butterhead ที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหารของระบบ DRFT ที่ใส่เชื้อราปฏิปักษ์และเชื้อราสาเหตุโรค ในวันที่ 1, 3, 6 และ 8 หลังจากปลูก เชื้อสาเหตุโรคครั้งที่ 2



ภาพที่ 2.3 อาการโรครากเน่าของผักสลัด butterhead (A และ B) ที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหารของระบบ DRFT ที่ใส่เชื้อราปฏิปักษ์และเชื้อราสาเหตุโรค ในวันเก็บเกี่ยวผลผลิต

ตารางที่ 2.5 แสดงปริมาณเชื้อราปฏิปักษ์ และ *Pythium* spp. ที่อยู่รอดที่รากพืชในระบบ DRFT ในวันเก็บเกี่ยว

Treatment	Survival of microorganism	
	Antagonistic fungi (CFU/g of root)	<i>Pythium</i> spp. (CFU/g of root)
T1	0.2×10^2 c ^{1/}	0.32×10^2 c
T2	0.00c	7.28×10^2 a
T3	4.4×10^2 c	1.04×10^2 bc
T4	1.9×10^3 b	2.56×10^2 b
T5	3.32×10^3 a	1.04×10^2 bc

^{1/} Means of 5 replications. Means in a column followed by the same letter are not significantly different according to DMRT.

ตารางที่ 2.6 การเจริญเติบโตและผลผลิตของผักสลัด butterhead ที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหารของระบบ DRFT ที่ใส่เชื้อราปฏิปักษ์และเชื้อราสาเหตุโรค

Treatment	Days after seeding												At harvest	
	25 days			32 days			40 days			46 days			Fresh weight	
	Leaf No.	Leaf size (cm ²)	SPAD value	Leaf No.	Leaf size (cm ²)	SPAD value	Leaf No.	Leaf size (cm ²)	SPAD value	Leaf No.	Leaf size (cm ²)	SPAD value	Stem (g)	Root (g)
T1	7.7a ^{1/}	13.3b	25.7b	11.2ab	51.8a	31.1ab	20.1bc	99.4ab	31.9ab	22.3b	127.3a	31.8a	80.0ab	6.3a
T2	7.7a	13.7b	27.1ab	10.8b	45.2a	31.9ab	19.1c	91.6b	31.6ab	22.3b	126.5a	31.8a	69.9b	6.8a
T3	8.1a	14.8ab	27.6a	10.5b	46.4a	32.6a	21.7ab	103.6ab	32.2ab	25.8a	146.5a	30.3a	89.5a	7.7a
T4	8.2a	17.5a	27.5a	12.1a	47.9a	31.4ab	22.5a	111.3a	30.6b	25.1ab	136.5a	31.1a	91.3a	7.8a
T5	8.2a	16.3ab	28.1a	11.3ab	47.4a	30.8b	19.4c	104.2ab	32.4a	23ab	134.8a	31.6a	84.4ab	8.0a
CV. (%)	7.54	22.94	8.67	8.5	20.4	7.23	10.01	16.13	7.46	12.59	15.82	7.51	19.28	23.57

^{1/} Means of 10 replications in a column followed by the same letter are not significantly different according to DMRT.



ภาพที่ 2.4 ระบบ DRFT ที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ในการควบคุมโรค รากเน่าของผักสลัด



ภาพที่ 2.5 ผักสลัด butterhead ที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหารของระบบ DRFT ที่ใส่เชื้อราปฏิปักษ์และเชื้อราสาเหตุโรค ที่วันเก็บเกี่ยว

สรุปผลการทดลอง

เชื้อราปฏิปักษ์ 3 ไอโซเลท ได้แก่ A003, A018 และ A019 ที่แยกได้จากเขตรากพืชจากระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน มีศักยภาพในการลดความรุนแรงของโรค Pythium root rot ของผักสลัดได้ อีกทั้งยังสนับสนุนการเจริญเติบโตของพืชได้ดีไม่แตกต่างกับพืชปกติ

3. การหาสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียชนิดใหม่ในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน (Indigenous antagonistic bacteria) ที่มีศักยภาพในการควบคุมโรครากเน่าในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหา คัดเลือกและประเมินประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียคุณภาพชนิดใหม่จากส่วนต่างๆ ของพืชและสารละลายธาตุอาหารพืชในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินที่มีศักยภาพในการควบคุมโรครากเน่าของผักสลัดในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน

3.1 การเก็บรวบรวม แยกเชื้อ และจัดกลุ่มแบคทีเรียที่มีประโยชน์

3.1.1 การแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์

เก็บรวบรวมสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์จากส่วนต่างๆ ของพืช และสารละลายธาตุอาหารพืชจากแหล่งผลิตผักไฮโดรโพนิคส์ ศูนย์วิจัยและพัฒนาเขาหินซ้อน โครงการสวนพระองค์ จ. ฉะเชิงเทรา แหล่งผลิตผักไฮโดรโพนิคส์ของเกษตรกร อ.ปากช่อง จ. นครราชสีมา และ โครงการสวนพระองค์ลูกพระดาบส จ. สมุทรปราการ โดยเก็บรวบรวมตัวอย่างผัก (ใบ และราก) ทั้งหมดจำนวน 10 ชนิด รวม 32 ตัวอย่าง ได้แก่ บัตเตอร์เฮด (butterhead) กรีนคอส (green cos) ผักโขมแก้ว ผักโขมเขียว สะระแหน่ ผักสลัดเรดโอ๊ค (red oak) กรีนโอ๊ค (green oak) เรดโครัล (red coral) ฟินเลย์ และ ผักกาดขาว ที่มีความสมบูรณ์ไม่แสดงอาการเป็นโรคใดๆ รวมทั้งเก็บสารละลายธาตุอาหารในระบบปลูก เพื่อแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ โดยเก็บตัวอย่างแต่ละชนิดใส่ถุงพลาสติกที่ปลอดเชื้อ รัดปากถุงให้แน่น เขียนข้อมูลรายละเอียด ได้แก่ พันธุ์ อายุ วันเดือนปีที่เก็บ เพื่อจัดเป็นข้อมูลพื้นฐาน ใส่กล่องโฟมบรรจุน้ำแข็งเพื่อป้องกันพืชเหี่ยวก่อนนำไปแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการด้วยวิธีการดังนี้

1) การแยกเชื้อแบคทีเรียจากผิวใบและราก

แยกเชื้อแบคทีเรียจากผิวใบและรากด้วยการประยุกต์ตามวิธี leaf wash technique (สุพจน์, 2544) โดยนำใบหรือรากตัวอย่างละ 5 กรัม แช่ลงในน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร หยดสารลดแรงตึงผิว (Tension-T7) ลงไป 1-2 หยด นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120-150 รอบ/นาที ประมาณ 30-60 นาที เพื่อให้เชื้อแบคทีเรียจากผิวใบออกมาอยู่ในน้ำและใช้เป็น stock suspension จากนั้นทำการเจือจางความเข้มข้นของ suspension ด้วยวิธีการ ten-fold serial dilution โดยใช้ micropipette ตูด suspension ของแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร กระจาย (spread) ให้ทั่วบนอาหารแข็ง nutrient agar (NA) และ King's medium B บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (28-30 °C) นาน 24-72 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งมีโคโลนีของแบคทีเรียเจริญขึ้นมา เลือกเก็บโคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญอยู่บนอาหารมาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ โดยการ cross streak plate บนอาหาร NA จานใหม่ 2-3 รอบเพื่อใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพขั้นต่อไป

2) การแยกเชื้อแบคทีเรียจากภายในราก

แยกเชื้อแบคทีเรียจากราก โดยนำรากผักแต่ละชนิด ตัวอย่างละ 5 กรัม แช่ลงใน 10% clorox นาน 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 2-3 ครั้ง นำรากพืชแต่ละชนิดไปบดด้วยโกร่งปลอดเชื้อ โดยเติมน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 9 มิลลิลิตร ใช้ micropipette ตูด suspension ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร กระจาย (spread) ให้ทั่วบนอาหารแข็ง NA จากนั้นนำไปบ่มไว้ที่

อุณหภูมิห้อง (28-30 °C) นาน 24-72 ชั่วโมง เลือกเก็บโคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญอยู่บนอาหารมา แยกเชื้อให้บริสุทธิ์เช่นเดียวกับวิธีการข้อ 3.1.1 เพื่อใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพขั้นต่อไป

3) การแยกเชื้อแบคทีเรียจากสารละลายธาตุอาหารพืช

แยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างสารละลายธาตุอาหารพืชโดยวิธี dilution plate โดยการนำตัวอย่างสารละลายธาตุอาหารพืชมาเจือจางด้วยวิธี ten-fold serial dilution ด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 9 มิลลิลิตร ให้ได้ค่าเจือจาง 10^3 - 10^{10} จากนั้นจุด suspension ของแต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร กระจ่าย (spread) ให้ทั่วบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ NA และ King's medium B บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 24-72 ชั่วโมง เก็บโคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญทั้งหมดมาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์เช่นเดียวกับวิธีในข้อ 3.1.1 เพื่อใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป

3.1.2 จัดกลุ่มแบคทีเรียที่มีประโยชน์

นำเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดที่รวบรวมได้จากการแยกเชื้อบริเวณผิวใบ ผีเสื้อ ภายในราก และสารละลายธาตุอาหารพืชมาจัดกลุ่มสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรีย โดยการจำแนกกลุ่มตาม ลักษณะพื้นฐานทางด้านสัณฐานวิทยาของโคโลนี (รูปร่าง ขนาด และสี) ที่เจริญบนผิวหน้าอาหารบนอาหาร NA

ผลการทดลอง

3.1.1 การแยกเชื้อและจัดกลุ่มแบคทีเรียที่มีประโยชน์

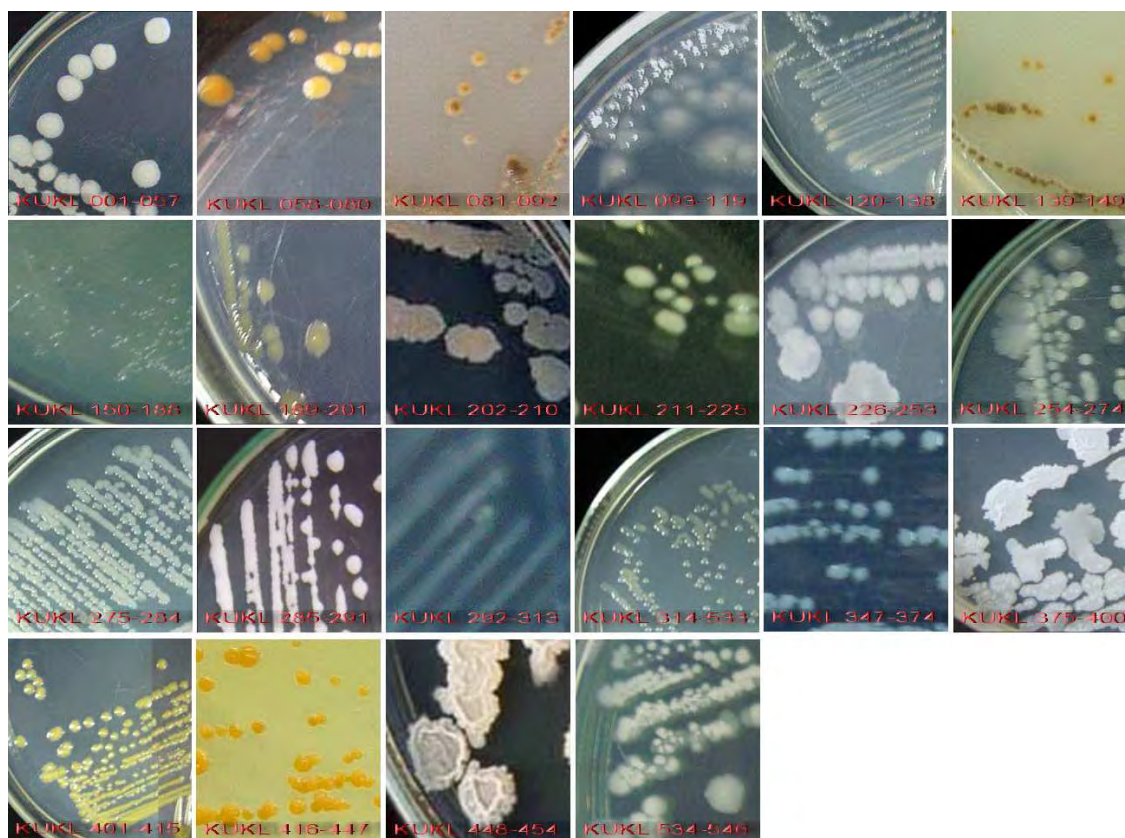
การแยกสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์จากส่วนต่างๆ ของผักที่เก็บจากแหล่งผลิตผักในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน โดยเก็บผักที่มีความสมบูรณ์ไม่แสดงอาการเป็นโรคใดๆ รวมทั้งสารละลายธาตุอาหารในระบบดังกล่าว ทั้งหมดจำนวน 10 ชนิด รวม 32 ตัวอย่าง พบว่าสามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดได้ 468 ไอโซเลท และสามารถจำแนกกลุ่มอย่างหายา ตามลักษณะโคโลนีบนอาหาร NA ได้ 23 กลุ่ม โดยกลุ่มที่มีจำนวนเชื้อมากที่สุด คือ กลุ่ม 1 ลักษณะโคโลนีสีขาวขุ่น กลมแบน มันวาว เยิ้ม 57 ไอโซเลท รองลงมา คือ กลุ่ม 7 ลักษณะโคโลนีสีขาวขุ่น แบนราบ คล้ายเส้นใยเชื้อรา จำนวน 39 ไอโซเลท และกลุ่ม 21 ลักษณะโคโลนี สีเหลืองเข้ม กลม ขอบหยักเล็กน้อย 32 ไอโซเลท ส่วนกลุ่มที่มีจำนวนน้อยที่สุด คือ กลุ่ม 14 ลักษณะโคโลนีสีขาวขุ่น รูปร่างไม่แน่นอนค่อนข้างกลม นูน มันวาว 7 ไอโซเลท ซึ่งมีจำนวนเท่ากับกลุ่ม 22 ที่มีลักษณะโคโลนีสีขาว กลมตรงกลางปุ่ม ด้านขอบหยัก และกลุ่ม 9 ลักษณะโคโลนีสีเหลืองอ่อนตรงกลางเข้ม รูปร่างไม่แน่นอน มันวาว 9 ไอโซเลท (ตารางที่ 3.1 ภาพที่ 3.1)

ตารางที่ 3.1 ลักษณะพื้นฐานทางด้านสัณฐานวิทยาของโคโลนี (รูปร่าง ขนาด และสี) ของแบคทีเรียที่เจริญบนผิวหน้าอาหารบนอาหาร NA ที่แยกได้จากส่วนต่างๆ ของพืช (ใบ ต้นและราก) สารละลายธาตุอาหารพืชที่ใช้ในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน

Group	Bacterial isolate	Morphotypes ^{1/}	Number of isolate ^{2/}
1	KUKL001-057	Gray white, flat, circular, glint slimy	57
2	KUKL058-080	Yellow, convex, glint slimy	23
3	KUKL081-092	Gray white, convex, circular, glint smooth surface, undulate margins	12
4	KUKL093-119	Gray white, flat, irregular, rough surface, lobate margins	27
5	KUKL120-138	Gray white, convex, circular, lobate margins	19
6	KUKL139-149	Light brown, convex, circular, glint smooth surface	11
7	KUKL150-188	Gray white, flat, filamentous	39
8	KUKL189-201	Yellow pale, convex, circular, glint smooth surface, lobate margins	13
9	KUKL202-210	Yellow pale, irregular, glint smooth surface	9
10	KUKL211-225	Light white, oval, entire margins	15
11	KUKL226-253	Gray white, flat	28
12	KUKL254-274	Gray white, flat, circular, undulate margins	21
13	KUKL275-284	Gray white, circular, glint smooth surface	10
14	KUKL285-291	Gray white, convex, irregular, glint smooth surface	7
15	KUKL292-313	Brown yellow (soluble on medium), irregular	22
16	KUKL314-533	Gray white, convex, glint, smooth surface	20
17	KUKL534-346	Gray white, convex, circular, glint smooth surface, spread colony	13
18	KUKL347-374	Gray white, irregular, smooth surface	28
19	KUKL375-400	White, flat, rough surface, undulate margins	26
20	KUKL401-415	Dark yellow, irregular, flat, smooth surface, entire margins	15
21	KUKL416-447	Dark yellow, circular, undulate margins	32
22	KUKL448-454	Gray white, circular, umbilicate, rough surface, undulate margins	7
23	KUKL456-468	Whitish cream, circular, convex, entire margins	14

^{1/} Comparison of bacterial morphotypes based on color and colony characteristics.

^{2/} Total collected bacteria are 468 isolates.



ภาพที่ 3.1 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของโคโลนี (รูปร่าง ขนาด และสี) ของกลุ่มแบคทีเรียที่เจริญบนผิวหน้าอาหารบนอาหาร NA ที่แยกได้จากส่วนต่างๆ ของพืช (ใบ ต้นและราก) สารละลายธาตุอาหารพืชที่ใช้ในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน

3.2 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียในการยับยั้งเชื้อ *Pythium* spp. สาเหตุโรครากเน่าของผักในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน ระดับห้องปฏิบัติการ

นำเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ที่แยกได้จากข้อ 1 มาทดสอบการเป็นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อเชื้อสาเหตุโรค โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร NA เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ก่อนนำมาทดสอบด้วยวิธี dual culture technique กับเชื้อ *Pythium* spp. สาเหตุโรครากเน่าของผัก โดยเลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรคบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) ให้มีอายุ 4-5 วัน จากนั้นเตรียม plate ทดสอบโดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะชั้นวุ้นบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อราสาเหตุโรค ย้ายไปวางตรงกลางอาหารเลี้ยงเชื้อบนอาหาร PDA จากนั้นใช้ loop ที่ฆ่าเชื้อแล้วแตะโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ขีดลงบนจานเลี้ยงเชื้อราทดสอบข้างต้นให้มีระยะห่างจากเชื้อราสาเหตุโรค 2 เซนติเมตร ทั้งสองข้าง บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 48-72 ชั่วโมง วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเชื้อราที่เจริญได้เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่มีการเลี้ยงเชื้อราอย่างเดียว โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง = $100 - \left[\frac{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีที่วัดได้}}{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี control (90 mm)}} \right] \times 100$ จากนั้นทำการคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์คุณภาพที่มี

ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราทั้งในลักษณะการผลิตสารปฏิชีวนะ และการเจริญแข่งขันไปทดสอบในขั้นตอนต่อไป

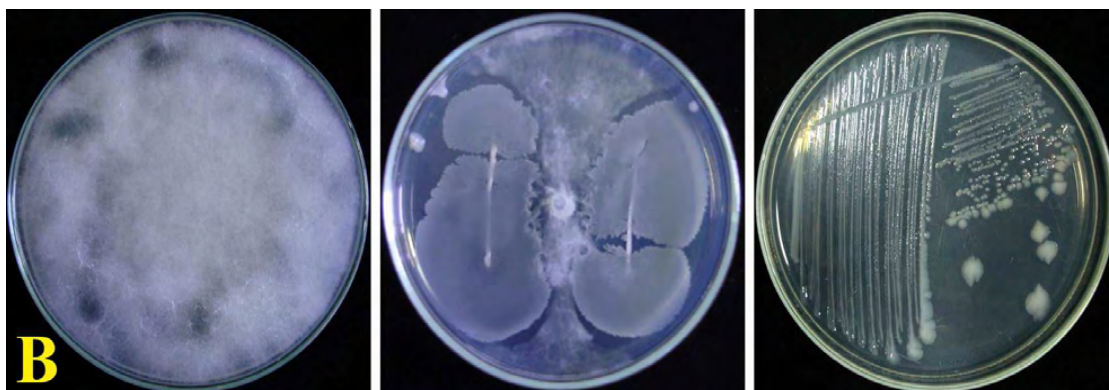
ผลการทดลอง

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียจำนวน 468 ไอโซเลท ที่แยกได้จากส่วนต่างๆ ของพืชและสารละลายธาตุอาหารในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Pythium* spp. ด้วยวิธี dual culture technique พบว่า แบคทีเรียไอโซเลท KUKL205 ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มที่ 9 มีลักษณะโคโลนีสีเหลืองอ่อน ตรงกลางเข้ม รูปร่างไม่แน่นอน มันวาว และแยกได้จากใบสาระแน (ตารางที่ 3.2 ภาพที่ 3.2) สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Pythium* spp. ได้ดีที่สุด ในลักษณะการผลิตสารปฏิชีวนะยับยั้ง โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 87.9 รองลงมาคือ ไอโซเลท KUKL319, KUKL210, KUKL371, KUKL077, KUKL189, KUKL209, KUKL432 และ KUKL357 ซึ่งเป็นแบคทีเรียจัดอยู่ในกลุ่ม 16, 9, 16, 2, 8, 9, 21, และ 18 ตามลำดับ ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 77.3, 66.2, 66, 66, 65.8, 65.8, 65.8, และ 65.8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยทุกไอโซเลทมีคุณสมบัติในการผลิตสารปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคโดยตรง (ตารางที่ 3.2)

ตารางที่ 3.2 ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียที่มีคุณภาพจากระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินในการยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของ *Pythium* spp. ด้วยวิธี dual culture ในสภาพห้องปฏิบัติการ

Bacterial isolate	Source	Inhibition diameter ^{1/} (mm)	% Inhibition
KUKL357	Root of pak-khom-kaew	30.8	65.8 ^c
KUKL432	Root of green spinach	30.8	65.8 ^c
KUKL209	Root of butter head lettuce	30.8	65.8 ^c
KUKL319	Leaf of pak-khom-kaew	20.5	77.3 ^b
KUKL210	Leaf of green oak	30.5	66.2 ^c
KUKL205	Leaf of peppermint	10.9	87.9 ^a
KUKL077	Leaf of butter head	30.6	66.0 ^c
KUKL189	Nutrient solution in green spinach culture	30.8	65.8 ^c
KUKL344	Nutrient solution in butter head culture	40.0	55.6 ^d
KUKL371	Nutrient solution in mint culture	30.6	66.0 ^c
Control	ddH ₂ O	90	0 ^e

^{1/} Means calculated from 4 replications.



ภาพที่ 3.2 ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียที่มีคุณภาพ (KUKL 205) จากระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน ในการยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของ *Pythium* spp. ด้วยวิธี dual culture ในสภาพห้องปฏิบัติการ

สรุปผลการทดลอง

จากการสำรวจ รวบรวมและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียเขตรากพืช จำนวน 468 ไอโซเลท จากแหล่งต่างๆ ของระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน เพื่อจะนำมาใช้เป็นเชื้อแบคทีเรียปฏิบั้กษาในการควบคุมเชื้อ *Pythium* spp. พบว่า เชื้อแบคทีเรีย จำนวน 9 ไอโซเลท ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรค โดยมีไอโซเลท KUKL205 ที่แยกได้จากใบสาระแหน่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยได้สูงที่สุดถึง 87.9 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น จึงควรนำไปทดสอบต่อในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินต่อไป

3.3 การประเมินประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียเขตรากพืช (new indigenous, KUKL205) ในการควบคุมโรค *Pythium* root rot ของผักสลัดในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน (DRFT)

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อนำเชื้อแบคทีเรียเขตรากพืชซึ่งแสดงศักยภาพที่ดีในห้องปฏิบัติการ ที่ได้มาจากการทดลองข้างต้น (KUKL205) มาประเมินประสิทธิภาพในการควบคุมโรค *Pythium* root rot ของผักสลัดในระบบ DRFT โดยเปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตที่ได้รับการเผยแพร่แล้ว (SP007s) (Prathuangwong, 2007) และ elicitor (salicylic acid) โดยมีการวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design 3 ซ้ำๆ ละ 20 ต้น ซึ่งมีการจัดดังนี้ T1: control (H_2O), T2: H_2O + *Pythium* spp., T3: SA, T4: SA + *Pythium* spp., T5: SP007s, T6: SP007s + *Pythium* spp., T7: KUKL205, T8: KUKL205 + *Pythium* spp.

ทำการทดลองโดยใช้เมล็ดผักสลัดมาฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย Clorox 10% 5 นาที จากนั้นแช่ด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อเป็นเวลา 3 นาที 2 ครั้ง จากนั้นแช่ลงใน bacterial suspension ความเข้มข้น 10^6 CFU/ml เป็นเวลา 10 นาที ปลอ่ยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง นำเมล็ดที่ผ่านการแช่แล้วไปเพาะในถ้วยปลูกที่บรรจุวัสดุปลูก vermiculite จนต้นกล้าเริ่มมีใบจริงจึงรดด้วยสารละลายธาตุอาหารพืช จนพืช

อายุ 7 วัน ย้ายไปอนุบาลในระบบ DRFT อนุบาล จนกระทั่งต้นกล้าอายุ 14 วัน จึงย้ายไปปลูกในระบบ DRFT ต่อไป (ภาพที่ 3.2) สำหรับวิธีการปลูกเชื้อ *Pythium* spp. กระทำ 2 วัน หลังจากลงระบบ DRFT แล้ว โดยใช้ *Pythium* spp. 5×10^5 sporangium/ml ในปริมาณ 10 มิลลิลิตรต่อต้น ในระหว่างการปลูกมีการตรวจและปรับค่า pH และ EC ของสารละลายธาตุอาหารของพืช

ในการทดลองครั้งนี้มีการตรวจสอบกิจกรรมของ defense-related enzyme (β -1, 3-glucanase) ในพืชทุกกรรมวิธีเป็นเวลา 6 วัน (เริ่มหลังจากปลูกเชื้อสาเหตุโรค) โดยวิธี laminarin dinitrosalicylic acid วัดค่าดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ 50 nm กิจกรรมของเอนไซม์จะแสดงออกในหน่วย $\mu\text{g glucose min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$ (Pan *et al.*, 1991; Buensanteai *et al.*, 2007)

บันทึกกิจกรรมของเอนไซม์ β -1, 3-glucanase การเกิดโรค (disease incidence) และวัด leaf SPAD value

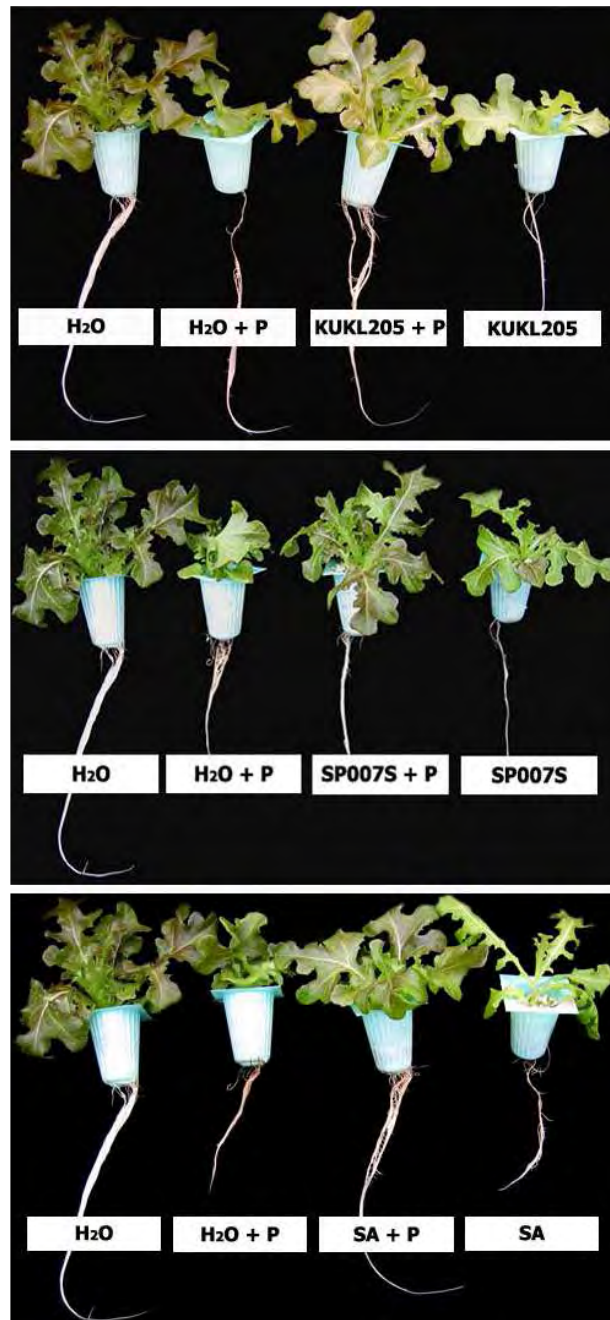


ภาพที่ 3.3 ระบบ DRFT ที่ใช้ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียเขตรากพืช

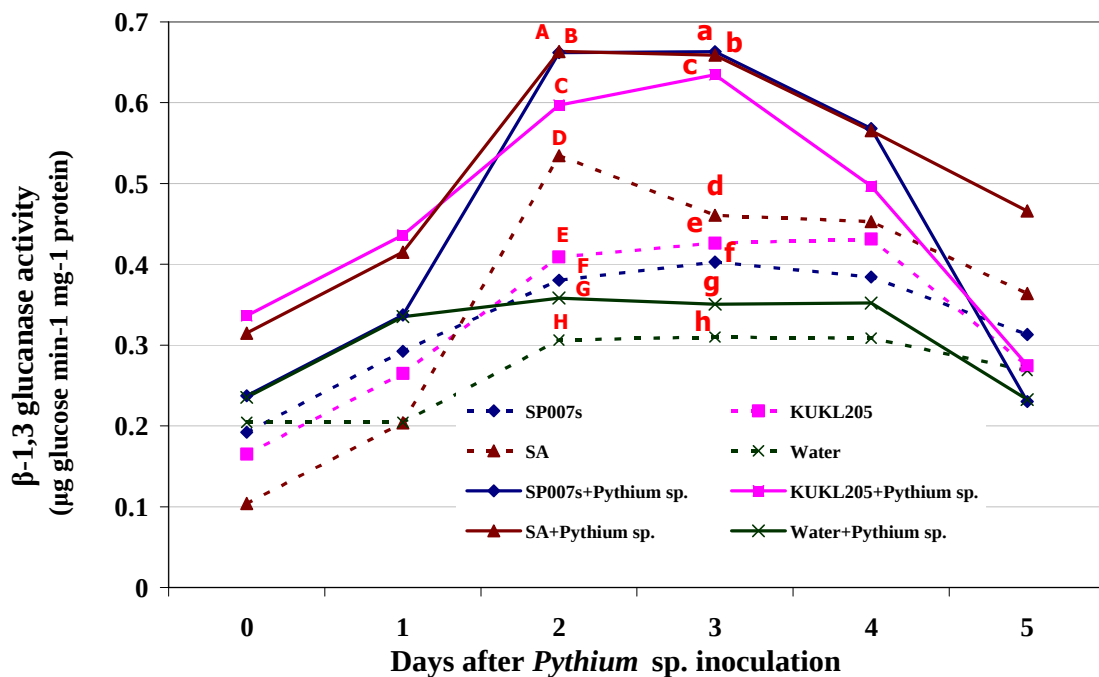
ผลการทดลอง

พืชที่มีการคลุกเมล็ดด้วยแบคทีเรียเขตรากพืชทุกกรรมวิธีไม่แสดงอาการรากเน่า เมื่อเปรียบเทียบกับพืชที่ไม่ได้มีการคลุกเมล็ดและมีการปลูกเชื้อ แต่อย่างไรก็ตามผลของการคลุกเมล็ดด้วยแบคทีเรียเขตรากพืชไม่ได้ดีไปกว่าพืชปกติ (ภาพที่ 3.4)

สำหรับการสะสมเอนไซม์ β -1, 3-glucanase พบว่า ในทุกกรรมวิธีจะมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงขึ้นเริ่มตั้งแต่วันแรกหลังจากปลูกเชื้อสาเหตุโรคและจะสูงที่สุดในวันที่สอง และคงที่ถึงวันที่สาม จากนั้นจะลดลง ในกรณีของพืชที่ได้รับการคลุกเมล็ดด้วยแบคทีเรียเขตรากพืชทั้งสองชนิด (KUKL205 และ SP007s) และมีการปลูกเชื้อสาเหตุโรคจะแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ดังกล่าวสูงกว่าพืชที่มีการปลูกเชื้อสาเหตุโรคเพียงอย่างเดียว แนวโน้มการสะสมเอนไซม์ชนิดนี้ในพืชที่คลุกเมล็ดด้วย KUKL205 เป็นไปในทิศทางเดียวกับพืชที่คลุกเมล็ดด้วย elicitor (SA) และ SP007s แต่อย่างไรก็ตามจะเห็นได้ว่า ปริมาณเอนไซม์ดังกล่าวที่ตรวจพบในพืชที่คลุกด้วย KUKL205 จะต่ำกว่าพืชที่ถูกคลุกเมล็ดด้วย SA และ SP007s ในช่วง 2-3 วันแรก (ภาพที่ 3.5)



ภาพที่ 3.4 ผลของการคลุกและไม่คลุกเมล็ดด้วยแบคทีเรียเขตรากพืช (KUKL205 และ SP007s) และ elicitor (SA) ต่อการควบคุมโรค Pythium root rot ของผักสลัด



ภาพที่ 3.5 กิจกรรมของ β - 1, 3-glucanase ในผักสลัดที่ปลูกและไม่ปลูกเมล็ดด้วยแบคทีเรียเขตรากพืช (KUKL205 และ SP007s) และ elicitor (SA) เป็นเวลา 6 วัน (เริ่มหลังจากปลูกเชื้อสาเหตุโรค)

สรุปผลการทดลอง

นำเชื้อแบคทีเรียเขตรากพืช KUKL205 ซึ่งแสดงศักยภาพที่ดีในห้องปฏิบัติการ ที่ได้มาจากการทดลองข้างต้น มาประเมินประสิทธิภาพในการควบคุมโรค *Pythium* root rot ของผักสลัดในระบบ DRFT โดยเปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตที่ได้รับการเผยแพร่แล้ว (SP007s) พบว่าการปลูกเมล็ดด้วย KUKL205 สามารถลดความรุนแรงของโรค (disease severity) ได้ เมื่อเปรียบเทียบกับพืชที่ไม่ได้มีการปลูกเมล็ดและมีการปลูกเชื้อ (Inoculated control) แต่อย่างไรก็ตามผลของการปลูกเมล็ดด้วยแบคทีเรียเขตรากพืชไม่ได้ดีไปกว่าพืชปกติ

การปลูกเมล็ดด้วยแบคทีเรียเขตรากพืชทุกตัวรวมทั้ง KUKL205 มีการสะสม defense-related enzyme β - 1, 3-glucanase ค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับ inoculated control ซึ่งผลนี้สอดคล้องกับความสามารถในการลดความรุนแรงของโรค

4. การประเมินประสิทธิภาพเชื้อแบคทีเรียร่วมกับเชื้อราปฏิปักษ์เขตรากพืชชนิดใหม่จากระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน (new indigenous antagonist) ในการควบคุมโรครากเน่าของผักสลัดในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน

จากการรวบรวมและคัดเลือกจุลินทรีย์เขตรากพืชจากระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน เพื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรครากเน่าของผักสลัดทั้งในห้องปฏิบัติการและในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินดังกล่าวข้างต้น ดังนั้น จึงได้นำเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราปฏิปักษ์เขตรากพืชชนิดใหม่ (new indigenous antagonist) ที่ได้รับจากผลการทดลองที่ 1, 2 และ 3 มาทดสอบใช้ร่วมกันเพื่อประเมินประสิทธิภาพร่วมของจุลินทรีย์เขตรากพืชดังกล่าว ในระบบ DRFT (ภาพที่ 4.1)

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design ประกอบด้วย 7 กรรมวิธี 5 ซ้ำๆ ละ 2 ต้น รายละเอียดกรรมวิธีมีดังนี้

- กรรมวิธี 1 (T1): KUKL205 – seed treatment
- กรรมวิธี 2 (T2): KUKL205 – seed treatment + antagonistic fungus A003
- กรรมวิธี 3 (T3): KUKL205 – seed treatment + antagonistic fungus A018
- กรรมวิธี 4 (T4): KUKL205 – seed treatment + antagonistic fungus A019
- กรรมวิธี 5 (T5): Inoculated control
- กรรมวิธี 6 (T6): Healthy control
- กรรมวิธี 7 (T7): SP007s – seed treatment

1) การปลูกพืช

1.1) การเตรียมระบบ DRFT

ใช้กระบะพลาสติกสีดำขนาด 17 x 43 x 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร แล้วผสมสารละลายธาตุอาหารสำหรับผักกินใบ (Benoit, 1992) ปรับค่า EC = 1.55 mS/cm และ ค่า pH ในช่วง 5.8-6.2

1.2) การเพาะเมล็ด

เพาะเมล็ดผักสลัด Cos ลงในฟองน้ำ 100 เมล็ด รดด้วยน้ำเป็นเวลา 4 วัน จากนั้นรดด้วยสารละลายปุ๋ยที่มีค่า EC = 0.7 mS/cm และ ค่า pH 5.8 เป็นเวลา 3 วัน ก่อนที่จะย้ายลงระบบอนุบาลที่มีค่า EC = 0.7 mS/cm และ ค่า pH 5.8-6.2 อีกเป็นเวลา 1 สัปดาห์

1.3) การย้ายพืชลงระบบ DRFT

ย้ายกล้าลงระบบ DRFT ที่มีสารละลายที่มีค่า EC = 1.55 mS/cm และ ค่า pH 5.8-6.2 ทำการดูแล ตรวจเช็คสารละลายและปรับสารละลายใหม่เพื่อรักษาสภาพค่า EC และ pH ให้อยู่ในช่วงดังกล่าวทุกวันในช่วงเช้า

2) การใส่เชื้อ BCA ลงในระบบ

2.1) สำหรับ bacterial antagonist ใช้วิธีคลุกเมล็ดด้วย bacterial suspension ความเข้มข้น 10^6 CFU/ml (OD 0.1) เป็นเวลา 10 นาที ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้องก่อนนำไปเพาะเมล็ดตามกรรมวิธีที่ระบุไว้ข้างต้น

2.2) สำหรับ fungal antagonist กระทำหลังจากย้ายพืชลงระบบปลูกแล้ว 2 วัน โดยจุ่มรากพืชลงใน spore suspension ความเข้มข้น 1×10^6 spore/ml ปริมาตร 10 มิลลิลิตรต่อต้น จากนั้นเทลงในระบบปลูก

3) การปลูกเชื้อ pathogen ลงในระบบ

นำเชื้อ *Pythium* spp. เลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นเจาะชิ้นวงเชื้อด้วย cork borer เบอร์ 2 และใส่ลงในอาหาร V8 broth และนำไปวางบนเครื่องเขย่าวันละ 8 ชั่วโมงเป็นเวลา 5 วัน จากนั้นเตรียม spore suspension ให้ได้ 5×10^6 sporangium/ml และใส่ลงในระบบปลูกพืช หลังจากใส่ BCA แล้ว 2 วัน ตามกรรมวิธีที่ระบุข้างต้น

4) การตรวจสอบเชื้อ BCA และเชื้อสาเหตุในระบบในระหว่างการทดลอง

เพื่อยืนยันอีกครั้งหนึ่งว่าเชื้อสาเหตุในแต่ละทรีทเมนต์ยังมีปริมาณเท่าเดิมอยู่หรือไม่ ดังนั้นจึงมีการนำสารละลายในแต่ละกรรมวิธีมาแยกเชื้อ BCA และเชื้อสาเหตุ เมื่อสิ้นสุดการทดลอง โดยใช้อาหาร Martin's medium และ selective media เพื่อตรวจนับเชื้อ BCA และเชื้อสาเหตุตามลำดับ

การบันทึกผลและการเก็บข้อมูล

1. ข้อมูลทางด้านโรค

- 1.1 บันทึกอาการโรคหลังจากทำการปลูกเชื้อ 1, 2, 4, 11 และ 21 วัน
- 1.2 บันทึกความยู่รอดของเชื้อสาเหตุโรคและเชื้อราปฏิปักษ์

2. ข้อมูลทางด้านพืช

- 2.1 การเจริญเติบโต (วัดทุกสัปดาห์และที่วันเก็บเกี่ยว)
 - 2.1.1 จำนวนใบแท้
 - 2.1.2 ความกว้าง และความยาวของใบ
 - 2.1.3 ความสูงของต้น
 - 2.1.4 Leaf SPAD value
- 2.2 ผลผลิต (เก็บเมื่ออายุ 6 สัปดาห์) โดยชั่งน้ำหนักสดต้นและราก ความยาวราก

3. ข้อมูลทางสภาพแวดล้อม

- 3.1 คุณสมบัติของสารละลาย (EC, pH, อุณหภูมิ) ทำการตรวจวัดทุกวัน
- 3.2 ความเข้มแสง อุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์ในโรงเรือน

4. วิเคราะห์ผลทางสถิติ



ภาพที่ 4.1 ลักษณะโรงเรือนและระบบ DRFT ที่ใช้ทดสอบประสิทธิภาพร่วมของเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อราปฏิปักษ์เขตรากพืชชนิดใหม่จากระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน (new indigenous antagonist) ในการควบคุมโรครากเน่าของผักสลัด

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการทดลองไม่พบความผิดปกติที่รากในทุกกรรมวิธี ของวันแรกหลังจากมีการปลูกเชื้อ *Pythium* spp. จากนั้นพืชในกรรมวิธีที่มีการปลูกเชื้อ *Pythium* spp. เริ่มแสดงความผิดปกติที่รากเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนกระทั่งวันที่ 21 หลังจากปลูกเชื้อสาเหตุโรคจะพบความผิดปกติอย่างชัดเจนที่ราก ได้แก่ รากเปลี่ยนสี รากเป็นแผล ในผักสลัดที่ได้รับการปลูกเชื้อ *Pythium* spp. เมื่อเปรียบเทียบกับพืชปกติ (ตารางที่ 4.1)

สำหรับการใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ (KUKL205) เพียงอย่างเดียว (T1) ให้ผลในการลดความรุนแรงของโรคได้ดีไม่แตกต่างทางสถิติจากกรรมวิธีที่มีการใช้ร่วมกับเชื้อราปฏิปักษ์ 3 ไอโซเลท (T2, T3, T4) แต่ดีกว่ากรรมวิธีที่มีการปลูกเชื้อสาเหตุเพียงอย่างเดียว (T5: Inoculated control) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4.1 ภาพที่ 4.2) ดังนั้น แสดงให้เห็นว่า การใช้ร่วมกันของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์และเชื้อราปฏิปักษ์อีก 3 ไอโซเลท ไม่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเพิ่มขึ้น (synergistic effect) แต่อย่างใด

ภาพที่ 4.3 แสดงให้เห็นว่าเชื้อสาเหตุโรคสามารถอาศัยและอยู่รอดได้ที่รากของพืช (ในวันเก็บเกี่ยว) ในทุกกรรมวิธีที่มีการปลูกเชื้อสาเหตุลงไป และปริมาณการอยู่รอดดังกล่าวจะสูงที่สุดในกรรมวิธีที่มีการปลูกเชื้อสาเหตุ (T5: Inoculated control) ในขณะที่ปริมาณการอยู่รอดของเชื้อสาเหตุโรคต่ำสุดพบในกรรมวิธี T3 (KUKL205 + antagonistic fungus A018) สำหรับการอยู่รอดของเชื้อราปฏิปักษ์ พบว่าเชื้อราปฏิปักษ์ ทั้ง 3 ชนิด สามารถอยู่รอดได้ที่รากพืชได้จนถึงวันเก็บ

เกี่ยว โดยเชื้อราปฏิปักษ์ A018 ถูกตรวจพบในปริมาณสูงที่สุด จากผลดังกล่าวข้างต้น น่าจะสนับสนุนการที่ T3 มีความรุนแรงของโรคต่ำเมื่อเทียบกับ inoculated control การตรวจพบความสามารถในการอยู่รอดของเชื้อราปฏิปักษ์ ที่รากพืชในวันเก็บเกี่ยวในครั้งนี้สอดคล้องกับงานวิจัยที่รายงานไว้ว่า เชื้อ *Trichoderma* sp. ถึงแม้จะถูกใส่ลงในสารละลายธาตุอาหารพืช แต่ยังสามารถเข้าครอบครองรากพืชได้เป็นอย่างดี ได้แก่ รากของ *Cucumis sativus* L. (Yedidia *et al.*, 1999), *Brassica campestris* L. var. *chinensis* (Pariyaporn and Jaenaksorn, 2007) และ *Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC. (Jaenaksorn and Rachniyom, 2008) แต่อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ว่าเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์จะสามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ที่รากพืชและในสารละลายที่ธาตุอาหารพืช จนถึงวันเก็บเกี่ยว แต่ในด้านของการนำมาใช้ในการป้องกันกำจัดโรคพืช ยังคงต้องคำนึงถึงปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ที่มีอยู่ในระบบบางช่วงอาจไม่เพียงพอต่อการควบคุมโรค ทั้งนี้ก็ต้องมีการศึกษาอาการของพืชควบคู่กันไป และอาจต้องใส่จุลินทรีย์ปฏิปักษ์เพิ่มเข้าไปในระบบในกรณีที่เชื้อสาเหตุโรคทำให้พืชแสดงอาการของโรครุนแรงขึ้น ดังรายงานของ Chatterton *et al.* (2004) ที่กล่าวว่า เชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas chlororaphis* ที่รากพืชต้องมีปริมาณ 10^5 CFU/g จึงจะสามารถควบคุมโรครากเน่าของพริกหวาน (*Capsicum annuum*) ที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* และ *P. dissotocum* ในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินได้

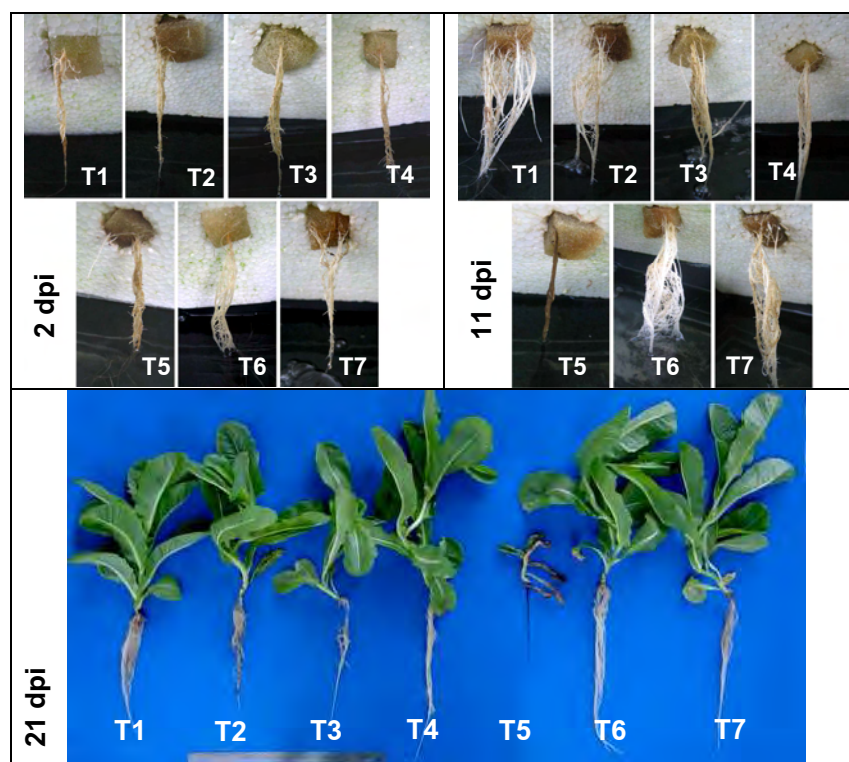
ภาพที่ 4.4 แสดงการเจริญเติบโตของผักสลัด Cos ทุกกรรมวิธีในระบบ DRFT สำหรับด้านการเจริญเติบโตและผลผลิตของพืชดังกล่าว โดยเฉพาะน้ำหนักสดของต้น ผลการทดลองเป็นที่น่าแปลกใจอย่างยิ่งซึ่งไม่สอดคล้องกับผลทางด้านโรค กล่าวคือ ใน T3 (KUKL205 + antagonistic fungus A018) ซึ่งพืชแสดงความรุนแรงของโรคต่ำกลับให้ผลผลิตไม่ดีและต่ำกว่า inoculated control ในทางตรงข้ามเชื้อราปฏิปักษ์ A003 เมื่อใช้ร่วมกับเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ KUKL205 (T2) ให้ผลน้ำหนักสดของต้นสูงกว่ากรรมวิธีที่ใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์เพียงอย่างเดียว (T1) (ตารางที่ 4.2) ดังนั้น จะเห็นได้ว่า synergistic effect ของเชื้อปฏิปักษ์ 2 ชนิด ต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตของผักสลัดไม่แน่นอน ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อราปฏิปักษ์ ส่วนค่า leaf SPAD พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติในทุกกรรมวิธี

ตารางที่ 4.1 ประสิทธิภาพร่วมของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราเขตรากพืชชนิดใหม่จากระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินต่อความรุนแรงของโรครากเน่าของผักสลัด Cos ที่ปลูกในระบบ mini-DRFT

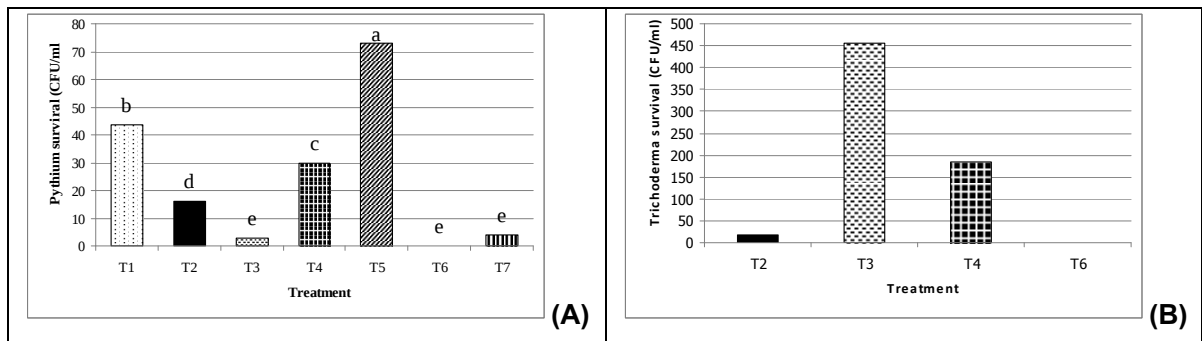
Treatment	Disease severity ^{1/}				
	1 dpi	2 dpi	4 dpi	11 dpi	21 dpi (at harvest)
T1 (KUKL205-seed treatment)	0.80ab ²	1.90b	1.90b	2.20ab	1.30ab
T2 (KUKL205-seed treatment + A003 in NS)	1.00ab	1.80b	1.80b	1.40ab	1.10ab
T3 (KUKL205-seed treatment + A018 in NS)	0.80ab	1.40b	1.90b	2.60ab	1.90b
T4 (KUKL205-seed treatment + A019 in NS)	1.20ab	1.20b	1.40ab	2.80ab	1.80b
T5 (Inoculated control)	1.80b	2.00b	2.50b	3.30b	3.80c
T6 (Healthy control)	0.20a	0.00a	0.00a	0.00a	0.00a
T7 (SP007s-seed treatment)	1.40ab	1.50b	1.90b	2.30ab	1.20ab
CV (%)	74.85	41.49	57.53	57.27	44.59

^{1/} Disease index rated as 0 = healthy root, 1 = 1-20% diseased roots, 2 = 21-40% diseased roots, 3 = 41-60% diseased roots, 4 = 61-80% diseased roots, and 5 = 100% diseased roots and rot.

^{2/} Means within the column followed by the same letter are not significantly different at probability level 0.05 by Duncan's Multiple Range Test.



ภาพที่ 4.2 ผักสลัด Cos แสดงอาการรากเน่าที่เกิดจากเชื้อ *Pythium* spp. ในวันที่ 2, 11 และ 21 หลังจากปลูกเชื้อสาเหตุโรค



Each bar labeled by the same letter is not significantly different according to DMRT ($P < 0.01$).

ภาพที่ 4.3 ความอยู่รอดของเชื้อ *Pythium* (A) และ เชื้อราปฏิปักษ์ (B) ที่รากผักสลัด Cos ในวันเก็บเกี่ยว



ภาพที่ 4.4 แสดงการเจริญเติบโตของผักสลัด Cos ในระบบ DRFT

ตารางที่ 4.2 การเจริญเติบโตและผลผลิตของผักสลัด Cos เมื่อเก็บเกี่ยว (อายุ 42 วัน)

Treatment	Leaf number (No.)	Leaf area ^{2/} (cm ²)	Leaf SPAD value	Shoot fresh wt. (g)	Root length (cm)	Root wt. (g)
T1	10.6abc ^{1/}	108.68a	38.52ab	32.50c	22.44b	2.17b
T2	12.0a	80.80ab	40.81a	39.50b	30.89a	3.45a
T3	8.1c	61.62ab	38.52ab	18.12e	22.65b	1.41c
T4	8.5bc	46.94b	39.15ab	22.55de	13.74c	1.52c
T5	12.0a	74.90ab	37.50ab	26.36d	16.05c	1.98bc
T6	12.5a	111.02a	37.64ab	45.75a	29.01a	3.31a
T7	11.3ab	92.35ab	36.59a	22.25de	24.85b	2.26b
CV (%)	19.10	45.85	6.79	13.00	11.61	18.11

^{1/} Means within the column followed by the same letter are not significantly different at probability level 0.05 by Duncan's Multiple Range Test. ^{2/} Leaf area of the biggest leaf.

สรุปผลการทดลอง

จากวัตถุประสงค์ของการทดลองในส่วนนี้ เพื่อพัฒนาประสิทธิภาพการควบคุมโรค Pythium root rot โดยชีววิธีให้สูงขึ้น จึงได้นำเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อราเขตรากพืชชนิดใหม่ (new obtained indigenous antagonists) ที่ได้รับผลดีจากการทดลองที่ 2 และ 3 ได้แก่ KUKL205 และ เชื้อราปฏิปักษ์ 3 ไอโซเลท มาใช้ร่วมกันเพื่อประเมินประสิทธิภาพร่วม (synergistic effect) ของจุลินทรีย์เขตรากพืชดังกล่าว ในระบบ DRFT พบว่า ผลไม่เป็นไปตามสมมุติฐานที่ตั้งไว้ กล่าวคือ การใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ (KUKL205) คลุกเมล็ดเพียงอย่างเดียว (T1) ให้ผลในการลดความรุนแรงของโรคได้ดีแต่ไม่แตกต่างทางสถิติจากกรรมวิธีที่มีการใช้ร่วมกับเชื้อราปฏิปักษ์อีก 3 ไอโซเลท (T2, T3, T4) ดังนั้น แสดงให้เห็นว่า การใช้ร่วมกันของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์และเชื้อราปฏิปักษ์อีก 3 ไอโซเลท ไม่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเพิ่มขึ้น (synergistic effect) แต่อย่างไรก็ตาม สำหรับด้านการเจริญเติบโตของพืช ผลที่ได้ไม่สอดคล้องกับประสิทธิภาพในการควบคุมโรค อีกทั้งผลผลิตที่ได้รับแปรปรวน กล่าวคือ ในกรรมวิธีที่ใช้ KUKL205 ร่วมกับเชื้อราปฏิปักษ์ A003 (T2) ผลผลิตสูงกว่าใช้ KUKL205 เพียงอย่างเดียว ในทางกลับกันเมื่อใช้ KUKL205 ร่วมกับเชื้อราปฏิปักษ์ A018 และ A019 ผลผลิตลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับการใช้ KUKL205 เพียงอย่างเดียว จึงเห็นได้ว่าการนำจุลินทรีย์หลายชนิดมาใช้ร่วมกัน พบข้อจำกัด

5. รายละเอียดของเชื้อจุลินทรีย์เขตรากพืชที่เป็นประโยชน์ในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินที่ได้จากโครงการวิจัย

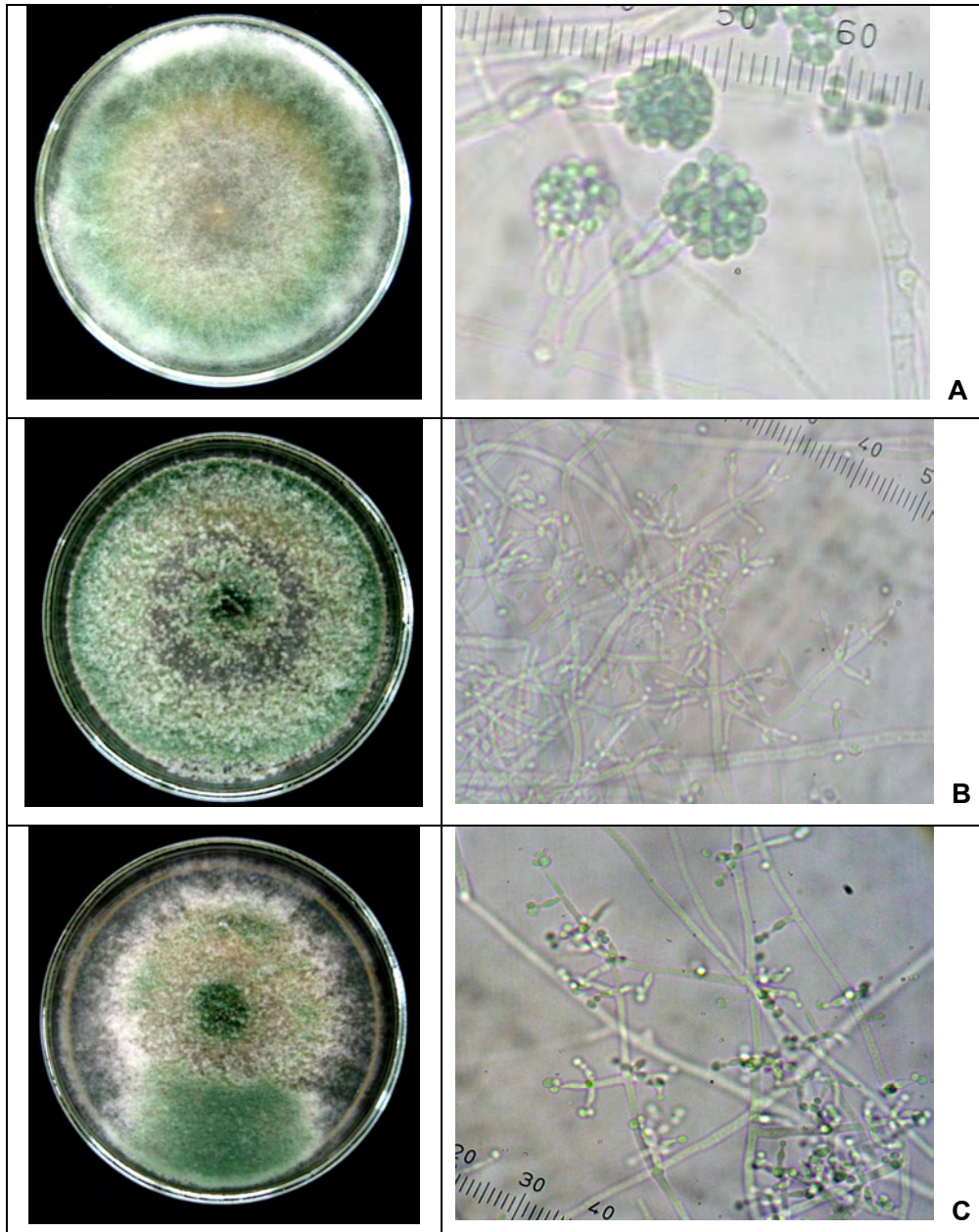
จากโครงการวิจัยนี้ ผลลัพธ์ที่ได้คือ เชื้อจุลินทรีย์เขตรากพืชที่เป็นประโยชน์ซึ่งแยกได้จากระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินและได้ผ่านการทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรครากเน่าของผักสลัดที่เกิดจากเชื้อ *Pythium* spp. ทั้งในสภาพห้องปฏิบัติการและในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน และทำการจัดจำแนกเชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าวตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมี

ผลการทดลอง

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



ภาพที่ 5.1 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียเขตรากพืชในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน *Bacillus* sp. KUKL205 บนอาหาร NA



ภาพที่ 5.2 ลักษณะโคโลนีและลักษณะโครงสร้างของเชื้อราเขตรากพืชที่ในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน ที่กำลังขยาย 400 เท่า (A) *Gliocladium* sp. A003 (B และ C) *Trichoderma harzianum* A018 และ 019 ตามลำดับ เลี้ยงบนอาหาร PDA

สรุปและข้อเสนอแนะ

จากการทดลองในส่วนแรก เป็นการสำรวจโรครากเน่าของผักสลัด การประเมินประสิทธิภาพในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินของชีวผลิตภัณฑ์ราและแบคทีเรียเขตรากพืชที่ใช้ในดินที่ผ่านการเผยแพร่แล้ว พบว่าเชื้อสาเหตุโรค *Pythium* spp. สามารถทำให้เกิดโรครากเน่ากับผักสลัดได้ทุกสายพันธุ์ แต่ผักสลัด Cos จะแสดงอาการโรคได้รุนแรงที่สุด จากการทดลองในส่วนนี้ได้มีการสรุประดับความรุนแรงของโรคไว้เพื่อใช้เป็นมาตรฐานในการวัดระดับของโรคนี้ในการทดลองอื่นๆ ต่อไป ดังนี้ 0 = รากมีสีขาวปกติ (0%), 1 = รากพืชถูกทำลายบางส่วน เป็นสีน้ำตาลเล็กน้อยบริเวณปลายราก (25%), 2 = ประมาณครึ่งหนึ่งของรากถูกทำลาย รากกุดและเน่าเป็นสีน้ำตาล (50%), 3 = รากพืชส่วนใหญ่ถูกทำลาย กุดและเน่าเป็นสีน้ำตาลเกือบหมด (75%) และ 4 = รากพืชทั้งหมดถูกทำลาย รากกุดสั้นและเน่าเป็นสีน้ำตาลเกือบหมด (100%) สำหรับการประเมินประสิทธิภาพชีวผลิตภัณฑ์รา (biocontrol products) ที่มีจำหน่ายในท้องตลาด ในการควบคุมโรครากเน่าของผักสลัดในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน พบว่าชีวผลิตภัณฑ์ราที่จำหน่ายในท้องตลาดทั้ง 4 ชนิด ไม่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรครากเน่าของผักสลัดที่เกิดจากเชื้อ *Pythium* spp. อีกทั้งไม่ส่งผลดีต่อการเจริญเติบโตของพืชดังกล่าว ซึ่งขัดแย้งกับงานวิจัยที่ผ่านมาที่ทดสอบกับพืชผักชนิดอื่นและปลูกในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินที่ต่างกัน ทั้งนี้อาจมีสาเหตุจาก 1) ความเฉพาะเจาะจงระหว่างเชื้อ BCA กับ พืช 2) ระบบ NFT ไม่สามารถรักษาระดับของ BCA ให้คงที่และสูงเพียงพอที่จะควบคุมโรคเมื่อเทียบกับระบบ DFT 3) รูปแบบของชีวผลิตภัณฑ์ดังกล่าวไม่เอื้อหรือเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในระบบ NFT โดยเฉพาะชีวผลิตภัณฑ์รูปแบบผง (WP) จะไปเกาะติดที่ผิวรากพืช ทำให้ขัดขวางการดูดซึมธาตุอาหารของรากพืช 4) คุณภาพของชีวผลิตภัณฑ์ ก็น่าจะมีผลต่อการทดสอบประสิทธิภาพในครั้งนี้ เพราะผลจากการตรวจสอบ (monitoring) ความอยู่รอด (survival) ของเชื้อจากชีวผลิตภัณฑ์เริ่มแรกเมื่อใส่ลงในระบบปลูก พบว่าความมีชีวิตอยู่รอดของเชื้อแทบจะไม่มีอยู่เลยหรือค่อนข้างต่ำมากเมื่อเทียบกับข้อมูลที่ระบุไว้บนฉลากของชีวผลิตภัณฑ์นั้นๆ แต่อย่างไรก็ตาม ในระหว่างการปลูกพืชกลับตรวจพบปริมาณความมีชีวิตอยู่รอดของเชื้อในระบบ (ในสารละลายธาตุอาหารพืช) สูงขึ้น อีกทั้งยังตรวจพบว่าเชื้อดังกล่าวสามารถเจริญเข้าครอบครองรากพืชได้ด้วยแม้ว่าไม่ได้มีการใส่ชีวผลิตภัณฑ์ที่รากโดยตรง เพียงแต่ใส่ชีวผลิตภัณฑ์ลงในสารละลายธาตุอาหารพืชเท่านั้น ส่วนสายพันธุ์แบคทีเรียเขตรากพืชที่ได้รับการเผยแพร่แล้ว เมื่อนำมาประเมินประสิทธิภาพในการควบคุมโรครากเน่าของผักสลัดในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน พบว่าการใช้แบคทีเรียเขตรากพืช (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) ในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน มีบทบาทที่สำคัญต่อประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณท์ การใช้ PGPR โดยใส่ลงในสารละลายธาตุอาหารพืชโดยตรง พบว่า ไม่ให้ผลเป็นที่น่าพอใจในการควบคุมโรค *Pythium* root rot ของผักสลัด อีกทั้งแทบจะไม่พบปริมาณความอยู่รอดของ PGPR ในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน ส่วนการคลุกเมล็ดด้วย PGPR ก่อนปลูก พบว่า ให้ผลดีต่อการงอกของเมล็ดและการเจริญเติบโตของกล้าผักสลัด green oak ในสภาพห้องปฏิบัติการ อีกทั้งการใช้ PGPR คลุกเมล็ดควบคู่กับการใส่ลงในสารละลายธาตุอาหารพืชโดยตรงจะให้ผลดีที่สุดในการลดเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค (disease incidence) และเพิ่มการเจริญเติบโตของพืชด้วย

จากการทดลองในส่วนที่ 2 และ 3 ซึ่งเป็นการหาสายพันธุ์เชื้อจุลินทรีย์เขตรากพืชชนิดใหม่ในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน (Indigenous antagonistic microorganisms) ที่มีศักยภาพในการควบคุมโรครากเน่าในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินนั้น พบว่า เชื้อราเขตรากพืช 3 ไอโซเลท (A003, A018 และ A019) จากจำนวน 60 ไอโซเลทที่แยกได้จากแหล่งต่างๆ ของระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคในสภาพห้องปฏิบัติการได้ดี และลดความรุนแรงของโรค Pythium root rot ของผักสลัดได้ในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน อีกทั้งยังสนับสนุนการเจริญเติบโตของพืชได้ดีไม่แตกต่างกับพืชปกติ สำหรับการสำรวจ รวบรวมและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียเขตรากพืช ซึ่งได้มาเป็นจำนวน 468 ไอโซเลท จากแหล่งต่างๆ ของระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน พบว่า เชื้อแบคทีเรีย จำนวน 9 ไอโซเลท มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรค โดยมีไอโซเลท KUKL205 ที่แยกได้จากใบสาระแนมีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงสุดถึง 87.9 เปอร์เซ็นต์ สำหรับประสิทธิภาพในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน โดยประเมินเปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตที่ได้รับการเผยแพร่แล้ว (SP007s) พบว่าการคลุกเมล็ดด้วย KUKL205 สามารถลดความรุนแรงของโรค (disease severity) ได้ เมื่อเปรียบเทียบกับพืชที่ไม่ได้มีการคลุกเมล็ดและมีการปลูกเชื้อ (Inoculated control) แต่อย่างไรก็ตามผลของการคลุกเมล็ดด้วยแบคทีเรียเขตรากพืชไม่ได้ดีไปกว่าพืชปกติ ในการทดลองส่วนนี้ ได้มีการตรวจสอบการชักนำให้เกิดความต้านทานโดยใช้ PGPR (KUKL205) พบว่า การสะสมเอนไซม์ β -1, 3-glucanase พบว่าผลเป็นไปในทิศทางเดียวกับการเกิดโรค ในกรณีของพืชที่ได้รับการคลุกเมล็ดด้วยแบคทีเรียเขตรากพืชทั้งสองชนิด (KUKL205 และ SP007s) และมีการปลูกเชื้อสาเหตุโรคจะแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ดังกล่าวสูงกว่าพืชที่มีการปลูกเชื้อสาเหตุโรคเพียงอย่างเดียว

สำหรับการทดลองในส่วนที่ 4 จากวัตถุประสงค์ของการทดลองในส่วนนี้ เพื่อพัฒนาประสิทธิภาพการควบคุมโรค Pythium root rot โดยชีววิธีให้สูงขึ้น จึงได้นำเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อราเขตรากพืชชนิดใหม่ (new obtained indigenous antagonists) ที่ได้รับผลดีจากการทดลองที่ 2 และ 3 ได้แก่ KUKL205 และเชื้อราปฏิปักษ์เขตรากพืช 3 ไอโซเลท มาใช้ร่วมกันเพื่อประเมินประสิทธิภาพร่วม (synergistic effect) ของจุลินทรีย์เขตรากพืชดังกล่าว ในระบบ DRFT พบว่า ผลไม่เป็นไปตามสมมุติฐานที่ตั้งไว้ กล่าวคือ การใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ (KUKL205) คลุกเมล็ดเพียงอย่างเดียว (T1) ให้ผลในการลดความรุนแรงของโรคได้ดีแต่ไม่แตกต่างทางสถิติจากกรรมวิธีที่มีการใช้ร่วมกับเชื้อราปฏิปักษ์อีก 3 ไอโซเลท (T2, T3, T4) ดังนั้น แสดงให้เห็นว่า 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

โดยภาพรวมมีข้อสรุปและเสนอแนะเพิ่มเติมดังนี้ การทำงานวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ในการพัฒนาผลผลิตของผักในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน โดยมุ่งเน้นไปที่การควบคุมโรค *Pythium root rot* ของผักสลัด (*Lactuca sativa* L.) ซึ่งในแต่ละการทดลองย่อยได้ทดสอบกับผักสลัดหลายสายพันธุ์ ได้แก่ Cos, Green oak, Red oak, Butterhead ตามความเหมาะสมของแต่ละการทดลองในช่วงนั้น ผลการทดลองที่ได้ในแต่ละส่วนของงานวิจัยนี้ ได้มีการทดลองซ้ำหลายครั้ง เนื่องจากพบความแปรปรวนของผลการทดลองอันได้แก่ พืชในกรรมวิธีที่มีการปลูกเชื้อสาเหตุโรคอย่างเดียว ไม่แสดงอาการเป็นโรคอย่างสมบูรณ์และความรุนแรงของโรคไม่สม่ำเสมอในทุกการทดลอง ซึ่งเป็นปัญหาในการประเมินประสิทธิภาพเชื้อจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ในการควบคุมโรค จากการสังเกตพบว่า สาเหตุที่ทำให้ความรุนแรงของโรคไม่สม่ำเสมอเป็นผลมาจากสภาพแวดล้อม โดยเฉพาะอย่างยิ่งอุณหภูมิในสารละลายธาตุอาหาร ถ้าอุณหภูมิในสารละลายสูงกว่า 30 องศาเซลเซียส ความรุนแรงของโรคจะสูง ในขณะที่ถ้าอุณหภูมิในสารละลายอยู่ในช่วง 25-28 องศาเซลเซียส (ได้แก่ การปลูกในโรงเรือนที่มี evaporative cooling system, หรือปลูกกลางแจ้งในช่วงฤดูหนาว) ความรุนแรงของโรคจะลดลงจะอยู่ในระดับต่ำ ดังนั้นจะเห็นได้ว่า การนำวิธีควบคุมโรคโดยชีววิธีมาใช้ในการควบคุมโรค *Pythium root rot* ของผักสลัดนี้ ควรคำนึงถึงวิธีการจัดการกับสภาพแวดล้อมต่างๆ ให้ไม่เหมาะสมหรือสนับสนุนต่อการเกิดโรค อันได้แก่ อุณหภูมิของสารละลายธาตุอาหารปลูก ดังที่กล่าวมาข้างต้น ซึ่งน่าจะส่งผลให้มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคได้ดียิ่งขึ้น จากงานวิจัยนี้ เชื้อจุลินทรีย์เขตรากพืชที่เป็นผลลัพธ์มาจากการทดลอง ได้แก่ เชื้อแบคทีเรียเขตรากพืชที่เป็นประโยชน์ *Bacillus* sp. KUKL205 และเชื้อราปฏิปักษ์เขตรากพืช 3 ไอโซเลท (*Trichoderma harzianum* 2 ไอโซเลท และ *Gliocladium* sp. 1 ไอโซเลท) แสดงประสิทธิภาพในการควบคุมโรค *Pythium root rot* เป็นที่น่าพอใจระดับหนึ่ง ในด้านการพัฒนารูปแบบของเชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าว เพื่อนำไปใช้ในทางการค้าต่อไปนั้น ยังมีข้อจำกัดอยู่ที่ประสิทธิภาพไม่โดดเด่นมากนัก อีกทั้งจากการทดลองพอสรุปได้ว่า การใช้เชื้อราปฏิปักษ์ในรูปผงละลายน้ำ พบว่ามีข้อด้อยหลายประการ โดยเฉพาะสาร adjuvant ในชีวิตผลิตภัณฑ์จะไปเกาะติดที่รากพืชมากจนทำให้พืชขาดออกซิเจนและเน่าในที่สุด จากการทดลองหลายการทดลองชี้ให้เห็นว่าการใช้เชื้อราปฏิปักษ์ในรูป spore suspension ใส่ลงในสารละลายธาตุอาหารจะส่งผลดี สำหรับกรณีเชื้อแบคทีเรียเขตรากพืชนั้น วิธีที่เหมาะสมที่สุดคือ การคลุกเมล็ดด้วยเชื้อสดก่อนปลูกจะให้ผลดี และสิ่งสำคัญอีกประการหนึ่งในการใช้จุลินทรีย์ดังกล่าวคือ ปริมาณและช่วงชีวิตอยู่รอดของเชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าวในระบบต้องสูงและเพียงพอในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรค ดังนั้นจึงควรใส่เชื้อจุลินทรีย์เพิ่มเป็นช่วงๆ ในระหว่างการปลูกผักสลัด

นอกจากนี้เป็นที่น่าสังเกตว่า นอกจากจุลินทรีย์เขตรากพืชที่ตรวจพบและได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคแล้วดังกล่าวข้างต้น ยังมีการตรวจพบ non-pathogenic *Pythium* เป็นประจำในระบบปลูกพืชผักโดยไม่ใช้ดินที่ใช้สารละลายธาตุอาหารพืชหมุนเวียน ซึ่งน่าจะมีการนำ

เชื้อ non-pathogenic Pythium เหล่านี้มาศึกษาเพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาและใช้ประโยชน์
ควบคู่กับเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เขตรากพืชตัวอื่นๆ ต่อไป

บรรณานุกรม

- จิระเดช แจ่มสว่าง, วนิดา พงษ์ศักดิ์ชาติ และวรรณวิไล เกษนรา. 2534. การตรวจนับปริมาณเชื้อ *Pythium aphanidermatum* ในดิน โดยวิธีเจือจางดินและการใช้เหยื่อล่อ. วิทยาศาสตร์เกษตรศาสตร์ 25: 39-46.
- แพรวทอง ละมุน, จิระเดช แจ่มสว่าง, วรรณวิไล อินธนู และธรรมศักดิ์ ทองเกตุ. 2548. การใช้เชื้อรา *Trichoderma harzianum* ในการควบคุมเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* สาเหตุโรครากเน่าของผักกาดหอมที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์. หน้า 170. ใน รายงานการประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 5 (บทคัดย่อ). กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.
- สุพจน์ กาเซ็ม. 2545. การจำแนกชนิดและคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะที่แยกจากผิวใบและดินบริเวณรากถั่วเหลืองที่สามารถควบคุมโรคใบจุดบนของถั่วเหลือง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Benoit, F. 1992. Practical guide for simple soilless culture techniques. Sint-Katelijne-Waver: European Vegetable R&D Center. 22 p.
- Buensanteai, N., G.Y. Yuen and S. Prathuangwong. 2009. Priming, signaling, and protein production associated with induced resistance by *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46. World Journal of Microbiology and Biotechnology 25(7): 1275-1286.
- Chatterton, S., J.C. Sutton and G.J. Boland. 2004. Timing *Pseudomonas chlororaphis* applications to control *Pythium aphanidermatum*, *Pythium dissotocum*, and root rot in hydroponic peppers. Biological control 30: 360-373.
- Chen, C., R.R. Bélanger, N. Benhamou and T.C. Paulitz. 2000. Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and *Pythium aphanidermatum*. Physiological and Molecular Plant Pathology 56(1): 13-23.
- Jaenaksorn, T. and H. Rachniyom. 2008. Effectiveness of soluble silicon and biological control agents for management of *Pythium* root rot of hydroponically-grown kale (*Brassica oleracea* L. var. acephala DC.). The 9th International Congress of Plant Pathology, August 24-29, 2008 Torino, Italy.
- Jaenaksorn, T., P. Koohakan and S. Prathuangwong. 2010. Bacterial antagonists increase growth promotion and natural defense response of lettuce (*Lactuca sativa* L.) under hydroponics. Proceedings of the 12th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria. Parc des Expositions et des Congres de Saint-Denis, Ile de la Reunion, France. June 7-11, 2010. (p 140).

- Kleifeld, O. and I. Chet. 1992. *Trichoderma harzianum* interaction with plant and effects on growth response. *Plant and Soil* 144(3): 267-272.
- Koohakan, P. and I. Nantagij. 2005. Efficiency of some biological control products for controlling root rot of lettuce grown in hydroponics. *Agricultural Science Journal* 36(5-6): 1191-1194. (In Thai)
- Pan, S.Q., X.S. Ye and J. Ku. 1991 Association of β -1,3-glucanase activity and isoform pattern with systemic resistance to blue mould in tobacco induced by stem injection with *Peronospora tabacina* or leaf inoculation with tobacco mosaic virus. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 39(1): 25–39.
- Pariyaporn, T. and T. Jaenaksorn. 2007. Antagonistic bioproduct: Survival and their effect on growth of Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. var. *chinensis*) in deep flow technique. *King Mongkut's Agricultural Journal* 25(3): 27-38. (In Thai)
- Postma, J., Willemsen-de Klein, M.J.E.I.M. and van Elsas, J.D. 2000. Effect of indigenous microflora on the development of root and crown rot caused by *Pythium aphanidermatum* in cucumber grown on rockwool. *Phytopathology* 90: 125-133.
- Prathuangwong, S and N. Buensanteai. 2007. *Bacillus amyloliquefaciens* induced systemic resistance against bacterial pustule pathogen with increased phenols, peroxides, and 1, 3-b-glucanase in soybean plant. *Acta Phytopathol et Entomol Hungarica* 42: 321–330
- Rachniyom, H. and T. Jaenaksorn. 2007. Formulation of antagonistic bio-product: Survival, potential and their effect on growth of kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC.) in deep flow technique. *Proceedings of the 8th National Plant Protection Conference* 157-171. (In Thai)
- Runia, W.Th. 1995. A review of possibilities for disinfection of recirculation water from soilless cultures. *Acta Horticulturae* 382: 221-229.
- Stanghellini, M.E. and Rasmussen, S.L. 1994. Hydroponics: A solution for zoosporic pathogens. *Plant Disease* 78: 1129-1138.
- Thinggaard, K. 1988. Biological control of root pathogenic fungi by *Trichoderma*. *Acta Horticulturae* 211(4): 20.
- Thinggaard, K. 1989. Biological control of root pathogenic fungi by *Trichoderma*: Interrelationships between microorganisms and plants in soil. *Proceedings of an International Symposium, Liblice, Czechoslovakia*

- Tu, J.C., Papadopoulos, A.P., Hao, X. and Zhen, J. 1999. The relationship of *Pythium* root rot and rhizosphere microorganisms in a closed recirculating and open system in rockwool culture of tomato. *Acta Horticulturae* 481: 577-583.
- Weller, D.M. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Ann. Rev. Phytopathol.* 26: 379-407
- Yedidia, I., Benhamou, N. and Chet, J. 1999. Induction of defense response in Cucumber plants (*Cucumis sativa* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Applied and Environmental Microbiology* 65(3): 1061-1070.
- Zinnen, T.M. 1988. Assessment of plant diseases in hydroponic culture. *Plant Disease* 72 (2): 96-99.

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

มีการนำผลของงานวิจัยไปเผยแพร่และเสนอแนะอย่างไม่เป็นทางการกับผู้ประกอบการผลิตผักไฮโดรโปนิกส์ รวมทั้งได้มีการรับฟังความคิดเห็นและคำวิจารณ์ ถึงความเป็นไปได้ในการนำไปใช้ประโยชน์

ในด้านวิชาการ คณะผู้วิจัยได้นำผลงานวิจัยนี้ไปเป็นองค์ความรู้ใหม่ใช้ประกอบการเรียนการสอนให้กับนักศึกษาระดับปริญญาตรีและปริญญาโท ที่คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และ คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และยังสามารถใช้เป็นข้อมูลเพื่อใช้ในการวิจัยและพัฒนาต่อยอดต่อไป ให้แก่นักศึกษาระดับปริญญาเอก

2. การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ

Jaenaksorn, T., P. Koohakan and S. Pratuangwong. 2010. Bacterial antagonists increase growth promotion and natural defense response of lettuce (*Lactuca sativa* L.) under hydroponics. Proceedings of the 12th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria. Parc des Expositions et des Congres de Saint-Denis, Ile de la Reunion, France. June 7-11, 2010. (p 140).

Jaenaksorn, T., P. Koohakan and S. Prathuangwong. 2010. Test of four commercial bioproducts on Pythium root rot of hydroponically-grown Cos lettuce (*Lactuca sativa* L.). Proceedings of the 16th Asian Agricultural Symposium and 1st International Symposium on Agricultural Technology. Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok, Thailand. August 25-27, 2010. (p 667-670).

Jaenaksorn, T., P. Koohakan and S. Prathuangwong. 2010. Efficacy of indigenous Trichoderma and PGPR for controlling Pythium root rot of lettuce (*Lactuca sativa* L.) grown in deep flow Technique. Proceedings of the 16th Asian Agricultural Symposium and 1st International Symposium on Agricultural Technology. Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok, Thailand. August 25-27, 2010. (p 671-674).

ภาคผนวก



ICPPB 2010

Ile de la Réunion - June 7-11

Proceedings of the 12th International Conference on

PLANT PATHOGENIC BACTERIA

Parc des Expositions et des Congrès de Saint-Denis
Ile de la Réunion, France



Programme, Abstracts, List of participants



Thursday, June 10, Session 3 : Molecular Plant Pathogen Interactions & Plant Resistance

Chair : Subhadeep Chatterjee & Mari-Ann Newman

- Keynote talk**
- 9h00 K3-05 Bacterial Microbe Associated Molecular Patterns (MAMPs): elicitors of plant innate immunity
Newman M.-A.
- Session talks**
- 9h45 O3-22 The *Xanthomonas campestris* type III effector XopAC triggers vascular immunity in *Arabidopsis*
Guy E., Chabannes M., Hajri A., Genissel A., David P., Messad N., Boureau T., Poussier S., Arlat M. and L. D. Noël
- 10h05 O3-23 Hpa2, as a T3S Effector, is regulated by HrpG and required by HrpF for pathogenicity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* in rice, but not for hypersensitive response in tobacco
Yu-Rong Li, Yi-Zhou Che, Hua-Song Zou, Li-Fang Zou, Gong-You Chen, and Alan Collmer
- 10h25 Coffee break**
- 10h45 O3-24 The PecS global regulator is an important player in the regulatory network governing the coordinated expression of virulence genes during the interaction between *Dickeya dadantii* and *Arabidopsis*
Mehdibi N., Malfatti P., Gaubert S., Alunni B., Chapelle E., Reverchon S. and F. Van Gijsegem
- 11h05 O3-25 The dicarboxylate transport protein (KgtP) is required as a T3S effector for dicarboxylate utilization and full virulence by rice pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*
Liu X. L., Zou H. S., Zou L. F., Li Y. R. and G. Y. Chen
- 11h25 O3-26 *In planta* comparative gene expression profiling of *Ralstonia solanacearum* reveals primary physiology and new regulatory model for type three secretion during bacterial wilt pathogenesis
Jacobs J. M., Meng F., Babujee L., Milling A. and C. Allen
- 11h45 Posters**
- P4-65 The effect of plant extracts as seed treatment on the control of bacterial leaf spot of tomato caused by xanthomonads pathogens
Mbega E. R., Mortensen C. N., Mabagala R. B. and E. G. Wulff
- P4-66 Antagonistic activity of the rhizobacterial isolates and plant secondary metabolites towards plant pathogens from *Dickeya*, *Pectobacterium* and *Pseudomonas* genera
Jafra S., Potrykus M., Krzyzanowska D., Golanowska M., Taraszkiewicz A., Lojkowska E. and A. Krollicka
- P4-67 Endophytic *Methylobacterium* influences potato and pine disease resistance in cultivar- and treatment-specific manner by inducing changes in plant resident microbiota
Ardanov P., Sessitsch A., Häggman H., Kozyrovska N. and A. M. Pirttilä
- P4-68 David versus Goliath: understanding how plant pathogenic *Pseudomonas* resist invertebrate predators
Dorati F., Sanchez-Contreras M., Arnold D. L., Waterfield N. R. and R. W. Jackson
- P4-69 Characterization of bacteria isolated from rotten potato tissue exposing antagonistic activity towards *Dickeya solani*
Czajkowski R., Van Veen J. A. and J. M. Van der Wolf
- P4-70 Endophytic bacteria for suppressing banana blood disease bacterium
Hadiba N., Wibowo A., Widada J. and S. Subandiyah
- P4-71 *Pantoea agglomerans* biosafety for use in plant protection: genotypic and phenotypic comparison of biocontrol and clinical isolates
Rezzonico F., Bonaterra A., Badosa E., Smits T. H. M., Frey J. E., Montesinos E. and B. Duffy
- P4-72 Characterization of the antibacterial peptide herbicolin I biosynthetic operon in the fire blight biocontrol agent *Pantoea vagans* C9-1
Kamber T., Lansdell T. A., Smits T. H. M., Stockwell V. O., Ishimaru C. and B. Duffy
- P4-73 Pantocin A antibiotic produced by *Pantoea vagans* C9-1: Chemical and genetic characterization
Ishimaru C. A., Lansdell T. A., Gross J., Clardy J., Smits T. H. M. and B. Duffy
- P4-74 Bacterial antagonists increase growth promotion and natural defense response of lettuce (*Lactuca sativa* L.) under hydroponics
Jaenaksorn T., Koohakan P. and S. Pratuangwong
- P4-75 Bacterial canker of mango in Japan caused by yellow-pigmented strain of *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae*
Furuya N., Kinoshita K., Nishi N., Kurose D. and K. Tsuchiya
- P4-76 Bacterial shoot blight of mango (*Mangifera indica* L.) caused by *Erwinia chrysanthemi*
Tsuchiya K., Miyahira N., Takushi T., Kawano S. and N. Furuya

Bacterial antagonists increase growth promotion and natural defense response of lettuce (*Lactuca sativa* L.) under hydroponics

Jaenaksorn T.¹, Koohakan P.¹ and S. Pratuangwong²

¹Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Thailand; ²Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Thailand.

agrstdp@ku.ac.th, kjtanimn@kmitl.ac.th

The 468 strains of endophytic and epiphytic bacteria were isolated from recirculating hydroponic system. Of which, some strains were shown to be effective in inhibiting the *in vitro* growth of *Pythium* sp., a cause of root rot of lettuce. Percent inhibition was between 87.9 and 65.8 which strain KUKL205 showed the best potential equivalent to commercial strain *Pseudomonas fluorescens* SP007s in suppressing the target pathogen. The efficiency of seed treatment with tested antagonist bacteria significantly gave better results in terms of seed germination, shoot and root length compared to non-treated control. Seed treatment and mixed nutrient solution with each antagonist exhibited good protection against disease (86.2% reduction). The accumulation of β -1,3 glucanase, a defense-related enzyme was also greater in bacterial antagonist-treated plants compared to control. Based on biochemical and 16S rRNA-PCR characterization, strain KUKL205 obtained in this study was identified as *Bacillus* sp. To our knowledge, this is the first report of induced systemic resistance under hydroponics with plant growth promoting rhizobacteria.

References:

- 1 Chen *et al.*, 2000. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 56, 13-23.
 - 2 Pan *et al.*, 1991. *Physiol Mol Plant Pathol* 39, 25-39.
- Prathuangwong S. 2007. *Acta Phytopathol et Entomol Hungarica* 42: 321-330.

Keywords:

bacterial antagonist, endophytic and epiphytic bacteria, PGPR, lettuce, hydroponics

Bacterial antagonists increase growth promotion and natural defense response of lettuce (*Lactuca sativa* L.) under hydroponics

Jaenaksorn T.¹, Koohakan P.¹, Pratuangwong S.²

¹ Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Thailand.

² Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Thailand.

kjtanimn@kmitl.ac.th, agrsdp@ku.ac.th

The 468 strains of endophytic and epiphytic bacteria were isolated from recirculating hydroponic system. Of which, some strains were shown to be effective in inhibiting the *in vitro* growth of *Pythium* sp., a cause of root rot of lettuce. Percent inhibition was between 87.9 and 65.8 which strain KUKL205 showed the best potential equivalent to commercial strain *Pseudomonas fluorescens* SP007s in suppressing the target pathogen. The efficiency of seed treatment with tested antagonist bacteria significantly gave better results in terms of seed germination, shoot and root length compared to non-treated control. Seed treatment and mixed nutrient solution with each antagonist exhibited good protection against disease (86.2% reduction). The accumulation of β -1,3 glucanase, a defense-related enzyme was also greater in bacterial antagonist-treated plants compared to control. Based on biochemical and 16S rRNA-PCR characterization, strain KUKL205 obtained in this study was identified as *Bacillus* sp. To our knowledge, this is the first report of induced systemic resistance under hydroponics with plant growth promoting rhizobacteria.

Keywords: bacterial antagonist, endophytic and epiphytic bacteria, PGPR, lettuce, hydroponics

Introduction

Presently, *Pythium* causing root rot is a real problem in recirculating hydroponic systems. Biological-based approach to hydroponic cultivation may probably provide a helping hand in managing the root disease and maintaining a more sustainable and healthier hydroponic crop ecosystem. Therefore the objective of this study was first to evaluate the four reported-beneficial rhizosphere bacteria, having high antagonistic potential in suppressing important pathogens, for their biological control of *Pythium* root rot of lettuce (*Lactuca sativa* L.) in hydroponics compared with commercial product. Second, isolation, screening and evaluating the *in vitro* antagonistic ability of new indigenous endophytic and epiphytic bacteria from recirculating hydroponic system was conducted. Third, the most beneficial indigenous isolate was further evaluated in lab-scale hydroponics. Besides, β -1,3 glucanase, a defense-related enzyme was checked accordingly.

Materials and Methods

Evaluation of reported-rhizosphere bacteria for controlling *Pythium* root rot of lettuce in hydroponics

1. Evaluation of four reported-rhizosphere bacteria for controlling *Pythium* root rot of Cos grown in NFT

This experiment was aimed to determine whether the beneficial rhizosphere bacteria earlier reported to be the potential antagonists against several pathogens of soil-grown

crops (1, 2) could retard the disease of hydroponic crops. Therefore, the ability of *Bacillus amyloliquefaciens* (KPS46), *Paenibacillus pabuli* (SW01/4), *Pseudomonas fluorescens* (SP007s) and *B. lichiniformis* (SP009s) for controlling *Pythium* root rot of Cos grown in outdoor NFT was investigated. Treatments were arranged in CRD with three replications of 9 plants. The pH and EC of NS was monitored daily. Antagonists (OD 0.1, 120 ml) were applied directly into the NFT-nutrient solution at 2 days before inoculation with 5×10^5 sporangium / ml of *Pythium* sp. Disease severity and crop growth was weekly assessed. Besides, pathogen and BCAs survival as well as potential of antagonists was weekly monitored in NS while last check was made on root at harvest.

Results and Discussions

Regarding the NFT experiment, the pathogen-inoculated control significantly showed mushy and sad root system compared to the non inoculated control. Besides, the soft to slimy rotted portion of the root was easily separated from the inner core. Unexpectedly, diseases severity of lettuce in the treatments added with either the tested beneficial rhizosphere bacteria or bacterial bioproduct were not different from that in the pathogen-inoculated control (Table 1). Figure 1 revealed that pathogen survivals in NS of all tested treatments decreased sharply in the 1st-2nd wk. and continued to decrease till harvest. Surprisingly, the BCAs survival could hardly be detected either from nutrient solution or root. To sum up, the all tested BCAs did not improve disease control in NFT although the *in vitro* bi-culture was positive (Figure 2). In terms of crop growth, the tested treatments did not significantly influence shoot height, leaf number, leaf size, root length, shoot or root fresh weight compared to those of inoculated control (Table 2, Figure 3). This might probably due to the incidence of having nil BCAs survival in the cropping system. This finding was not in line with the other reports (1, 2, 3, 4) of which achieved good result of using some rhizosphere bacteria for controlling damping-off caused by *Pythium aphanidermatum*.

Table 1 Disease severity of Cos grown in NFT applied with 4 beneficial rhizosphere bacteria and one commercial biocontrol product.

Treatment	Disease severity ^{1/}		
	1 st week	2 nd week	3 rd week
Non-inoculated control	0	0	0
Inoculated control	1.05	3.50	2.56
T1	0.94	2.72	3.17
T2	0.80	2.89	3.00
T3	1.06	2.89	3.39
T4	1.11	2.83	2.67
T5	1.22	3.22	3.22

^{1/} Based on pathogenicity test, disease severity was assessed from incidence of brown root tips and percent total roots with brown discoloration using increment scale of 0-5.

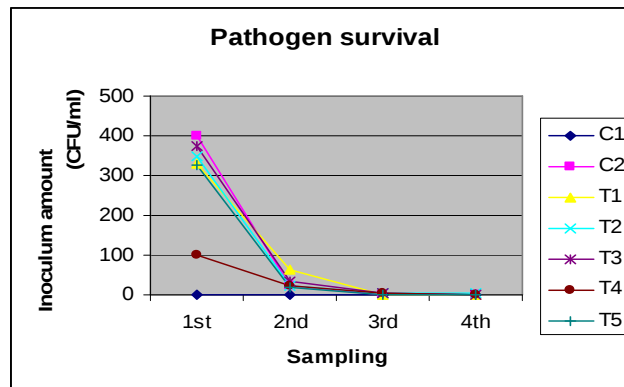


Figure 1 Pathogen survival in NFT-nutrient solution during cropping.

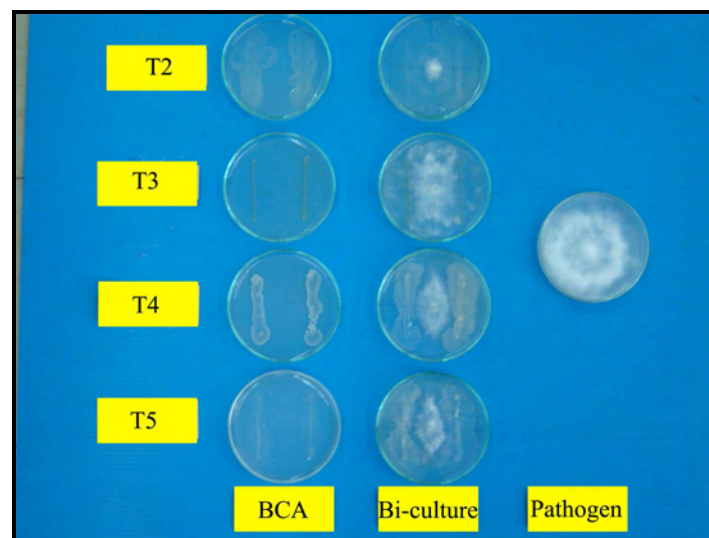


Figure 2 Bi-culture for rechecking the potential of BCAs (beneficial rhizobacteria) after being added into the nutrient solution.

Table 2 Growth and yield of Cos grown in NFT-nutrient solution applied with beneficial rhizosphere bacteria and one commercial biocontrol product for controlling Pythium root rot.

Treatment	Growth (At 35 days)					Yield (g)	
	Shoot height (cm)	Leaf no.	Leaf size (cm)		Root length (cm)	Shoot fresh wt.	Root fresh wt.
			Width	Length			
Non-inoculated control	15.81 ^{1/a}	19.3a	8.48a	11.45a	42.50a	93.82a	23.45a
Inoculated control	10.69bc	11.9b	4.91b	7.17b	6.43b	10.03b	5.06b
T1	9.54bc	11.7b	4.50b	5.83bc	4.68b	7.51b	4.61b
T2	10.61bc	12.1b	4.87b	6.40bc	4.90b	10.17b	5.04b
T3	9.93bc	11.8b	4.79b	6.08bc	4.82b	9.50b	4.05b
T4	9.08c	10.3b	3.89b	5.24c	5.79b	6.43b	2.51b
T5	10.90b	12.0b	4.97b	6.32bc	5.90b	11.51b	4.93b
CV	16.72%	25.37%	24.37%	21.30%	55.92%	130.92%	81.70%

^{1/}Means within the column followed by the same letter are not significantly different according to DMRT (P<0.01)



Figure 3 Growth at harvest of Cos in NFT-nutrient solution applied with 4 kinds of four beneficial rhizosphere bacteria (T1, T2, T3 and T4) and one commercial product (T5) for controlling Pythium root rot.

2. Evaluation of reported-rhizosphere bacteria for controlling *Pythium* root rot of green oak grown in DRFT

2.1 Testing their ability for germination stimulation and growth promoting of lettuce (green oak) seedling

Four reported-rhizosphere bacteria were tested for promoting the seed germination seedling growth. Green oak seeds were disinfested with 10% clorox for 5 min. then soaked with distilled water 3 min. twice before soaking in antagonist suspension of 10^6 cfu/ml for 10 min. and let them air-dried. Treated seeds were separately checked for germination by blotter method. Rate of germination, root length, stem height of seedlings were noted comparing with non-treated control.

Result

The efficiency of seed treatment with tested antagonistic bacteria significantly gave better results under laboratory condition in terms of seed germination, shoot and root length compared to that of the control (Table 3). Regarding this, seed treatment with *Pseudomonas fluorescens* (SP007s) was the best.

Table 3 Efficiency of seed treatment with four antagonistic bacteria as PGPR on the germination and growth of green oak seedling under laboratory condition.^{1/}

Treatment	Laboratory condition		
	Seed germination (%)	Shoot length (cm)	Root length (cm)
T1 (KPS46)	98b	4.43b	4.10b
T2 (SW01/4)	100a	4.43b	4.95a
T3 (SP007s)	100a	5.47a	5.26a
T4 (SP009s)	98b	4.87b	4.98a
Control ^{2/}	92c	3.48c	3.86c

^{1/} Means of 10 replications. Means in a column followed by the same letter are not significantly different according to DMRT.

^{2/} Without seed bacterization.

2.2 Testing their ability against *Pythium* sp.

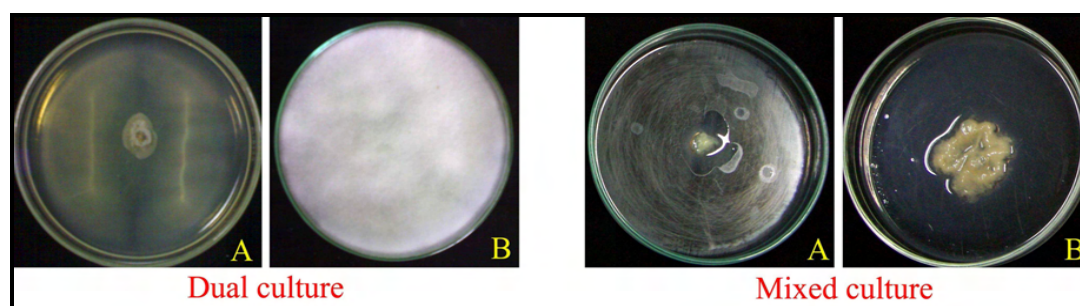
Four rhizosphere bacteria were tested for their ability against *Pythium* sp using dual culture and mixed culture.

Result

Among the tested rhizosphere bacteria, *Pseudomonas fluorescens* (SP007s) was the best in retarding the growth of *Pythium* sp. under dual culture and mixed culture (Table 4, Figure 4).

Table 4 Effect of antagonistic bacteria on growth of *Pythium* sp.

Treatment	Growth inhibition of <i>Pythium</i> sp.(%)
T1 (KPS46)	55.56c
T2 (SW01/4)	66.67b
T3 (SP007s)	75.00a
T4 (SP009s)	62.00b
Control	0c

**Figure 4** Effect of *Pseudomonas fluorescens* (SP007s) on growth of *Pythium* sp.:1. Dual culture (A), Control (B) 2. Mixed culture (A), Control (B)

2.3 Testing their viability in nutrient solution

Rhizosphere bacterium showing the highest ability from 1.1 and 1.2 was selected. Then its viability (using 10^6 and 10^9 cfu / ml) was tested in flask containing 500 ml of hydroponic nutrient solution. During incubation (shaking condition for 1 month), its viability was checked weekly.

Result

Regarding the viability of *Pseudomonas fluorescens* (SP007s) in nutrient solution, it could survive up to 21 days, after that the cell amount decreased (Table 5).

Table 5 Viability of *Pseudomonas fluorescens* (SP007s) in nutrient solution.

O.D.	Cell amount (cfu/ml)				
	0 day	7 days	14 days	21 days	28 days
0.1	2.3×10^4	3.1×10^6	1.1×10^8	2.3×10^6	1.2×10^3
0.2	3.2×10^6	4.3×10^8	3.2×10^9	6.1×10^7	2.1×10^4

2.4 Evaluation of the selected rhizosphere bacteria for controlling *Pythium* root rot of lettuce (green oak) grown in DRFT

Based on the result of the 2.1, 2.2, 2.3 experiment, *Pseudomonas fluorescens* (SP007s) was chosen to evaluate the appropriate application for controlling *Pythium* root rot of lettuce (green oak) in DRFT (Figure 4). Treatments [seed treatment (T1), application into nutrient solution (T2), seed trt + application into nutrient solution (T3) and control] were arranged in CRD with three replications of 20 plants. All tested treatments were inoculated with 5×10^5 sporangium / ml of *Pythium* sp. The pH and EC of NS was monitored daily. Parameters measured were disease incidence and crop growth.

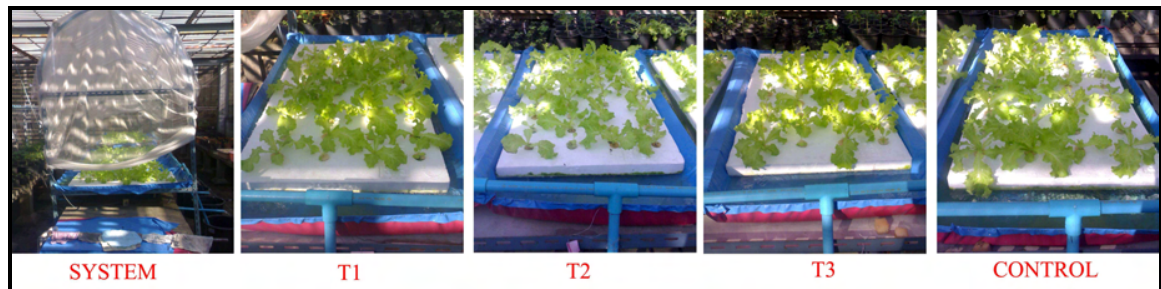


Figure 5 DRFT system for evaluating the beneficial rhizosphere bacteria for controlling *Pythium* root rot of lettuce (green oak).

Result

All tested methods of applying the *Pseudomonas fluorescens* (SP007s) into the DRFT system could significantly reduce the disease incidence compared with that of control (Table 6). Besides, combined method [seed trt + application into nutrient solution (T3)] was the best on this regard. Crop growth result was in line with the disease incidence, that is combined application gave the best result in terms of shoot and root length as well as fresh weight (Figure 6).

Table 6 Effect of *Pseudomonas fluorescens* (SP007s) on Pythium root rot of lettuce (green oak) grown in DRFT.

Treatment	Disease incidence (%)
Seed treatment (T1)	35c
Application into nutrient solution (T2)	25b
Seed trt + Application into nutrient solution (T3)	15a
Control	85d

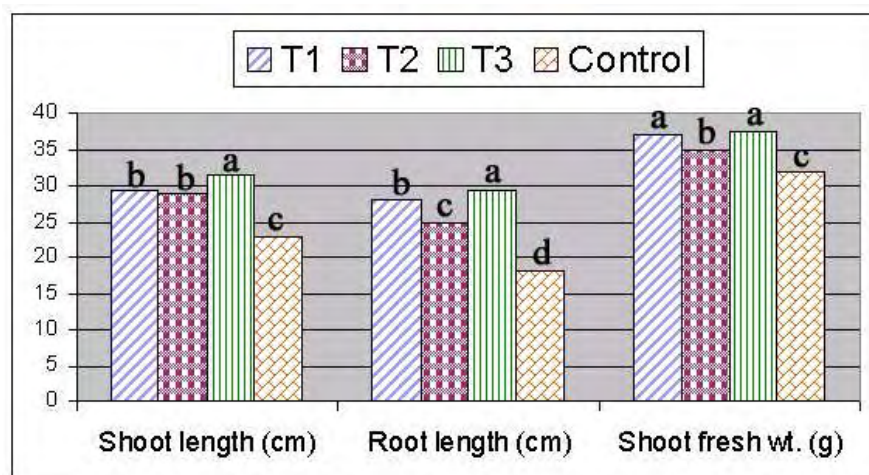


Figure 6 Growth and yield of lettuce (green oak) grown in DRFT added with *Pseudomonas fluorescens* (SP007s).

Based on both experiments, it should be pointed out that the method of applying the beneficial rhizosphere bacteria into hydroponic system plays the crucial role for achieving their satisfying antagonist potential.

Isolation, screening and evaluating the *in vitro*-ability of new indigenous endophytic and epiphytic bacteria from recirculating hydroponic systems

Indigenous rhizosphere bacteria were isolated, using serial dilutions and spread on selective media in Petri dishes, from nutrient solution and root of hydroponic crops collected from commercial hydroponics located in central region of Thailand. Morphologically distinct bacteria were isolated and grown in pure culture on NA.

Result

468 isolates of miscellaneous endophytic and epiphytic bacteria are obtained (Table 1, Figure 1) and some isolates are shown to be effective in inhibiting the *in vitro* growth of

Pythium sp. (Table 2, Figure 2). Percent inhibition is between 87.9 and 65.8 while isolate KUKL 205 is the best potential to produce secondary metabolites for suppressing the target pathogen.

Table 1 Bacterial morphotypes on NA isolated from nutrient solution and plant parts (root, stem, and leaf) grown in hydroponics.

Group	Bacterial isolate	Morphotypes ^{1/}	Number of isolate ^{2/}
1	KUKL001-057	Gray white, flat, circular, glint slimy	57
2	KUKL058-080	Yellow, convex, glint slimy	23
3	KUKL081-092	Gray white, convex, circular, glint smooth surface, undulate margins	12
4	KUKL093-119	Gray white, flat, irregular, rough surface, lobate margins	27
5	KUKL120-138	Gray white, convex, circular, lobate margins	19
6	KUKL139-149	Light brown, convex, circular, glint smooth surface	11
7	KUKL150-188	Gray white, flat, filamentous	39
8	KUKL189-201	Yellow pale, convex, circular, glint smooth surface, lobate margins	13
9	KUKL202-210	Yellow pale, irregular, glint smooth surface	9
10	KUKL211-225	Light white, oval, entire margins	15
11	KUKL226-253	Gray white, flat	28
12	KUKL254-274	Gray white, flat, circular, undulate margins	21
13	KUKL275-284	Gray white, circular, glint smooth surface	10
14	KUKL285-291	Gray white, convex, irregular, glint smooth surface	7
15	KUKL292-313	Brown yellow (soluble on medium), irregular	22
16	KUKL314-533	Gray white, convex, glint, smooth surface	20
17	KUKL534-346	Gray white, convex, circular, glint smooth surface, spread colony	13
18	KUKL347-374	Gray white, irregular, smooth surface	28
19	KUKL375-400	White, flat, rough surface, undulate margins	26
20	KUKL401-415	Dark yellow, irregular, flat, smooth surface, entire margins	15
21	KUKL416-447	Dark yellow, circular, undulate margins	32
22	KUKL448-454	Gray white, circular, umbilicate, rough surface, undulate margins	7
23	KUKL456-468	Whitish cream, circular, convex, entire margins	14

^{1/} Comparison of bacterial morphotypes based on color and colony characteristics.

^{2/} Total collected bacteria are 468 isolates.

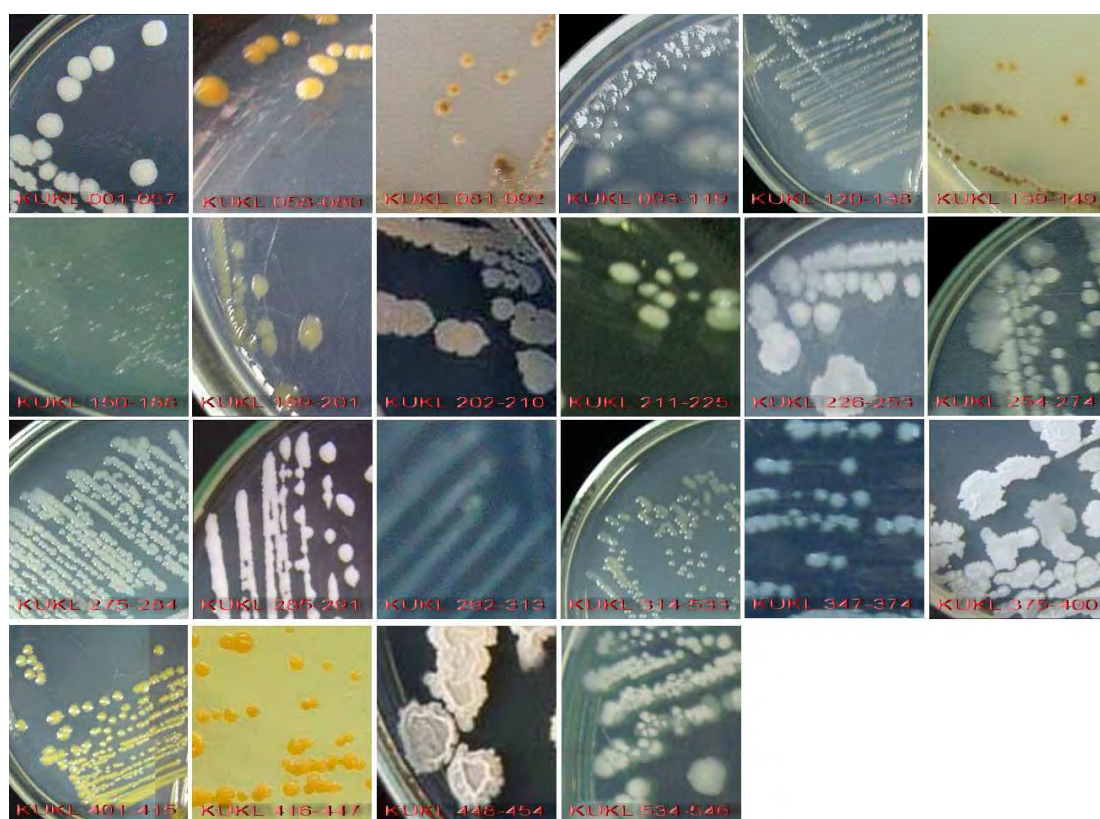


Figure 1 Bacterial morphotypes on NA isolated from nutrient solution and plant parts (root, stem, and leaf) grown in hydroponics

Table 2 Inhibition of *Pythium* sp. by different antagonistic bacteria with dual culture method under laboratory condition.

Bacterial isolate	Source	Inhibition diameter ^{1/} (mm)	% Inhibition
KUKL357	Root of pak-khom-kaew	30.8	65.8 ^c
KUKL432	Root of green spinach	30.8	65.8 ^c
KUKL209	Root of butter head lettuce	30.8	65.8 ^c
KUKL319	Leaf of pak-khom-kaew	20.5	77.3 ^b
KUKL210	Leaf of green oak	30.5	66.2 ^c
KUKL205	Leaf of peppermint	10.9	87.9 ^a
KUKL077	Leaf of butter head	30.6	66.0 ^c
KUKL189	Nutrient solution in green spinach culture	30.8	65.8 ^c
KUKL344	Nutrient solution in butter head culture	40.0	55.6 ^d
KUKL371	Nutrient solution in mint culture	30.6	66.0 ^c
Control	ddH ₂ O	90	0 ^e

^{1/} Means calculated from 4 replications.

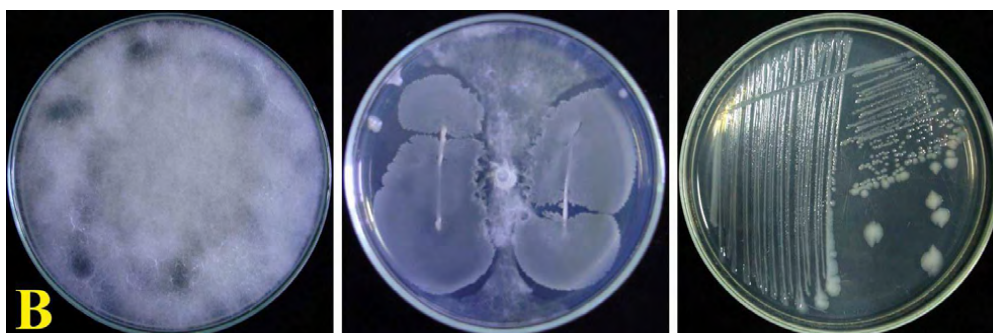


Figure 2 Bi culture test of bacterial isolate (KUKL 205) shown to be effective in inhibiting the *in vitro* growth of *Pythium* sp.

Evaluation of the new indigenous rhizosphere bacterium (KUKL 205) for controlling *Pythium* root rot of lettuce in hydroponics

This experiment was conducted to determine the effect of KUKL205, the newly-obtained indigenous rhizosphere bacterium, on root rot of lettuce in DRFT compared to the reported PGPR (SP007s) and the elicitor (salicylic acid). Besides, the accumulation of β -1, 3-glucanase, the defense-related enzyme, in the treated plants was assayed by the laminarin dinitrosalicylic acid method (Pan *et al.*, 1991; Buensanteai *et al.*, 2007) during 6 days after pathogen-inoculation.

Result

All the bacterial treated-plants showed no symptom of root rot compared to the non-treated plants (Figure 1). However, all the treatments had the same leaf SPAD value. Regarding the defense-related enzyme, it was found that the accumulation of β -1, 3-glucanase in bacterial antagonist-treated plants which were inoculated with *Pythium* sp. were significantly greater than those in non-treated control (Figure 2). β -1, 3-glucanase activity of the KUKL205 treatment seemed to be in line with the SA and SP007s treatments. However, the accumulation of this enzyme in the SA and SP007s treatments were significantly higher than that in KUKL205 treatment on the 2nd and 3rd day after pathogen-inoculation (Figure 2).

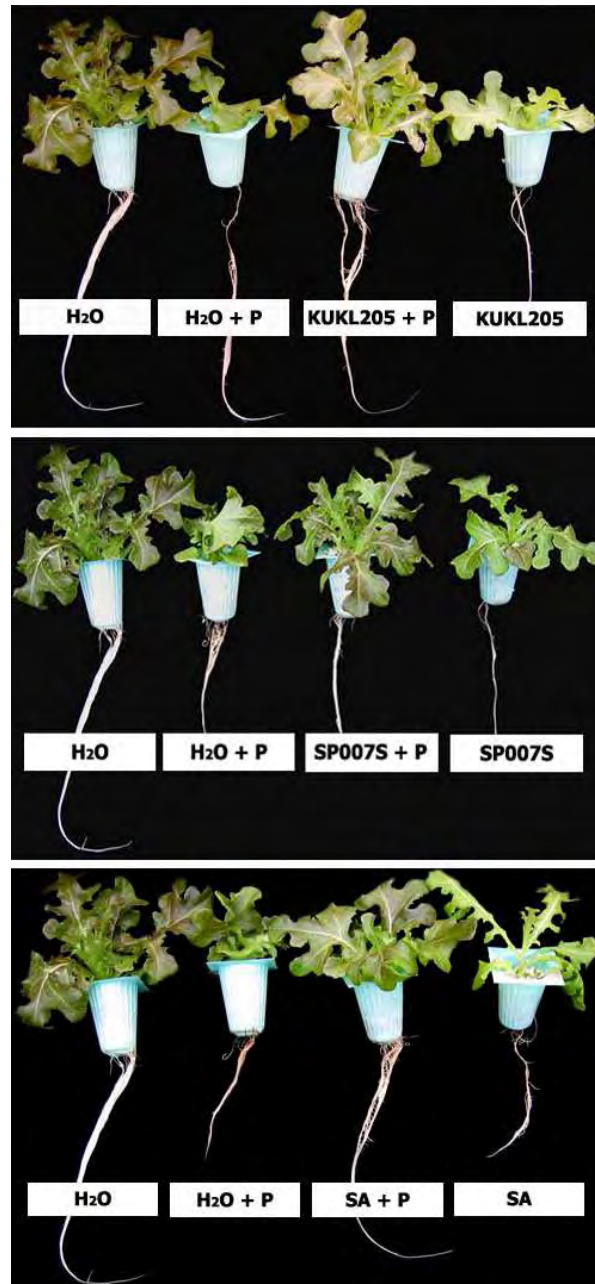


Figure 1 Effect of bacterial antagonists (including an indigenous PGPR) as seed treatment on Pythium root rot of lettuce grown in DRFT.

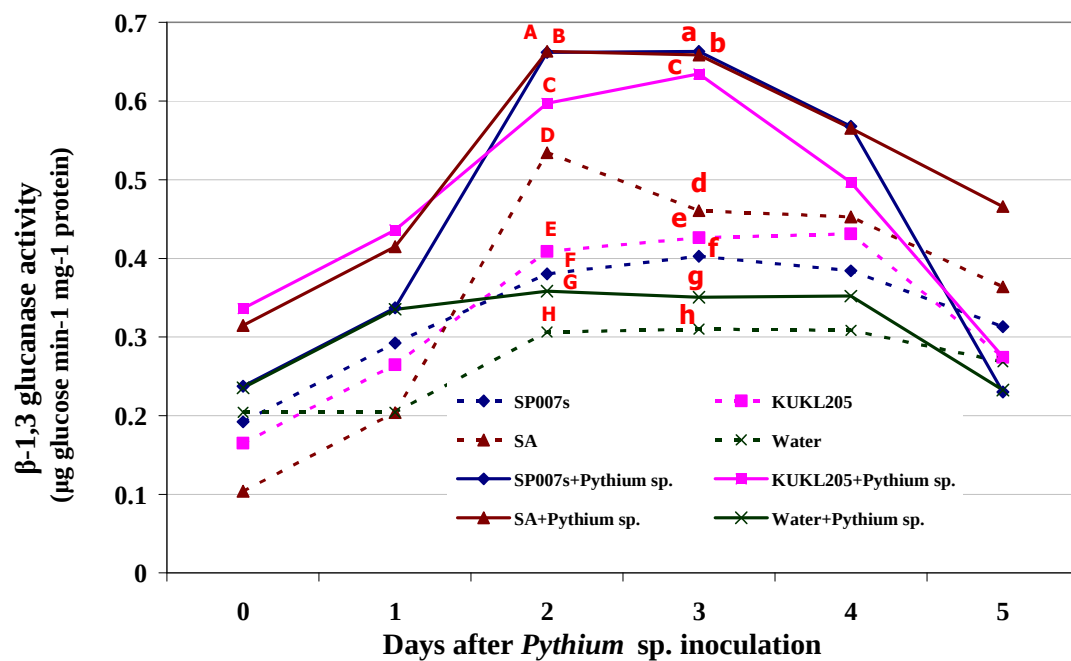


Figure 2 β-1, 3-glucanase activity of the antagonists-treated plants and non-treated plants during 6 days after *Pythium* sp.-inoculation.

Conclusion

1. Directly applying the four beneficial rhizosphere bacteria and bioproduct into the hydroponic nutrient solution gave unsatisfactory result in controlling *Pythium* root rot of lettuce since their survival in the system was hardly detected.

2. Among the four tested rhizosphere bacteria, seed treatment with *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 added into nutrient solution gave the best result in decreasing the disease incidence and increasing the crop growth.

3. Based on biochemical and 16S rRNA-PCR characterization, KUKL205, the newly-obtained indigenous rhizosphere bacterium, was identified as *Bacillus* sp. being effective in inhibiting the *in vitro* growth of *Pythium* sp.

4. The accumulation of β -1,3 glucanase, a defense-related enzyme was also greater in bacterial antagonists-treated plants compared to control which was in line with disease incidence.

Acknowledgement

This research is supported by The Thailand research fund.

References

1. Buensanteai N., et al. 2009. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 25 (7), 1275-1286.
 2. Chen C., et al. 2000. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 56, 13-23.
 3. Pan S.Q., et al. 1991. *Physiology Molecular Plant Pathology* 39, 25-39.
 4. Prathuangwong S. 2007. *Acta Phytopathol et Entomol Hungarica* 42: 321-330.
-

16th Asian Agricultural Symposium and 1st International Symposium on Agricultural Technology

"Sufficiency Agriculture"

25-27 August 2010, Bangkok, Thailand



Organized by
Tokai University, JAPAN
King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, THAILAND
Faculty of Agricultural Technology, KMITL, THAILAND

Test of Four Commercial Bioproducts on Pythium Root Rot of Hydroponically-Grown Cos Lettuce (*Lactuca sativa* L.)

JAENAKSORN, T.^{1*}, P. KOOHAKAN¹ and S. PRATHUANGWONG²

¹Department of Plant Production Technology, Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand

²Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

*Corresponding author: kjtanimn@kmitl.ac.th

Abstract

Hydroponics originally came about to eliminate many of the variables that contribute to disease in the field, but other 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. To manage this disease, biological-based approach would be implemented for maintaining a more sustainable and healthier hydroponic crop ecosystem. Therefore, the research was aimed to determine if bioproducts presently marketed for conventional crops could retard the disease in hydroponics. First, the *Pythium* pathogenicity test on lettuce (*Lactuca sativa* L.) was performed in deep flow technique for obtaining the most aggressive species to be used in the following experiment. Second, four commercial bioproducts (*Trichoderma*) for soil-grown crops were evaluated for their biological control of *Pythium* root rot of lettuce grown in nutrient film technique. Their effect on crop growth and yield was determined while the survival of pathogen and biological control agents were weekly monitored from nutrient solution and from plant root at harvest. Also, the advantages and limitations of the measures will be discussed.

Keywords: *Pythium* spp., root rot, Cos lettuce, bioproducts, *Trichoderma*, NFT, DFT

Introduction

Hydroponics originally came about to eliminate many of the variables that contribute to disease in the field, but other variables may have been created in the process. Presently, *Pythium* causing root rot is a real problem in recirculating hydroponic systems as they provide ideal conditions for rapid growth and spread of infectious spores. Besides, it is an opportunistic disease which means that it is looking for weak or injured plants. To manage this disease, biological-based approach would be implemented for maintaining a more sustainable and healthier hydroponic crop ecosystem. The objectives of this research were: (i) to study the *Pythium* pathogenicity test on lettuce (*Lactuca sativa* L.) in deep flow technique (ii) to determine if commercial bioproduct for conventional crops have potential in controlling root rot disease of hydroponic lettuce.

Materials and Methods

Pythium pathogenicity test with lettuce (*Lactuca sativa* L.) in DFT

Survey on *Pythium* root rot was conducted at commercial hydroponic farms in Bangkok, Samutprakarn, Nakhonratchasima. Then five isolates of *Pythium* sp. obtained from the survey were tested for their pathogenicity with 4 kinds of lettuce in DFT (data not shown). The most aggressive species of *Pythium*, the most susceptible lettuce (Cos) and disease index obtained from this experiment are employed in the following trials.

Evaluation of commercial bioproducts for controlling Pythium root rot of Cos grown in NFT

This experiment was aimed to determine if bioproducts presently marketed for conventional crops could retard the disease of hydroponic crops. Hence the activity of 4 formulations of commercial products of *Trichoderma harzianum* [starter (T1), wettable powder (T2, T3) and spore suspension (T4)] for controlling *Pythium* root rot of *Cos* grown in outdoor NFT was investigated. Three replications of 9 plants per treatment were arranged in CRD. The pH and EC of nutrient solution (NS) was monitored daily. Each product was applied at the recommended rate to the NFT-nutrient solution at 2 days before inoculation with 5×10^6 zoospores/mL of *Pythium* sp. Disease severity and crop growth were weekly assessed until harvest. Besides, pathogen and BCAs survival was weekly monitored in NS and last check was made on root at harvest.

Results and Discussion

Evaluation of commercial bioproducts for controlling Pythium root rot of Cos grown in NFT

No root discoloration developed in the uninoculated control. Application of the 4 products did not give any control of root rot compared to that in inoculated control (Table 1). Figure 1 revealed that pathogen survivals in NS of all tested treatments decreased sharply in the 1st-2nd wk. and continued decreasing till harvest. Unlike, the BCAs survival tended to fluctuate from week to week (Figure 1). It should be pointed out that BCAs in T2, T3, T4 were hardly detected at 1, 2, 3 days after application into NS. At harvest, there were significantly more cfu of BCAs and pathogen recovered from root than from NS (Figure 1). The detected buildup of BCAs in the harvested root although it was applied to the nutrient solution suggests that application into recirculation nutrient solution would allow association of the agent with the roots. However, whether the buildup density is sufficient to effectively control *Pythium* sp. or not would be considered.

Responses of plant growth components to the tested products were in line with those in the disease control. ANOVA indicated that treatments did not significantly influence shoot height, leaf number, leaf size, root length, shoot fresh or root fresh weight compared to inoculated control (Table 2, Figure 2). This finding does not agree with preliminary observations with other vegetables crops grown in DFT (Hatairat and Tanimnun, 2007).

Collectively, findings that the tested products were ineffective against *Pythium* root rot disease in NFT which are not in line with recent observation with other DFT crops probably suggest that the agent might be host-specific in controlling. Besides, it is possible that NFT would not provide the ideal condition to maintain the agents in the system sufficient to control the disease compared to that in DFT. The unsuited formulation to hydroponics as well as quality of the products would possibly be attributed to the experiment.

Table 1 Disease severity of *Cos* grown in NFT applied with commercial bioproducts.

Treatment	Disease severity ^{II}		
	1 st Week	2 nd Week	3 rd Week
Non-inoculated control	0	0	0
Inoculated control	1	1.5	2.5
T1	1	1.72	2.72
T2	1	1.4	2.3
T3	1	1.1	2.6
T4	1	1.0	2.4

^{II} Based on pathogenicity test, disease severity was assessed from incidence of brown root tips and percent total roots with brown discoloration using increment scale of 0-5.

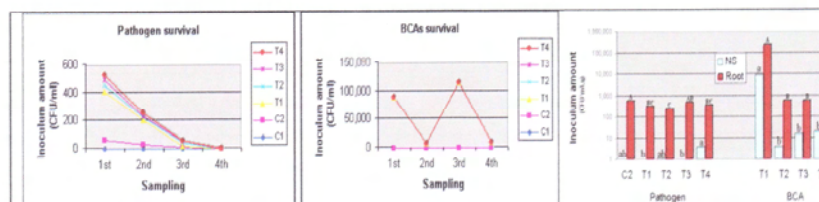


Fig. 1 Pathogen and BCAs survival in NFT-nutrient solution during cropping, their recovery from NFT-nutrient solution and root of Cos at harvest. ¹ Bars in each group labeled by the same letter are not significantly different according to DMRT ($P < 0.01$).

Table 2 Growth at harvest and yield of Cos grown in NFT-nutrient solution applied with 4 kinds of commercial bioproducts for controlling Pythium root rot.

Treatment	Shoot height (cm)	Leaf no.	Growth		Root length (cm)	Yield (g)	
			Leaf size (cm)			Shoot fresh wt.	Root fresh wt.
			Width	Length			
Non-inoculated control	19.04 ¹ _a	18a	10.15a	14.3a	48.45a	118.62a	20.48a
Inoculated control	12.11b	12b	6.41bc	8.9b	10.31b	19.3bc	8.11b
T1	11.95b	13b	4.92de	6.44cd	8.77b	14.12bc	6.2b
T2	12.26b	13b	5.47cd	7.31c	5.79b	17.46bc	7.78b
T3	9.6c	13b	4.22de	5.27d	4.2b	8.56c	5.51b
T4	13.16b	14b	6.55b	9.76b	6.8b	23.02b	7.6b
CV	4.9%	5.7%	4.1%	4.8%	18.7%	10.1%	15.6%

¹ Means within the column followed by the same letter are not significantly different according to DMRT ($P < 0.01$).

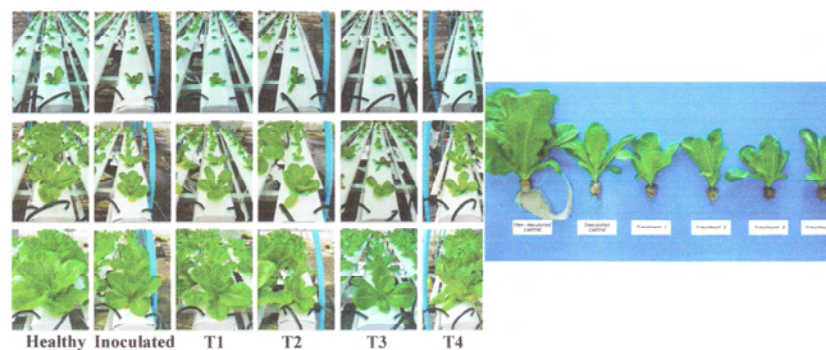


Fig. 2 Growth at 1st wk, 2nd wk and harvest of Cos in NFT-nutrient solution applied with 4 kinds of commercial bioproducts for controlling Pythium root rot (A). Inoculated control (C2), T1, T2, T3 and T4 showed the mushy and sad root (B).

Conclusion

The four formulations of commercial bioproducts for soil-grown crops were ineffective against *Pythium* root rot disease in NFT which are not in line with recent observation with other DFT crops probably suggest that the agent might be host-specific in controlling. Besides, it is possible that NFT might not provide the ideal condition to maintain the agents in the system sufficient to control the disease compared to that in DFT. The unsuited formulation to hydroponics as well as quality of the products would possibly be attributed to the experiment.

Acknowledgement

This research was supported by the Thailand Research Fund (TRF).

References

- Jaenaksorn, T. and H. Rachniyom. 2008. Effectiveness of soluble silicon and biological control agents for management of *Pythium* root rot of hydroponically-grown kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC.). The 9th International Congress of Plant Pathology, August 24-29, 2008 Torino, Italy.
- Jaenaksorn, T., P. Koohakan and S. Pratuangwong. 2010. Bacterial antagonists increase growth promotion and natural defense response of lettuce (*Lactuca sativa* L.) under hydroponics. Proceedings of the 12th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria. Parc des Expositions et des Congres de Saint-Denis, Ile de la Réunion, France. June 7-11, 2010. (p140).
- Pariyapom, T. and T. Jaenaksorn. 2007. Antagonistic bioproduct: Survival and their effect on growth of Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. var. *chinensis*) in deep flow technique. King Mongkut's Agricultural Journal 25(3): 27-38. (in Thai)
- Rachniyom, H. and T. Jaenaksorn. 2007. Formulation of antagonistic bio-product: Survival, potential and their effect on growth of kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC.) in deep flow technique. Proceedings of The 8th National Plant Protection Conference 157-171. (in Thai)

Efficacy of Indigenous *Trichoderma* and PGPR for Controlling *Pythium* Root Rot of Lettuce (*Lactuca sativa* L.) Grown in Deep Flow Technique

JAENAKSORN, T.^{1*}, P. KOOHAKAN and S. PRATHUANGWONG²

¹Plant Production Technology Department, Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand

²Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

*Corresponding author: kjtanimn@kmitl.ac.th

Abstract

Due to the efficacy limit of several bioproducts to be used in hydroponics, employing the indigenous microorganisms including PGPR from hydroponic system as biocontrol agents would be an alternative biological-based approach for sustainable disease management. Therefore, our research aim was to isolate, screen and evaluate the *in vitro* and *in vivo* ability of new indigenous microorganisms against *Pythium* root rot of lettuce. From the obtained-*in vitro* beneficial indigenous fungi, 3 isolates of *Trichoderma* spp. were determined together with PGPR for their efficacy in controlling *Pythium* root rot of Cos lettuce grown in deep flow technique (DFT). Indigenous PGPR (KUKL 205) was used as seed treatment while the 3 indigenous *Trichoderma* spp. were applied as root-dip solution and added into DFT-nutrient solution at the concentration of 10^8 conidia/ml (10 ml per plant). Disease incidence, disease severity, survival of pathogen and of biocontrol agents as well as plant growth, were determined accordingly. The result showed that no root discoloration or root lesion developed in the uninoculated control. The application of indigenous PGPR and the 3 isolates of *Trichoderma* spp. did provide significant control of root rot disease compared to that in inoculated control. Responses of plant growth components to the tested treatments were in line with those in the efficacy of disease control.

Keywords: *Pythium* spp., root rot of Cos, *Trichoderma* spp., PGPR, biological control products, DFT

Introduction

Pythium root rot disease is widespread and frequently destructive in lettuce (*Lactuca sativa* L.) grown in hydroponics. To manage this disease, the awareness of the importance of protecting our global environment and the efficacy limit of several bioproducts to be used in hydroponics would be taken into consideration. Therefore, employing the new indigenous microorganisms including PGPR from hydroponic system as biocontrol agent for such a disease would be an alternative biological-based approach for sustainable disease management. Our research was first conducted to isolate, screen and evaluate the *in vitro* antagonistic ability of new indigenous fungi against *Pythium* sp. Second, efficacy of indigenous *Trichoderma* and PGPR for controlling *Pythium* root rot of lettuce (*Lactuca sativa* L.) grown in Deep Flow Technique was determined. Besides, the synergistic effect of biological control agents on disease control efficacy and plant growth components was considered.

Materials and Methods

Isolation, screening and evaluating the in vitro antagonistic ability of new indigenous fungi against Pythium sp.

Indigenous fungi were isolated, using serial dilutions and spread on selective media in Petri dishes, from nutrient solution and root of hydroponic crops collected from commercial hydroponics located in central region of Thailand. Morphologically distinct fungi were collected and grown in pure culture on PDA for further evaluation on their antagonistic ability against *Pythium* sp. using *in vitro* bi-culture test.

Efficacy of indigenous Trichoderma and PGPR for controlling Pythium root rot of lettuce (Lactuca sativa L.) grown in Deep Flow Technique

Since KUKL205 (*Bacillus* sp.), the indigenous PGPR from hydroponics, was proved to be effective both in inhibiting the *in vitro* growth of *Pythium* sp. and in controlling *Pythium* root rot of lettuce in DRFT (Jaenaksorn *et al.*, 2010), therefore this experiment was conducted to determine the synergistic effect between KUKL205 and three indigenous *Trichoderma* selected from the above experiment for controlling *Pythium* root rot of lettuce (*Lactuca sativa* L.) grown in Deep Flow Technique. KUKL205 (OD 0.1) was used as seed treatment (Jaenaksorn *et al.*, 2010) while 3 indigenous *Trichoderma* spp. were applied as root-dip solution and added into DFT-nutrient solution at the concentration of 10^8 conidia/ml (10 ml per plant). Seven treatments were arranged in CRD with five replications of 2 plants. Besides, *Pseudomonas fluorescens* (SP007s)-seed treatment (Prathuangwong, S., 2007) was included as compared treatment. The pH and EC of NS was monitored daily. Disease incidence and severity, survival of pathogen and biocontrol agents as well as plant growth were determined.

Results and Discussion

Isolation, screening and evaluating the in vitro antagonistic ability of new indigenous fungi against Pythium sp.

Regarding bi-culture test, twenty indigenous fungi obtained from hydroponic system gave percent growth inhibition of *Pythium* sp. at 3 days about 14-35 percent. A003, A018 and A019 were chosen for further test in mini DFT since their *in vitro* antagonistic ability at 20 days were quite satisfactory (Fig. 1).

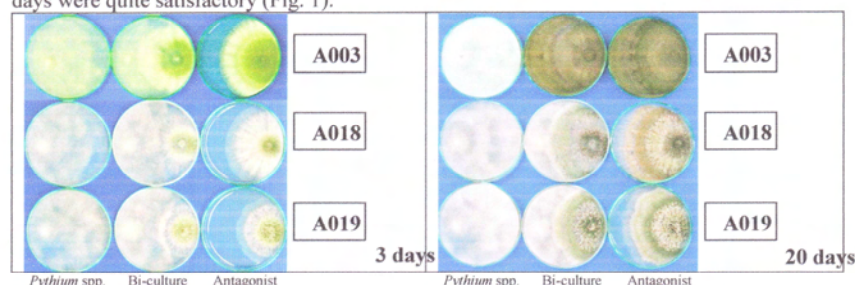


Fig. 1 Bi-culture test of indigenous fungi against *Pythium* sp. causing root rot disease.

Efficacy of indigenous Trichoderma and PGPR for controlling Pythium root rot of Cos (Lactuca sativa L.) grown in Deep Flow Technique

The result showed that no root discoloration or root lesion developed in the healthy control while the pathogen-inoculated control significantly showed mushy and sad root system on 21 dpi (Table 1). The application of indigenous KUKL205 alone (T1) and with the 3 isolates of *Trichoderma* spp. (T2, T3, T4) did provide significant control (on 21 dpi) of root

rot disease compared to that in the inoculated control (Table 1, Figure 2). No synergistic effect between indigenous KUKL205 and the 3 indigenous isolates of *Trichoderma* spp. (A003, A018 and A019) was noted on disease control efficacy. Figure 3 revealed that pathogen could survive in harvested-root in all tested treatments except healthy control. Its highest survival was noted on T5 (inoculated control) while the lowest survival was found on T3 (KUKL205+A018). Regarding the *Trichoderma* treatment, their viability could be detected from harvested root which was in line with the 3 reports mentioning that *Trichoderma* spp. could colonize the root of *Cucumis sativus* L. (Yedidia *et al.*, 1999), *Brassica campestris* L. var. *chinensis* (Pariyaporn and Jaenaksorn, 2007), and *Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC. (Jaenaksorn and Rachniyom, 2008) after applying into hydroponic system. T3 (KUKL205-seed treatment+A018 in NS) was having the lowest survival of pathogen and the highest viability of *Trichoderma*. This might result in a reduction in disease severity compared to that in inoculated control. Surprisingly, response of plant growth components (especially shoot fresh weight) to T3 was not in line with that in the disease control efficacy (Table 2). For leaf SPAD value, all treatments were not significantly different. In terms of shoot fresh weight, T1 and T2 gave significantly better result than that in inoculated control. Besides, synergistic effect on plant growth was significantly detected in T2 (KUKL205 and *Trichoderma* A003).

Table 1 Root rot disease severity of Cos grown in mini-DFT on the 1, 2, 4, 11 and 21 days post inoculation (dpi) with *Pythium* sp.

Treatment	Disease severity ^{1/}				
	1 dpi	2 dpi	4 dpi	11 dpi	21 dpi (at harvest)
T1 (KUKL205-seed treatment)	0.80ab ²	1.90b	1.90b	2.20ab	1.30ab
T2 (KUKL205-seed treatment + A003 in NS)	1.00ab	1.80b	1.80b	1.40ab	1.10ab
T3 (KUKL205-seed treatment + A018 in NS)	0.80ab	1.40b	1.90b	2.60ab	1.90b
T4 (KUKL205-seed treatment + A019 in NS)	1.20ab	1.20b	1.40ab	2.80ab	1.80b
T5 (Inoculated control)	1.80b	2.00b	2.50b	3.30b	3.80c
T6 (Healthy control)	0.20a	0.00a	0.00a	0.00a	0.00a
T7 (SP007s-seed treatment)	1.40ab	1.50b	1.90b	2.30ab	1.20ab
CV (%)	74.85	41.49	57.53	57.27	44.59

^{1/} Disease index rated as 0 = healthy root, 1 = 1-20% diseased roots, 2 = 21-40% diseased roots, 3 = 41-60% diseased roots, 4 = 61-80% diseased roots, and 5 = 100% diseased roots and rot.

^{2/} Means within the column followed by the same letter are not significantly different at probability level 0.05 by Duncan's Multiple Range Test.

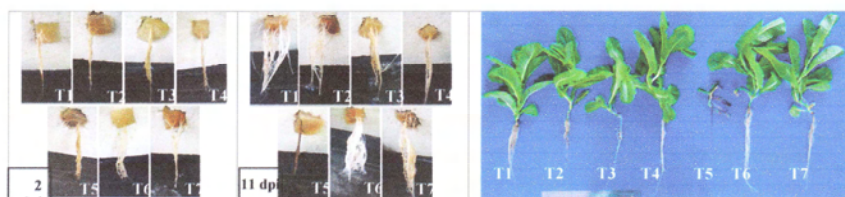


Fig. 2 Cos showing the *Pythium* root rot disease on 2, 11 and 21 days post inoculation.

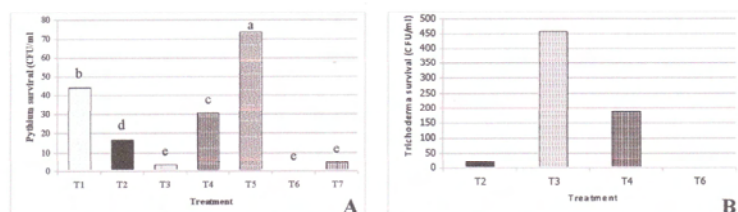


Fig. 3 Survival of *Pythium* (A) and *Trichoderma* spp. (B) from harvested root of treated Cos grown in mini-DFT.

Table 2 Growth and yield of treated Cos in mini-DFT at harvest (42 days).

Treatment	Leaf number (No.)	Leaf area ²⁾ (cm ²)	Leaf SPAD value	Shoot fresh wt. (g)	Root length (cm)	Root wt. (g)
T1	10.6abc ¹⁾	108.68a	38.52ab	32.50c	22.44b	2.17b
T2	12.0a	80.80ab	40.81a	39.50b	30.89a	3.45a
T3	8.1c	61.62ab	38.52ab	18.12e	22.65b	1.41c
T4	8.5bc	46.94b	39.15ab	22.55de	13.74c	1.52c
T5	12.0a	74.90ab	37.50ab	26.36d	16.05c	1.98bc
T6	12.5a	111.02a	37.64ab	45.75a	29.01a	3.31a
T7	11.3ab	92.35ab	36.59a	22.25de	24.85b	2.26b
CV (%)	19.10	45.85	6.79	13.00	11.61	18.11

¹⁾Means within the column followed by the same letter are not significantly different at probability level 0.05 by Duncan's Multiple Range Test. ²⁾Leaf area of the biggest leaf.

Conclusion

The application of indigenous KUKL205 alone (T1) and with the 3 isolates of *Trichoderma* spp. (T2, T3, T4) did provide significant control (on 21 dpi) of root rot disease compared to that in the inoculated control. No synergistic effect between indigenous KUKL205 and the 3 indigenous isolates of *Trichoderma* spp. (A003, A018 and A019) was noted on disease control efficacy. However, synergistic effect on plant growth was significantly noted in T2 (KUKL205 and *Trichoderma* A003).

Acknowledgement

This research was supported by the Thai National Fund.

References

- Jaenaksorn, T. and H. Rachniyom. 2008. Effectiveness of soluble silicon and biological control agents for management of *Pythium* root rot of hydroponically-grown kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC.). The 9th International Congress of Plant Pathology, August 24-29, 2008 Torino, Italy.
- Jaenaksorn, T., P. Koohakan and S. Pratuangwong. 2010. Bacterial antagonists increase growth promotion and natural defense response of lettuce (*Lactuca sativa* L.) under hydroponics. Proceedings of the 12th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria. Parc des Expositions et des Congres de Saint-Denis, Ile de la Réunion, France. June 7-11, 2010. (p 140).
- Pariyaporn, T. and T. Jaenaksorn. 2007. Antagonistic bioproduct: Survival and their effect on growth of Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. var. *chinensis*) in deep flow technique. King Mongkut's Agricultural Journal 25(3): 27-38. (in Thai)
- Rachniyom, H. and T. Jaenaksorn. 2007. Formulation of antagonistic bio-product: Survival, potential and their effect on growth of kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC.) in deep flow technique. Proceedings of The 8th National Plant Protection Conference 157-171. (in Thai)
- Yedidia, L., N. Benhamou and J. Chet. 1999. Induction of defense response in Cucurbit plants (*Cucumis sativa* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. Applied and Environmental Microbiology 65(3): 1061-1070.