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

1. 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
2. พืชผักสลัด
   - ผักสลัด Cos (*Lactuca sativa* L.) สายพันธุ์ Tiberius RZ
   - ผักสลัด Red oak (*Lactuca sativa* L.) สายพันธุ์ Mondai RZ
3. ระบบ DFT
   - กะละมัง
   - สายยาง
   - ปั๊มอากาศ

- 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 ตรวจเช็คสารละลายและปรับสารละลายใหม่เพื่อรักษาสภาพค่า 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 X 10^6 sporangium/ml และใส่ลงในระบบปลูกพืชในแต่ละทรีทเมนต์

3. การตรวจสอบเชื้อสาเหตุในระบบในระหว่างการทดลอง

เพื่อยืนยันอีกครั้งหนึ่งว่า เชื้อสาเหตุในแต่ละทรีทเมนต์ยังเป็นเชื้อเดิมอยู่ ดังนั้น ในระหว่างการทดลอง (ในสัปดาห์ที่ 1 และ 4 หลังจากปลูกเชื้อ) จึงมีการนำรากที่แสดงอาการโรคมาแยกเชื้อสาเหตุอีกครั้งหนึ่ง 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 ที่แยกได้มาจากระบบ DRFT และ NFT กับผักสลัด 2 ชนิด คือ ผักสลัด Cos และ Red oak ที่ปลูกในระบบ DFT พบว่า เชื้อ *Pythium* ทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถทำให้เกิดโรครากเน่าต่างกันดังแสดงในตารางที่ 1.1 และ 1.2 ภาพที่ 1.1 และ 1.2 อีกทั้งยังทำให้การเจริญเติบโต (ความสูงของต้น ขนาดและจำนวนใบ) 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 ในสัปดาห์ที่1 เปอร์เซ็นต์การครอบครองรากของเชื้อ *Pythium* ทั้ง 3 ไอโซเลท ค่อนข้างต่ำ (0-6 เปอร์เซ็นต์) ในผักสลัดทั้ง 2 ชนิด ต่อมาในสัปดาห์ที่ 4 พบว่าเปอร์เซ็นต์

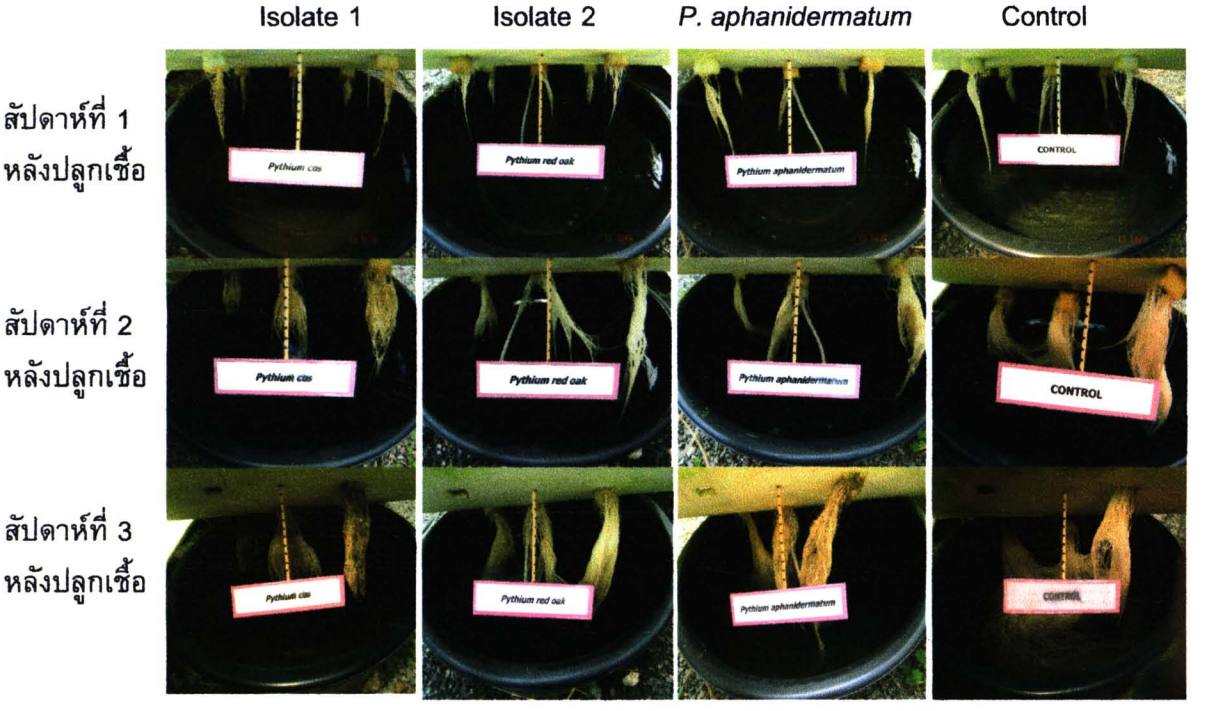
การครอบครองรากสูงขึ้นในทุกทรีทเมนต์ โดยในผักสลัด Cos มีเปอร์เซ็นต์การครอบครองรากสูงกว่าในผักสลัด Red oak โดยเฉพาะ *Pythium* ไอโซเลท 1 ยังมีเปอร์เซ็นต์การครอบครองรากสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับไอโซเลทอื่นๆ อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสังเกตว่า ในทรีทเมนต์ที่ไม่ได้ปลูกเชื้อ (Healthy control) กลับตรวจพบการครอบครองรากของเชื้อ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

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

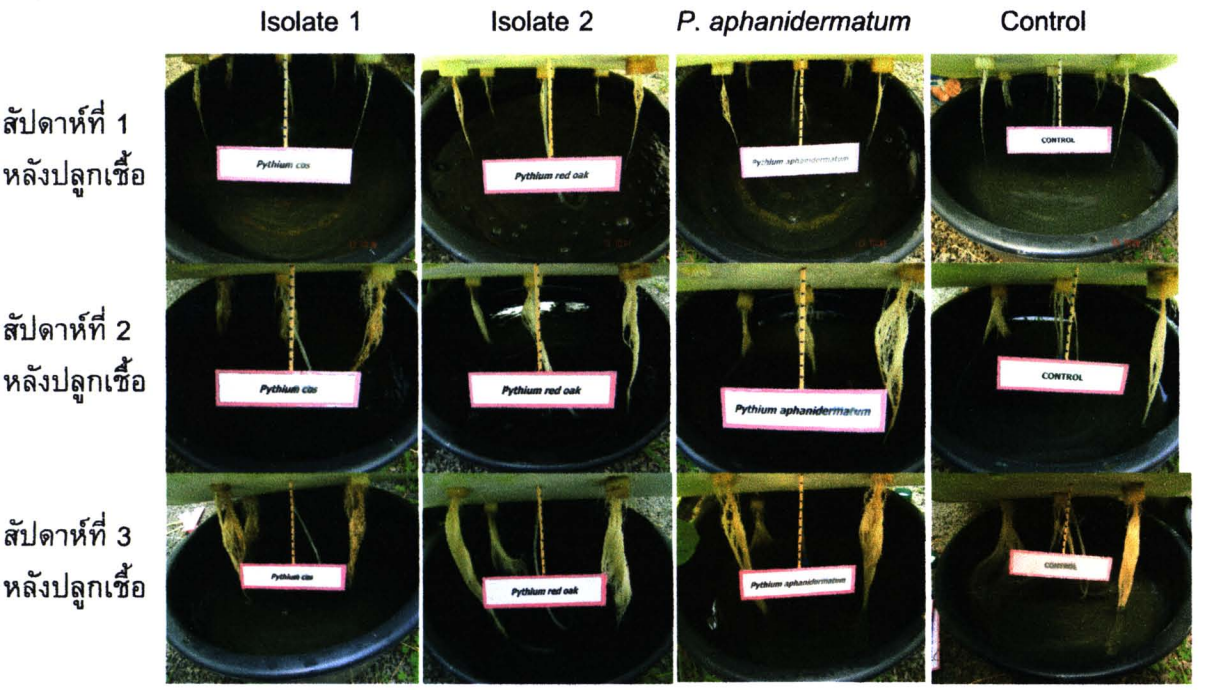
เวลา	Isolate 1	Isolate 2	*P. aphanidermatum*	Healthy Control
สัปดาห์ที่ 1 หลังปลูกเชื้อ	กลุ่มรากค่อนข้างดำรากเริ่มกุดปลายรากมีสีน้ำตาลดำประมาณ 20%	ปลายรากมีจุดสีน้ำตาลดำ	ปลายรากฝอยมีจุดสีน้ำตาลดำขนาดประมาณ 1 ม.ม.	รากมีสีขาว
สัปดาห์ที่ 2 หลังปลูกเชื้อ	รากกุดและกลุ่มรากมีสีน้ำตาลประมาณ 50 %	รากขาวแต่ก็มีปลายรากฝอยเป็นสีน้ำตาลบ้างแต่น้อยมาก	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	*P. aphanidermatum*	Healthy Control
สัปดาห์ที่ 1 หลังปลูกเชื้อ	ปลายรากมีจุดสีน้ำตาลดำ	กลุ่มรากมีสีน้ำตาล ปลายรากเป็นจุดสีน้ำตาลดำ	ปลายรากฝอยมีจุดสีน้ำตาลดำ	รากมีสีขาว
สัปดาห์ที่ 2 หลังปลูกเชื้อ	รากฝอยกุดและมีสีน้ำตาลประมาณ 45 %	รากขาวแต่ก็มีปลายรากฝอยเป็นสีน้ำตาลบ้างแต่น้อยมาก	ปลายรากฝอยเป็นสีน้ำตาลแต่เบาบาง เพราะรากที่งอกใหม่มีสีขาวปกติ	รากยาวขึ้นและมีสีขาว
สัปดาห์ที่ 3 หลังปลูกเชื้อ	รากกุดมาก ราก เป็นสีน้ำตาล ประมาณ 95 %	ปลายรากแทบจะไม่แสดงอาการ	ปลายรากฝอยกุด เป็นสีน้ำตาลและบริเวณรากช่วงบน ประมาณ 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.

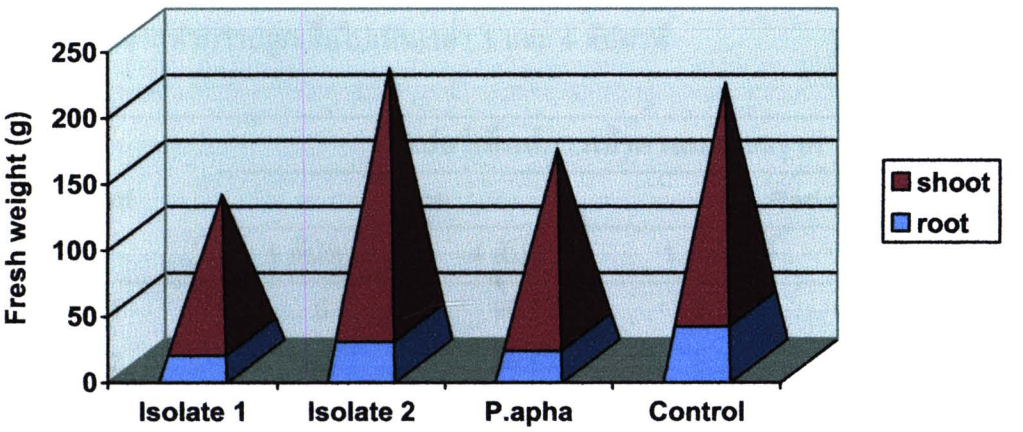
Treatment	Height (cm)				Leaf								Fresh weight (g) at harvest	
					Number				Area (w x h, cm^2)					
	Before inoculation	After inoculation			Before inoculation	After inoculation			Before inoculation	After inoculation				
		1 wk	2 wk	3 wk		1 wk	2 wk	3 wk		1 wk	2 wk	3 wk	Stem	Root
Isolate1	8.44a[1/]	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 Control	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
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)

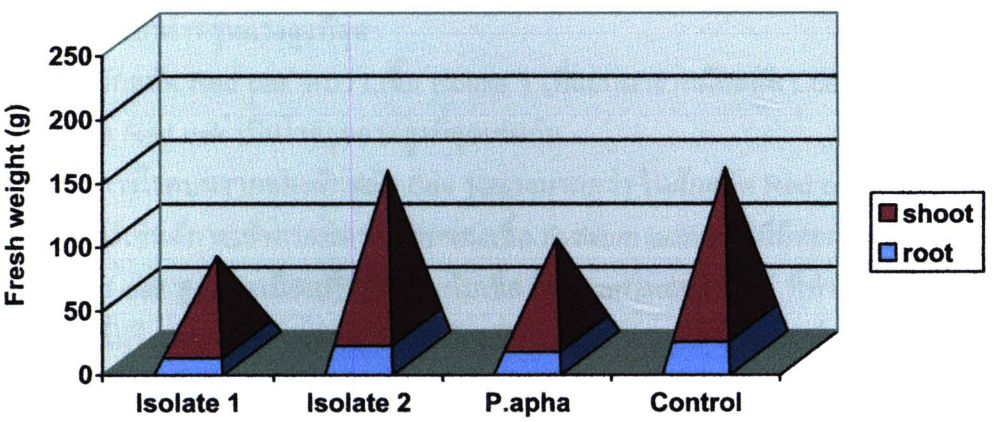
ตารางที่ 1.4 การเจริญเติบโตของผักสลัด Red oak ในสารละลายธาตุอาหารพืชของระบบ DFT ที่มีการปลูกเชื้อ *Pythium* spp.

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				
		1 wk	2 wk	3 wk		1 wk	2 wk	3 wk		1 wk	2 wk	3 wk	Stem	Root
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
P. aphanidermatum	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	4สัปดาห์
Isolate 1	0	96.67	3.38	91.67
Isolate 2	0	96.67	6.25	41.67
P. aphanidermatum	6.25	75	0	75
Healthy Control	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 กุดและเน่าเป็นสีน้ำตาลายเกือบหมด (75%)

   4 = รากพืชทั้งหมดถูกทำลาย รากกุดสั้นและเน่าเป็นสีน้ำตาลเกือบหมด (100%)

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย

1.2 การประเมินประสิทธิภาพชีวผลิตภัณฑ์รา (biocontrol products) ที่มีจำหน่ายในท้องตลาด ในการควบคุมโรครากเน่าของผักสลัดในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน

ทำการทดสอบชีวผลิตภัณฑ์รา *Trichoderma harzianum* ที่มีจำหน่ายในท้องตลาดทั้ง 4 ผลิตภัณฑ์ คือ ชีวผลิตภัณฑ์1 (หัวเชื้อสด) T1, ชีวผลิตภัณฑ์2 (ผงละลายน้ำ) T2, ชีวผลิตภัณฑ์3 (ผงละลายน้ำ) T3, ชีวผลิตภัณฑ์4 (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 ตรวจเช็คสารละลายและปรับสารละลายใหม่เพื่อรักษาสภาพค่า EC และ pH ให้อยู่ในช่วงดังกล่าวทุกวันในช่วงเช้า

2) การปลูกเชื้อ BCA ลงในระบบ กระทำเมื่อ 1 วันหลังจากย้ายพืชลงระบบ NFT

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

T2 ปริมาณ 30 กรัม

T3 ปริมาณ 30 กรัม

T4 ปริมาณ 3.6 มิลลิลิตร

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ ... 2555
เลขทะเบียน 245887
เลขเรียกหนังสือ ...

3) การปลูกเชื้อ pathogen ลงในระบบ

นำเชื้อ *Pythium* spp. เลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นเจาะชิ้นวุ้นเชื้อด้วย cork borer เบอร์ 2 และใส่ลงในอาหาร V8 broth และนำไปวางบนเครื่องเขย่าวันละ 8 ชั่วโมงเป็นเวลา 5 วัน จากนั้นเตรียม spore suspension ให้ได้ 5 x 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 สำหรับการใช้ BCA ในทุกกรรมวิธีพบว่า ไม่สามารถควบคุมอาการโรคที่รากได้เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่มีการปลูกเชื้อ pathogen (C2) ดังตารางที่ 1.6 แต่อย่างไรก็ตามความอยู่

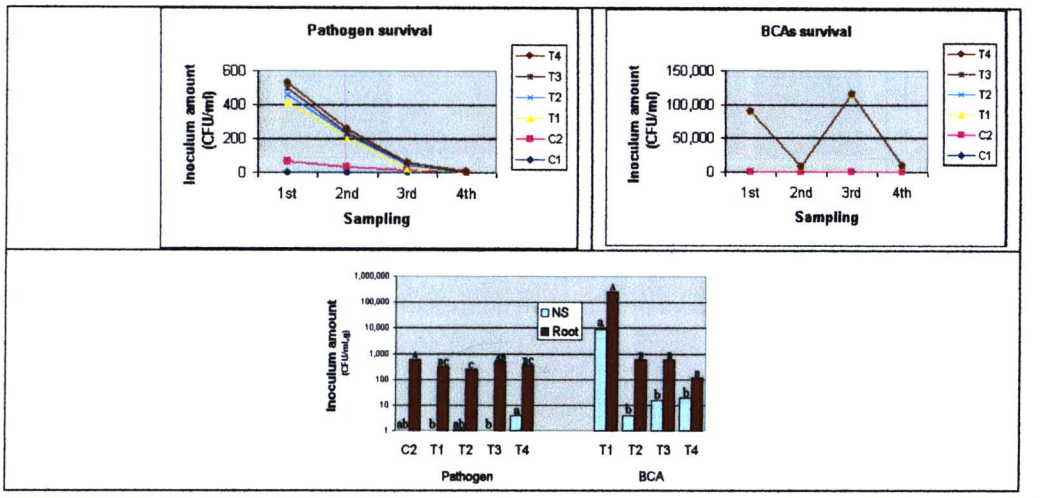
รอดของเชื้อ pathogen ในระบบมีปริมาณลดลงอย่างรวดเร็วในสัปดาห์ที่ 1 และ 2 และยังคงลดลงไปเรื่อยๆ จนถึงระยะเก็บเกี่ยว ซึ่งแตกต่างจากความอยู่รอดของเชื้อ BCA ในระบบที่มีปริมาณทั้งลดลงและเพิ่มขึ้นไม่สม่ำเสมอตลอดระยะเวลาการปลูก (ภาพที่ 1.5) และเป็นที่น่าสังเกตว่าในช่วง 1-3 วันหลังจากใส่เชื้อ BCA ลงไปในระบบ พบว่าชีวผลิตภัณฑ์ 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 ซึ่งควรจะคำนึงถึงในประเด็นนี้ เช่นเดียวกับรายงานของ Koohakan 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/]		
	1st Week	2nd Week	3rd 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.



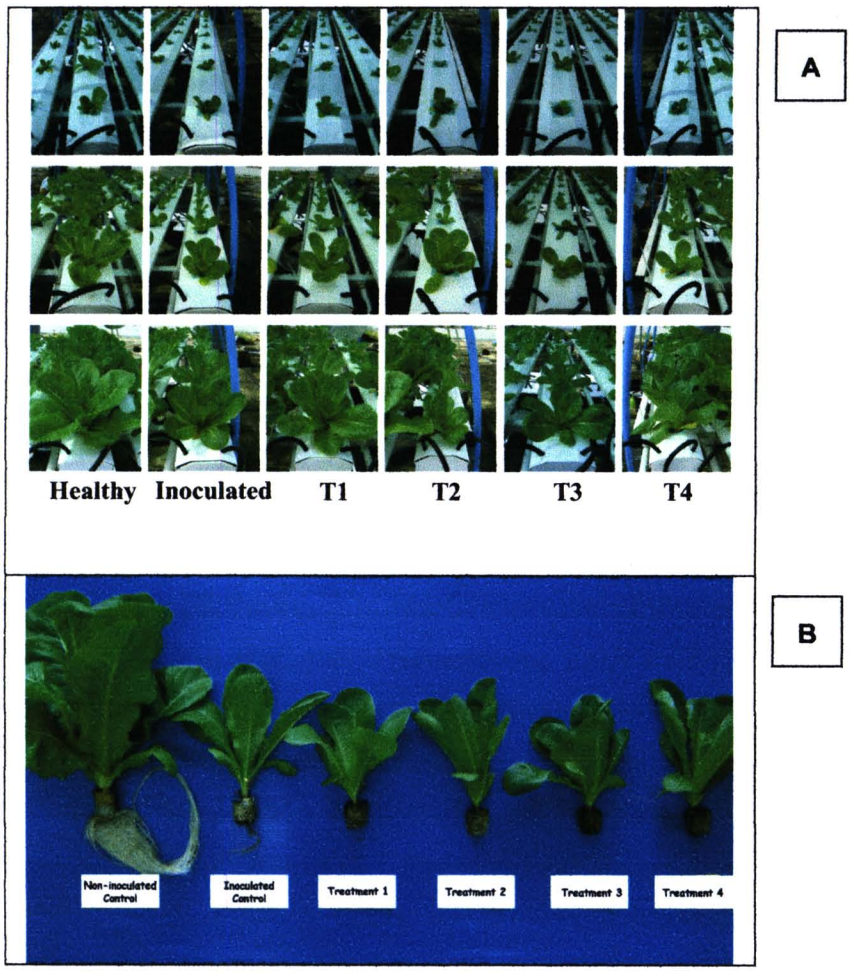
[1/]Bars in each group labeled by the same letter are not significantly different according to DMRT (P<0.01).

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. lichiniformis* (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 ที่จะทำการปลูกเชื้อสาเหตุโรคด้วย 5 x 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 โดยอาการเน่าดังกล่าวจะพบเนื้อเยื่อบางส่วนของรากเละและหลุดออกจากต้น สำหรับการประเมินประสิทธิภาพของแบคทีเรียเขตรากพืชที่ได้มีการเผยแพร่แล้วและชีวผลิตภัณฑ์แบคทีเรีย ผลที่ได้รับไม่เป็นไปตามที่คาดหวัง กล่าวคือ แบคทีเรียเขตรากพืชทุกตัวที่ทำการทดสอบไม่สามารถลดความรุนแรงของโรคได้เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการที่มีการปลูกเชื้อสาเหตุโรค (Inoculated control) (ตารางที่ 1.8)

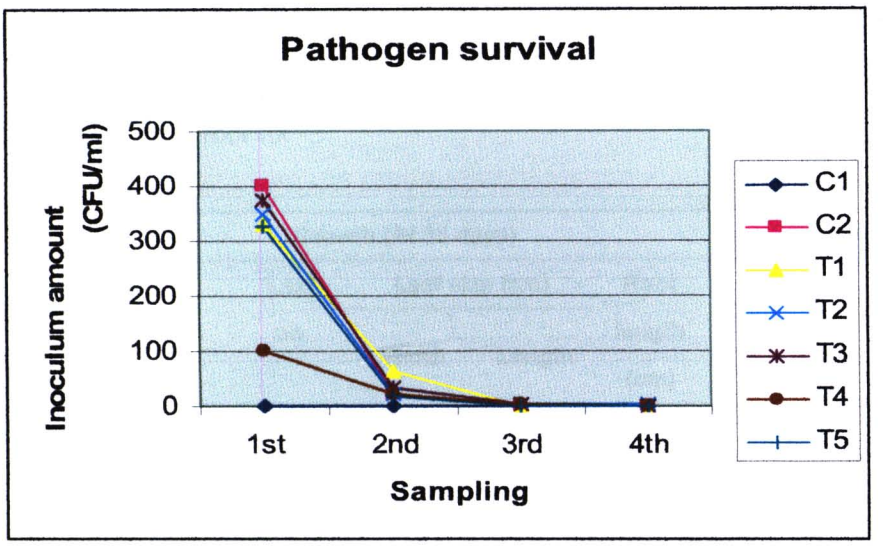
สำหรับความอยู่รอดของเชื้อสาเหตุโรคในระบบของทุกวิธีการลดลงอย่างรวดเร็วในสัปดาห์ที่ 1 และ 2 จากนั้น จะลดลงเรื่อยๆ จนถึงระยะเก็บเกี่ยว และเป็นที่น่าสังเกตุว่าความอยู่รอดของแบคทีเรียเขตรากพืช (BCA) ที่ใส่ลงไปในระบบมีปริมาณน้อยมากจนถึงไม่สามารถตรวจพบได้ (ภาพที่ 1.7) แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวจากระบบมาประเมินการคงความเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อสาเหตุโรคในสภาพห้องปฏิบัติการโดยวิธี 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 เชื้อแบคทีเรียเขตรากพืชดังกล่าวไม่มีผลส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชแต่อย่างใดเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการที่มีการปลูกเชื้อสาเหตุโรค (Inoculated control) (ตารางที่ 1.9 ภาพที่ 1.9) ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นผลมาจากความอยู่รอดในระบบปลูกพืชนี้พบค่อนข้างต่ำมาก ไม่เพียงพอต่อการควบคุม แต่อย่างไรก็ตามข้อที่น่าสังเกตุที่ดีข้อหนึ่ง คือ ถึงแม้ว่าเชื้อแบคทีเรียเขตรากพืชดังกล่าวจะอยู่รอดได้ไม่ดีในระบบแต่ยังคงความสามารถเป็นเชื้อปฏิปักษ์ต่อเชื้อ *Pythium* spp. ได้เป็นอย่างดี ดังนั้น ถ้าหากมีการปรับปรุงเชื้อแบคทีเรียเขตรากพืชดังกล่าวข้างต้นสามารถอยู่รอดในระบบได้ดีก็จะทำให้มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคดังกล่าวได้

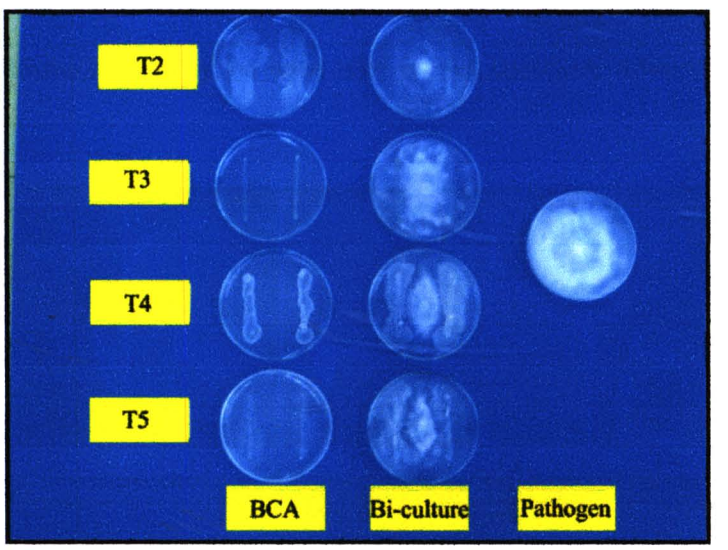
ตารางที่ 1.8 ความรุนแรงของโรครากเน่าของผักสลัด Cos ใน NFT ที่มีการใส่เชื้อแบคทีเรียเขตรากพืชที่ได้รับการเผยแพร่แล้ว 4 สายพันธุ์ และ ชีวผลิตภัณฑ์ 1 ชนิด

Treatment	Disease severity[1/]		
	1st week	2nd week	3rd 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

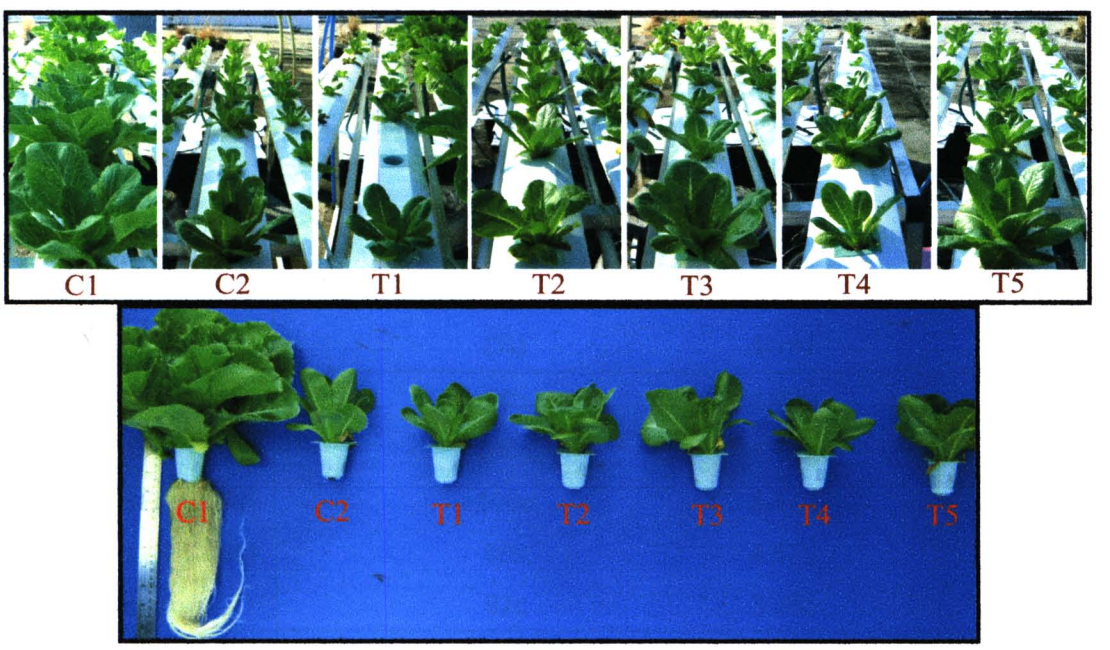


ภาพที่ 1.8 การตรวจสอบกลับของความเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อ pathogen ของ BCA หลังจากใส่ลงในระบบปลูกพืช โดยวิธี Bi-culture

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 จากนั้นแช่ด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อเป็นเวลา 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

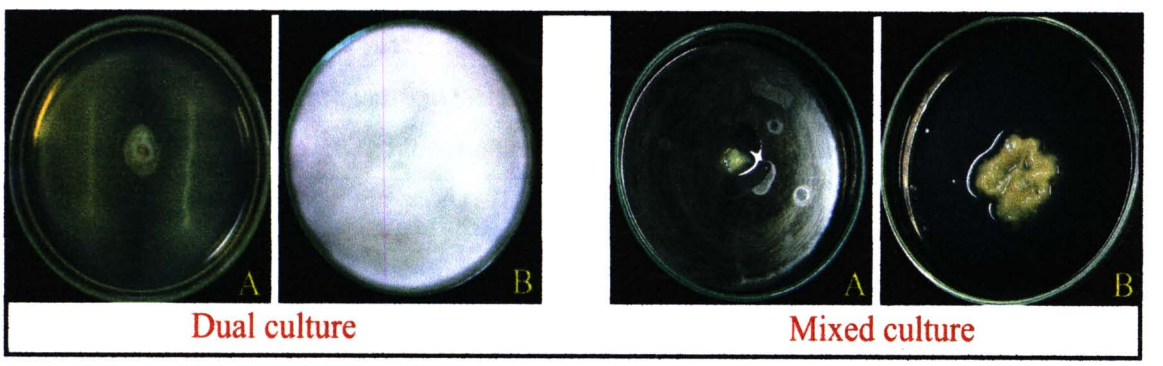
นำแบคทีเรียเขตรากพืชทั้ง 4 สายพันธุ์มาทดสอบความสามารถในการต่อต้านเชื้อ *Pythium* spp. โดยวิธี dual culture และ mixed culture

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 *Pythium* 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	$2.3x10^4$	$3.1x10^6$	$1.1x10^8$	$2.3x10^6$	$1.2x10^3$
0.2	$3.2x10^6$	$4.3x10^8$	$3.2x10^9$	$6.1x10^7$	$2.1x10^4$

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 x 10^5 sporangium/ml ในระหว่างการปลูกมีการตรวจและปรับค่า pH และ EC ของสารละลายธาตุอาหารของพืช บันทึกการเกิดโรค (disease incidence) และ การเจริญเติบโตของพืช (ความสูงต้น ความยาวราก และ น้ำหนักสดของต้น)

ผลการทดลอง

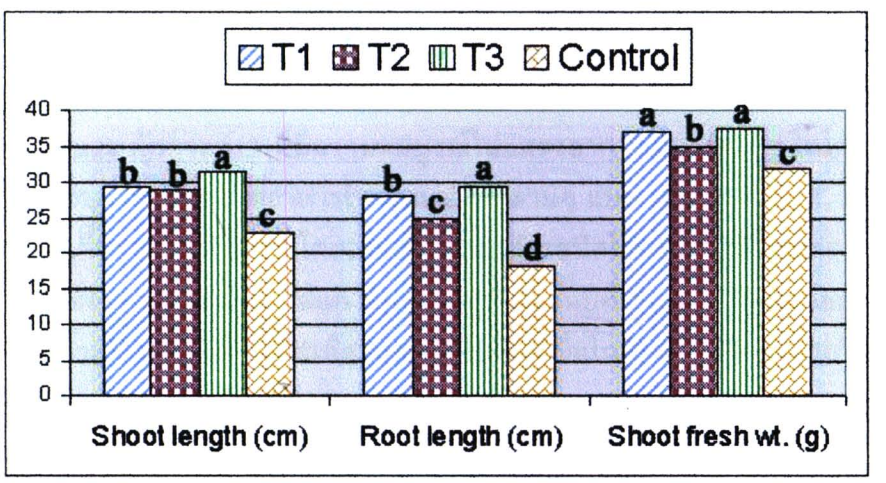
การใส่เชื้อ *Pseudomonas fluorescens* (SP007s) ทุกวิธีการทำให้การเกิดโรค (disease incidence) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ control (ตารางที่ 1.13) โดยเฉพาะอย่างยิ่งวิธีการร่วมระหว่างการคลุกเมล็ดและใส่ลงในสารละลายธาตุอาหารพืช (T3) ให้ผลดีที่สุด (disease incidence = 15 เปอร์เซ็นต์) ในด้านการเจริญเติบโตของพืชดังกล่าวพบว่า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