สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดลอง 1.3.1 และ 1.3.2 ชี้ให้เห็นว่าวิธีการใช้แบคทีเรียเขตรากพืช (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 ศูนย์วิจัยและพัฒนาเขาหินซ้อน โครงการส่วนพระองค์ จ. ฉะเชิงเทรา โครงการพัฒนาส่วนพระองค์ ตำบลบางแตน อ. บ้านสร้าง จ. ปราจีนบุรี ศูนย์ศึกษาการพัฒนาเขาหินซ้อนฯ อ. พนมสารคาม จ. ฉะเชิงเทรา แหล่งปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินตามโครงการพระราชดำริ หลังร้าน Golden place รามคำแหง กรุงเทพมหานคร สวน ส.ส. อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา แหล่งปลูกผักไฮโดรโพนิกส์บางปู 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) ฟินเล่ย์ Water cress, Dai-Tokyo คื่นฉ่าย 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 ไอโซเลทที่เกิดโรครุนแรงที่สุดจากการทดลองที่ 1 และ เชื้อราปฏิปักษ์ที่แยกได้ทุกไอโซเลทบนอาหาร PDA บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25-32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 3 วันสำหรับเชื้อสาเหตุโรค และ 7 วันสำหรับเชื้อราปฏิปักษ์ สำหรับการทำ Bi-culture test เริ่มจากใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ลนไฟฆ่าเชื้อ เจาะบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อราสาเหตุและเชื้อราปฏิปักษ์ จากนั้นย้ายชิ้นวุ้นของเชื้อราทั้งสองชนิดมาวางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 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) ดังนั้นจึงมีการสังเกตุกลไกของการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์ต่อไปอีกระยะหนึ่ง โดยบ่มจานอาหารเลี้ยงเชื้อร่วมไว้จนถึง 20 วัน พบว่า เชื้อราปฏิปักษ์ 3 ไอโซเลท ได้แก่ A003, A018 และ A019 สามารถเจริญครอบคลุมเชื้อสาเหตุโรคได้เกือบสมบูรณ์ (exploitation) จนกระทั่งไม่สามารถนับจำนวน oospore ของเชื้อสาเหตุโรคได้ (ภาพที่ 2.1)

ตารางที่ 2.1 การสำรวจและเก็บรวบรวมเชื้อราในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน

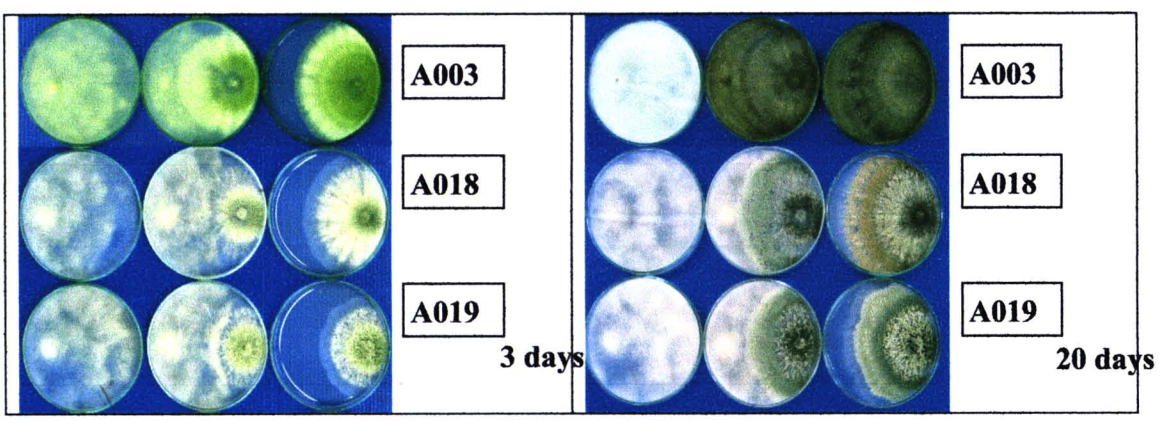
Isolates	Isolated plant part	Location	Hydroponic type
RK-K1	Celery root	Ramkamhang, BKK	DFT
RK-K2	Celery root	Ramkamhang, BKK	DFT
RK-K3	Celery root	Ramkamhang, BKK	DFT
RK-DK1	Dai-Tokyo root	Ramkamhang, BKK	DFT
RK-DK2	Dai-Tokyo root	Ramkamhang, BKK	DFT
RK-DK3	Dai-Tokyo root	Ramkamhang, BKK	DFT
RKPG-NS	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



Pythium sp. Bi-culture Antagonist *Pythium* sp. Bi-culture Antagonist

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 x 10^6 spore/ml โดยใช้ haemacytometer จากนั้นนำรากพืชแช่ใน spore suspension ดังกล่าวเป็นเวลา 5 นาที โดยใช้ในปริมาณ 10 มิลลิลิตรต่อต้น จากนั้นเทลงในระบบปลูก

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 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 พบว่าความอยู่รอดของเชื้อสาเหตุโรคที่รากพืชมีสูงที่สุดในกรรมวิธีที่ปลูกเชื้อสาเหตุโรคเพียงอย่างเดียว และสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีที่มีการใช้เชื้อราปฏิปักษ์ร่วมด้วย แสดงว่าเชื้อราปฏิปักษ์มีผลในการยับยั้งและทำให้ความอยู่รอดของเชื้อสาเหตุโรคลดลง อย่างไรก็ตาม เชื้อ *Pythium* spp. ก็ยังพบในรากของพืชปกติได้ในปริมาณเพียงเล็กน้อย ซึ่งอาจจะเป็น non-pathogenic *Pythium* spp. (ตารางที่ 2.5) ส่วนความอยู่รอดของเชื้อราปฏิปักษ์ ที่รากพืชมีความสัมพันธ์กันในทางลบ (negative correlation) กับปริมาณความอยู่รอดของเชื้อสาเหตุโรค *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 และสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกรรมวิธีที่ปลูกเชื้อสาเหตุโรคอย่างเดียว 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 สำหรับกรรมวิธีที่ใส่เชื้อสาเหตุโรคอย่างเดียวแม้ว่าจะแสดงอาการโรคสูงสุด แต่พืชในกลุ่มนี้สามารถปรับตัวและงอกรากขึ้นมาใหม่ได้ ส่งผลให้การเจริญเติบโตด้านน้ำหนักสด สูงขึ้นมาได้ระดับหนึ่ง (ตารางที่ 2.6) น่าจะเป็นผลมาจากสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมต่อการพัฒนาการของโรคนี้ เช่น อุณหภูมิในสารละลายธาตุอาหารอยู่ในช่วง 25-28 องศาเซลเซียส อีกทั้งอายุของพืชเกินระยะที่จะอ่อนแอ (susceptible) ต่อโรคนี้

ตารางที่ 2.4 แสดงการเกิดโรครากเน่าของผักสลัดจากเชื้อ *Pythium* spp. ในระบบ DRFT

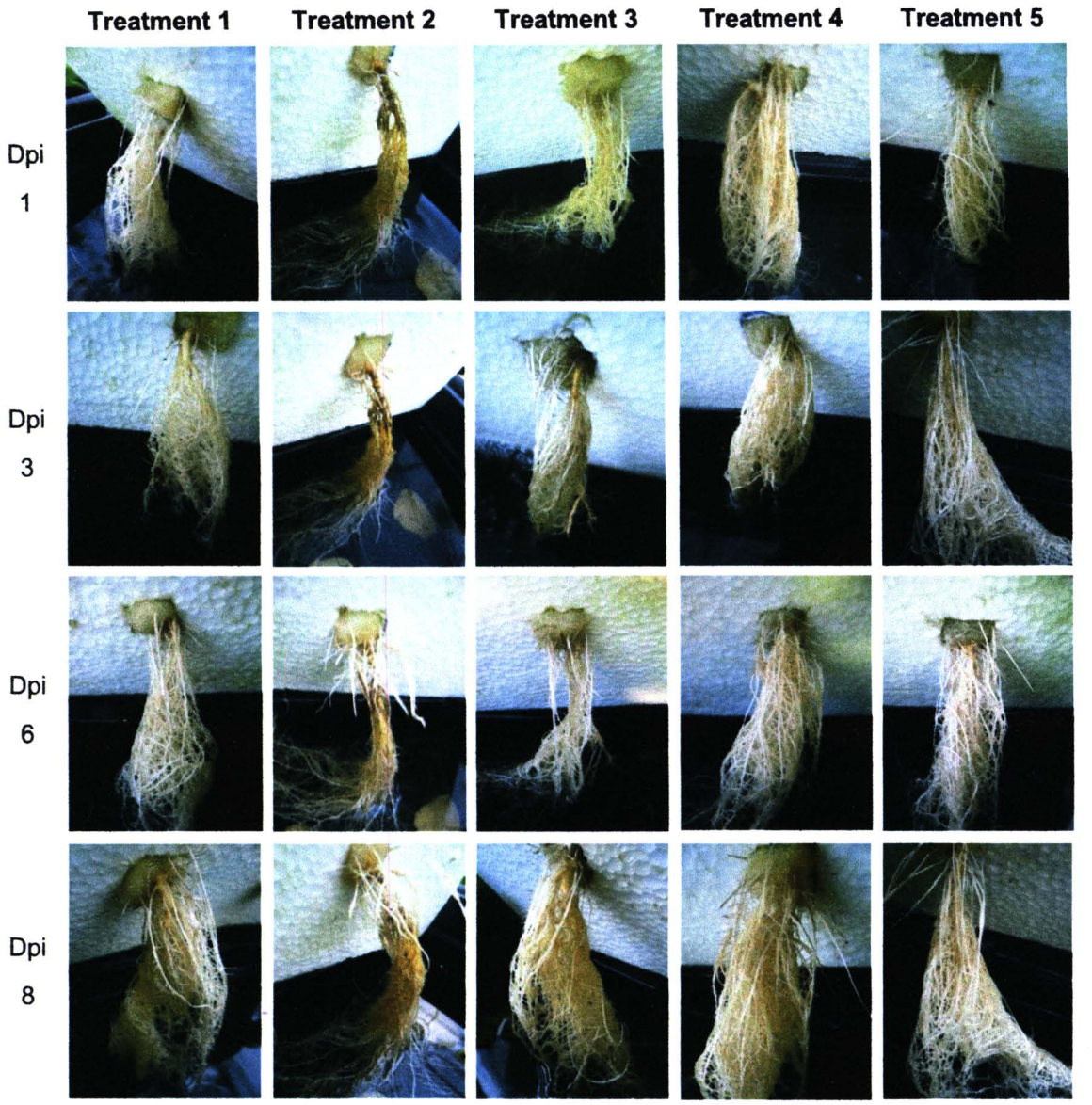
Treatment[1/]	Disease severity[2/] (1st inoculation)							
	Dpi 1	Dpi 2	Dpi 3	Dpi 4	Dpi 5	Dpi 6	Dpi 7	Dpi 8
T1 (Healthy control)	0.0c[3/]	0.0d	0.0d	0.0d	0.0c	0.0c	0.2c	0.2c
T2 (*Pythium* spp.)	2.7a	2.7a	2.3a	2.1a	1.9a	1.9a	2.2a	2.5a
T3 (A003+*Pythium* spp.)	2.2ab	2.3ab	2.1ab	1.7ab	1.4ab	1.3b	1.4b	1.7b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

Treatment[1/]	Disease severity[2/] (2nd 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 (*Pythium* spp.)	2.8a	2.6a	2.9a	2.4a	2.4a	2.5a	2.4a	2.2a
T3 (A003+*Pythium* spp.)	2.2b	1.9b	1.7b	1.5b	1.4b	1.4b	1.4b	1.2b
T4 (A018+*Pythium* spp.)	2.3b	1.4b	1.2b	1.3b	1.1b	1.2b	1.4b	1.3b
T5 (A019+*Pythium* spp.)	1.9b	1.8b	1.5b	1.6b	1.7ab	1.7b	1.5b	1.1b

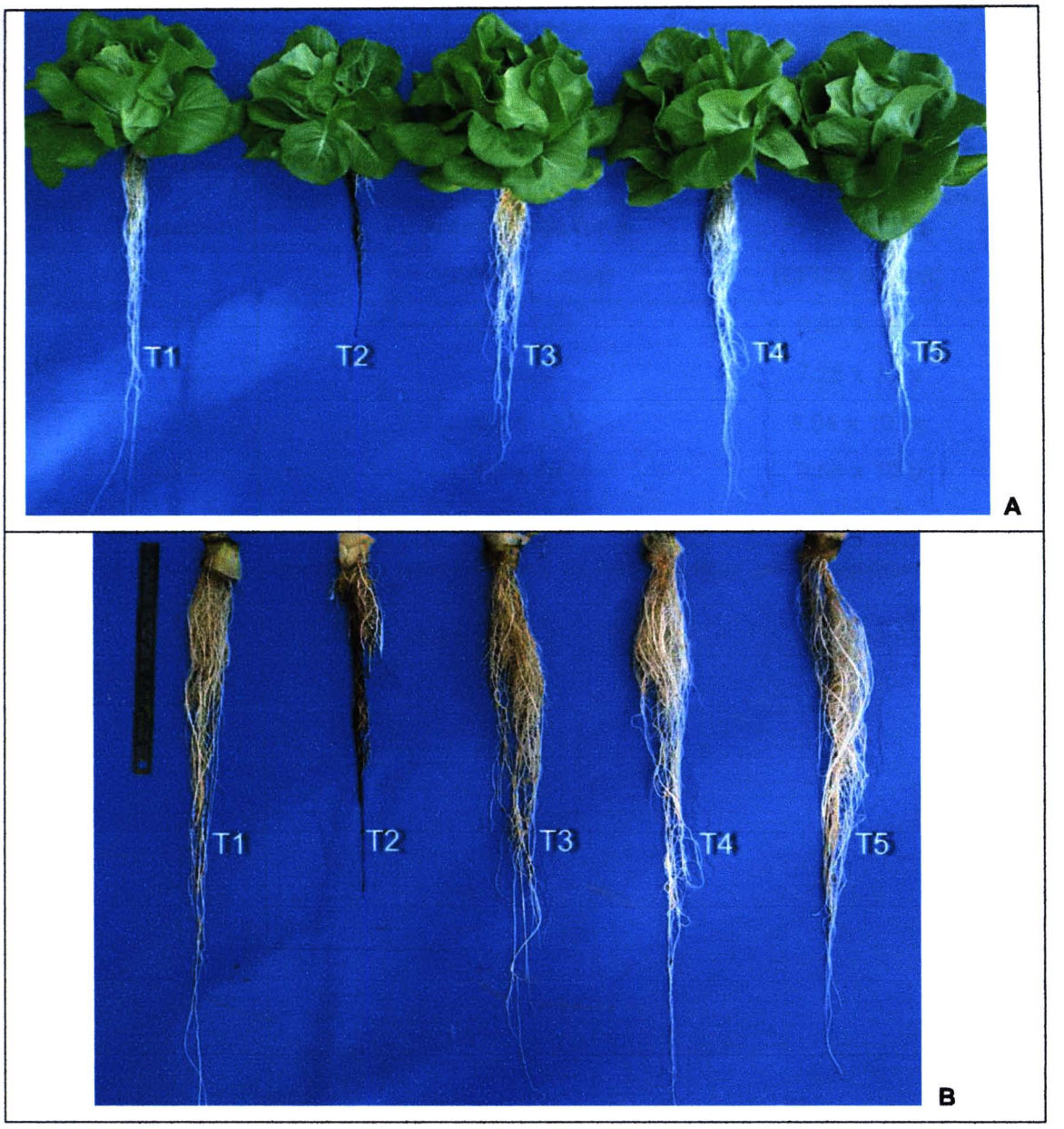
[1/]Pathogen was inoculated twice on 18 days, 28 days after seeding. Antagonistic fungi were treated on 16 days after seeding. Dpi = Days post 2nd inoculation

[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 หลังจากปลูกเชื้อสาเหตุโรครั้งที่ 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)	*Pythium* 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

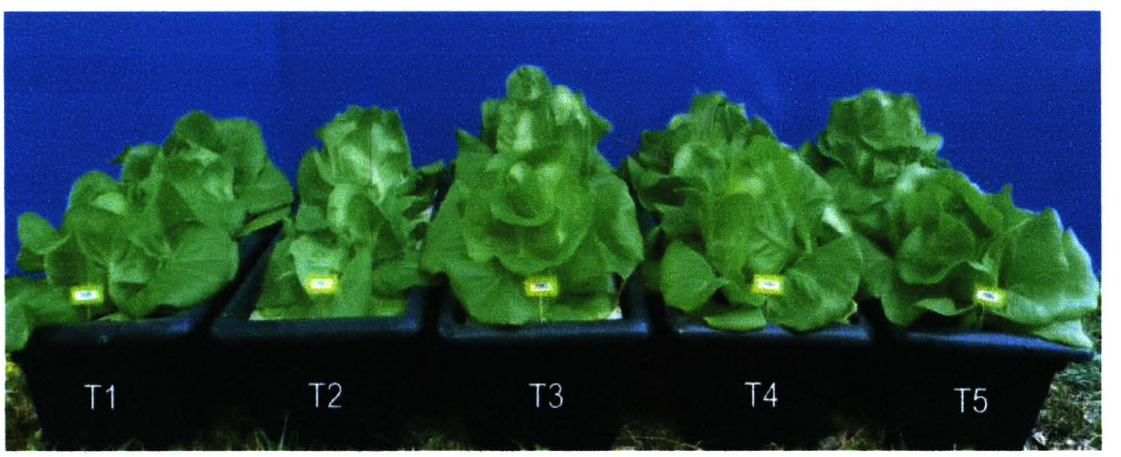
[1/] Means of 5 replications. Means in a column followed by the same letter are not significantly different according to DMRT.

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 ที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ในการควบคุมโรครากเน่าของผักสลัด



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 และสารละลายธาตุอาหารพืชจากแหล่งผลิตผักไฮโดรโพนิกส์ ศูนย์วิจัยและพัฒนาเขาหินซ้อน โครงการส่วนพระองค์ จ. ฉะเชิงเทรา แหล่งผลิตผักไฮโดรโพนิกส์ของเกษตรกร อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา และ โครงการส่วนพระองค์ลูกพระดาบส 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) ฟินเล่ย์ 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 แช่ลงในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 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 ดูด suspension ของแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร กระจาย (spread) ให้ทั่วบนอาหารแข็ง nutrient agar (NA) และ King's medium B บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (28-30 ^{0}C) นาน 24-72 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งมีโคโลนีของแบคทีเรียเจริญขึ้นมา เลือกเก็บโคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญอยู่บนอาหารมาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ โดยการ cross streak plate บนอาหาร NA จานใหม่ 2-3 รอบเพื่อใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพขั้นต่อไป

2) การแยกเชื้อแบคทีเรียจากภายในราก

แยกเชื้อแบคทีเรียจากราก โดยนำรากผักแต่ละชนิด ตัวอย่างละ 5 กรัม แช่ลง clorox 10% นาน 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 2-3 ครั้ง นำรากพืชแต่ละชนิดไปบดด้วยโกร่งปลอดเชื้อ โดยเติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 9 มิลลิลิตร ใช้ micropipette ดูด suspension ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร กระจาย (spread) ให้ทั่วบนอาหารแข็ง NA จากนั้นนำไปบ่มไว้ที่

อุณหภูมิห้อง (28-30 ^{0}C) นาน 24-72 ชั่วโมง เลือกเก็บโคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญอยู่บนอาหารมาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์เช่นเดียวกับวิธีการข้อ 3.1.1 เพื่อใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพขั้นต่อไป

3) การแยกเชื้อแบคทีเรียจากสารละลายธาตุอาหารพืช

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

3.1.2 จัดกลุ่มแบคทีเรียที่มีประโยชน์

นำเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดที่รวบรวมได้จากการแยกเชื้อบริเวณผิวใบ ผิวราก ภายในราก และสารละลายธาตุอาหารพืชมาจัดกลุ่มสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรีย โดยการจำแนกกลุ่มตามลักษณะพื้นฐานทางด้านสัณฐานวิทยาของโคโลนี (รูปร่าง ขนาด และสี) ที่เจริญบนผิวหน้าอาหารบนอาหาร NA

ผลการทดลอง

3.1.1 การแยกเชื้อและจัดกลุ่มแบคทีเรียที่มีประโยชน์

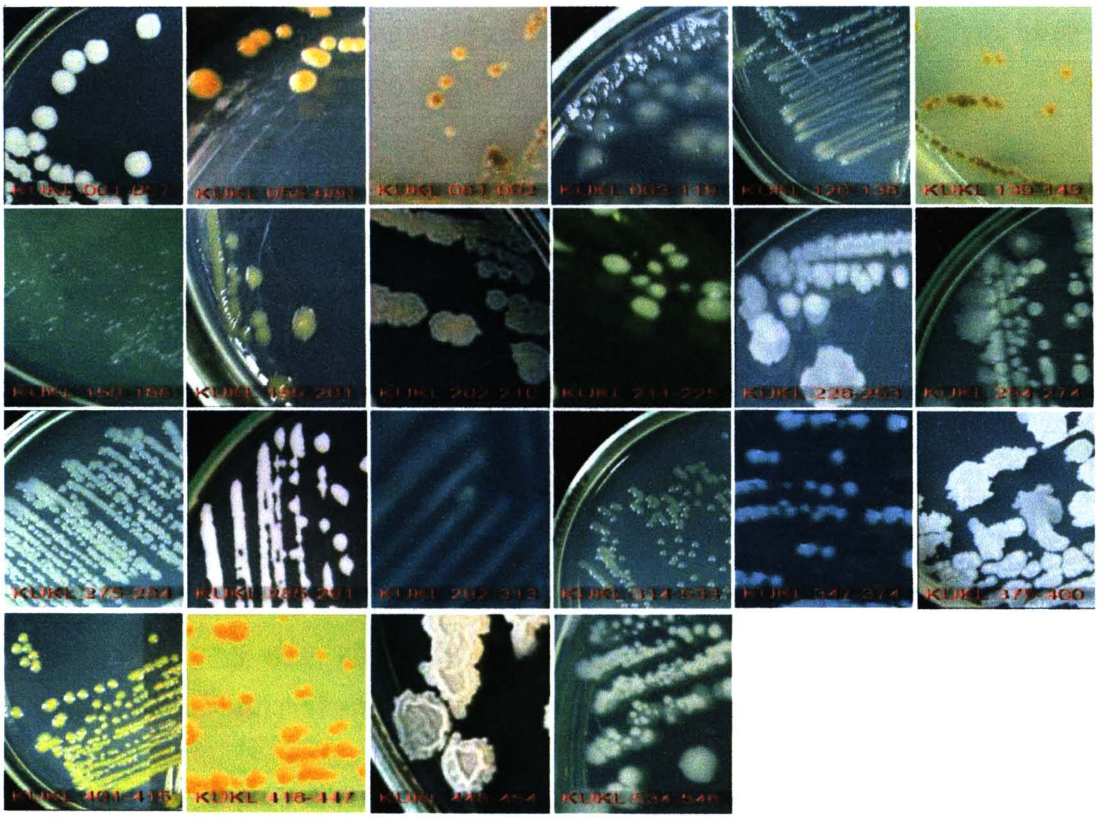
การแยกสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์จากส่วนต่างๆ ของผักที่เก็บจากแหล่งผลิตผักในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน โดยเก็บผักที่มีความสมบูรณ์ไม่แสดงอาการเป็นโรคใดๆ รวมทั้งสารละลายธาตุอาหารในระบบดังกล่าว ทั้งหมดจำนวน 10 ชนิด รวม 32 ตัวอย่าง พบว่าสามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดได้ 468 ไอโซเลท และสามารถจำแนกกลุ่มอย่างหยาบ 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 กลมตรงกลางบุ๋ม 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 เจาะชิ้นวุ้นบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อราสาเหตุโรค ย้ายไปวางตรงกลางอาหารเลี้ยงเชื้อบนอาหาร PDA จานใหม่ ใช้ loop ที่ฆ่าเชื้อแล้วแตะโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ขีดลงบนจานเลี้ยงเชื้อราทดสอบข้างต้นให้มีระยะห่างจากเชื้อราสาเหตุโรค 2 เซนติเมตร ทั้งสองข้าง บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 48-72 ชั่วโมง วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเชื้อราที่เจริญได้เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่มีการเลี้ยงเชื้อราอย่างเดียว โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง = 100-[เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีที่วัดได้ x 100 / เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี control (90 mm)] จากนั้นทำการคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์คุณภาพที่มี

ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราทั้งในลักษณะการผลิตสารปฏิชีวนะ และการเจริญแข่งขันไปทดสอบในขั้นตอนต่อไป

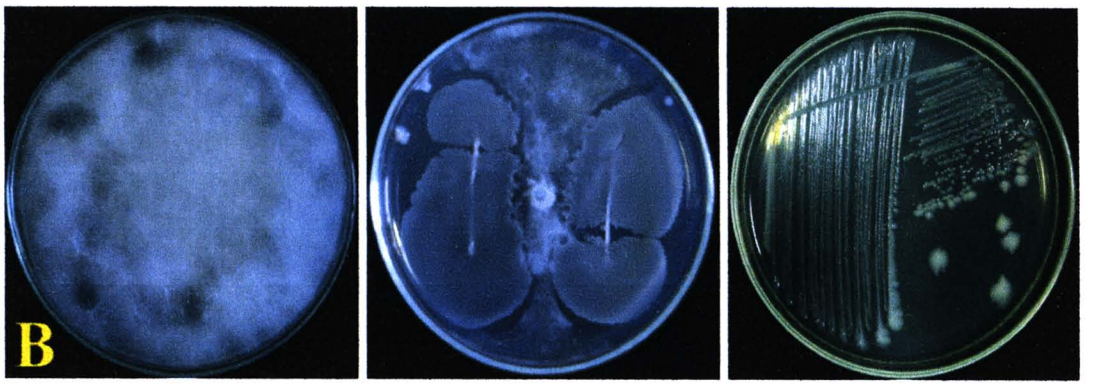
ผลการทดลอง

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียจำนวน 468 ไอโซเลท ที่แยกได้จากส่วนต่างๆ ของพืชและสารละลายธาตุอาหารในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Pythium* spp. ด้วยวิธี dual culture technique พบว่า แบคทีเรียไอโซเลท KUKL205 ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มที่ 9 มีลักษณะโคโลนีสีเหลืองอ่อน ตรงกลางเข้ม รูปร่างไม่แน่นอน มันวาว และแยกได้จากใบสะระแหน่ (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, และ18 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_2O	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 เพื่อจะนำมาใช้เป็นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อ *Pythium* spp. พบว่า เชื้อแบคทีเรีย จำนวน 9 ไอโซเลท ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรค โดยมีไอโซเลท KUKL205 ที่แยกได้จากใบสาระแหน่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยได้สูงสุดถึง 87.9 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น จึงควรนำไปทดสอบต่อในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินต่อไป

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

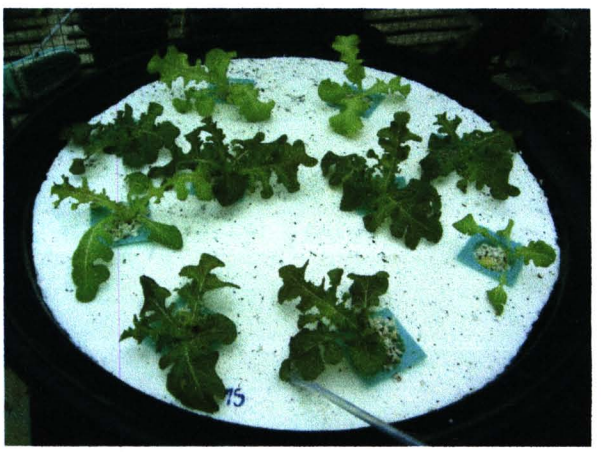
การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อนำเชื้อแบคทีเรียเขตรากพืชซึ่งแสดงศักยภาพที่ดีในห้องปฏิบัติการ ที่ได้มาจากการทดลองข้างต้น (KUKL205) มาประเมินประสิทธิภาพในการควบคุมโรค Pythium root rot ของผักสลัดในระบบ DRFT โดยเปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตที่ได้รับการเผยแพร่แล้ว (SP007s) (Prathuangwong, 2007) และ elicitor (salicylic acid) โดยมีการวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design 3 ซ้ำๆ ละ 20 ต้น ซึ่งมีวิธีการดังนี้ 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 ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง 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 x 10^5 sporangium/ml ในปริมาณ 10 มิลลิลิตรต่อต้น ในระหว่างการปลูกมีการตรวจและปรับค่า pH และ EC ของสารละลายธาตุอาหารของพืช

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

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

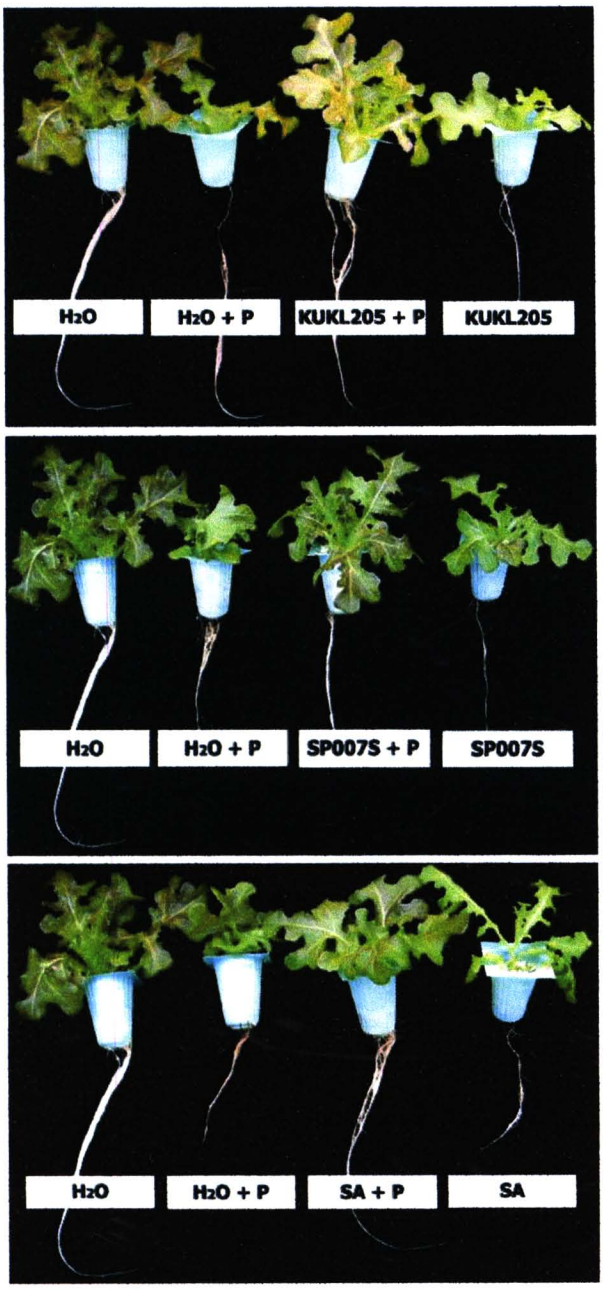


ภาพที่ 3.3 ระบบ DRFT ที่ใช้ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียเขตรากพืช

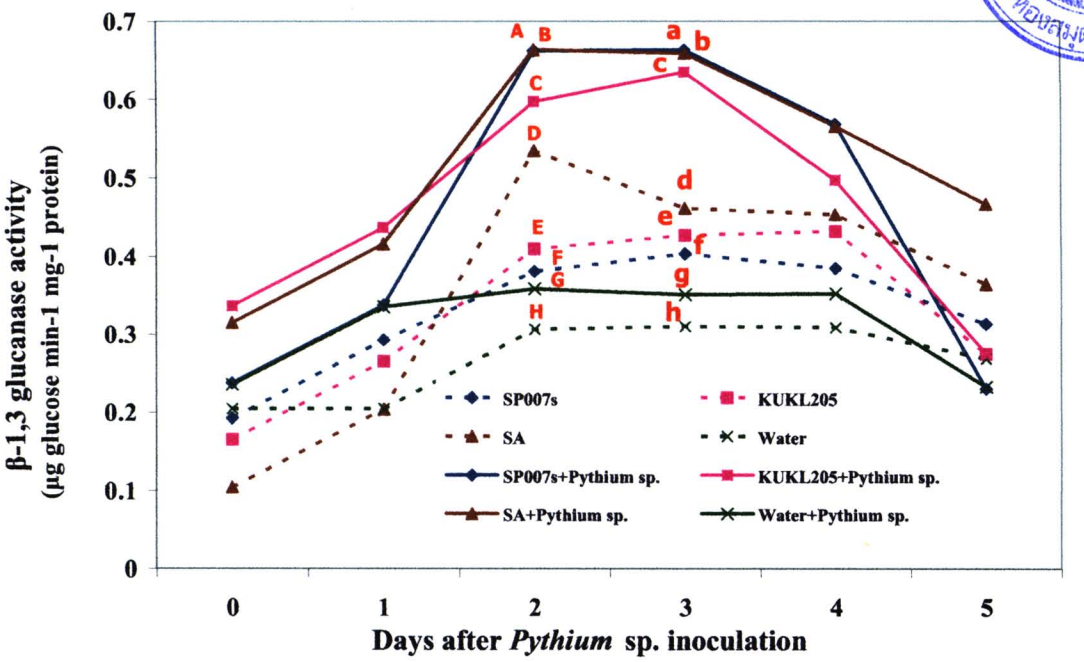
ผลการทดลอง

พืชที่มีการคลุกเมล็ดด้วยแบคทีเรียเขตรากพืชทุกกรรมวิธีไม่แสดงอาการรากเน่า เมื่อเปรียบเทียบกับพืชที่ไม่ได้มีการคลุกเมล็ดและมีการปลูกเชื้อ แต่อย่างไรก็ตามผลของการคลุกเมล็ดด้วยแบคทีเรียเขตรากพืชไม่ได้ดีไปกว่าพืชปกติ (ภาพที่ 3.4)

สำหรับการสะสมเอนไซม์ ß- 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 ในผักสลัดที่คลุกและไม่คลุกเมล็ดด้วยแบคทีเรียเขตรากพืช (KUKL205 และ SP007s) และ elicitor (SA) เป็นเวลา 6 วัน (เริ่มหลังจากปลูกเชื้อสาเหตุโรค)

สรุปผลการทดลอง

นำเชื้อแบคทีเรียเขตรากพืช KUKL205 ซึ่งแสดงศักยภาพที่ดีในห้องปฏิบัติการ ที่ได้มาจากการทดลองข้างต้น มาประเมินประสิทธิภาพในการควบคุมโรค Pythium root rot ของผักสลัดในระบบ DRFT โดยเปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตที่ได้รับการเผยแพร่แล้ว (SP007s) พบว่าการคลุกเมล็ดด้วย KUKL205 สามารถลดความรุนแรงของโรค (disease severity) ได้ เมื่อเปรียบเทียบกับพืชที่ไม่ได้มีการคลุกเมล็ดและมีการปลูกเชื้อ (Inoculated control) แต่อย่างไรก็ตามผลของการคลุกเมล็ดด้วยแบคทีเรียเขตรากพืชไม่ได้ดีไปกว่าพืชปกติ

การคลุกเมล็ดด้วยแบคทีเรียเขตรากพืชทุกตัวรวมทั้ง KUKL205 มีการสะสม defense-related enzyme ß- 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 x 10^6 spore/ml ปริมาตร 10 มิลลิลิตรต่อต้น จากนั้นเทลงในระบบปลูก

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 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 บันทึกความอยู่รอดของเชื้อสาเหตุโรคและเชื้อราปฏิปักษ์
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 ที่ใช้ทดสอบประสิทธิภาพร่วมของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราปฏิปักษ์เขตรากพืชชนิดใหม่จากระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน (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 ถึงแม้ว่าเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์จะสามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ที่รากพืชและในสารละลายที่ธาตุอาหารพืชจนถึงวันเก็บเกี่ยว 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

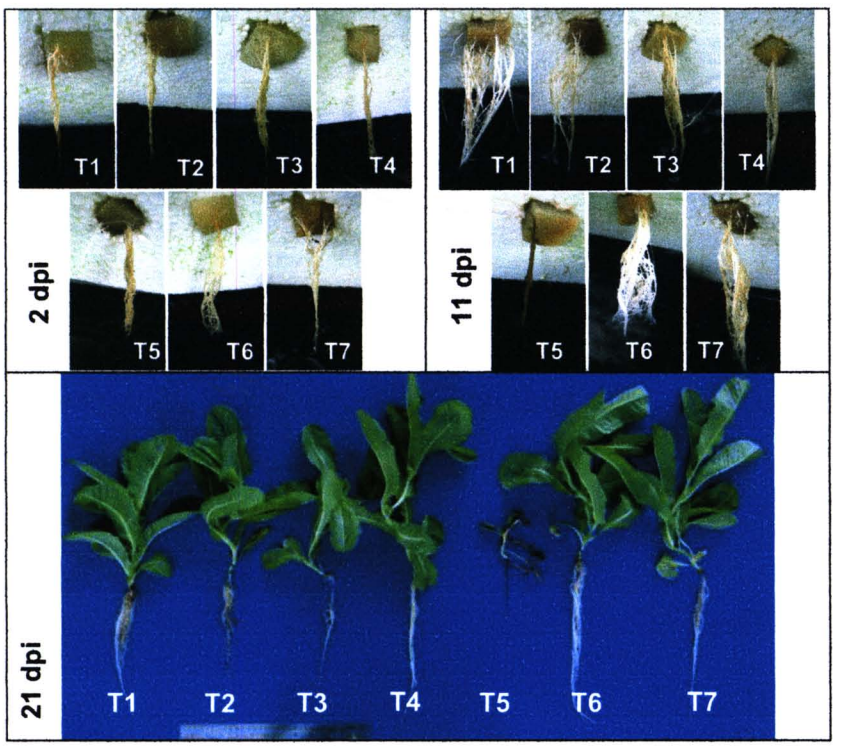
ภาพที่ 4.4 แสดงการเจริญเติบโตของผักสลัด Cos ทุกกรรมวิธีในระบบ DRFT สำหรับด้านการเจริญเติบโตและผลผลิตของพืชดังกล่าว โดยเฉพาะน้ำหนักสดของต้น ผลการทดลองเป็นที่น่าแปลกใจอย่างยิ่งซึ่งไม่สอดคล้องกับผลทางด้านโรค กล่าวคือ ใน T3 (KUKL205 + antagonistic fungus A018) ซึ่งพืชแสดงความรุนแรงของโรคต่ำกลับให้ผลผลิตไม่ดีและต่ำกว่า 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

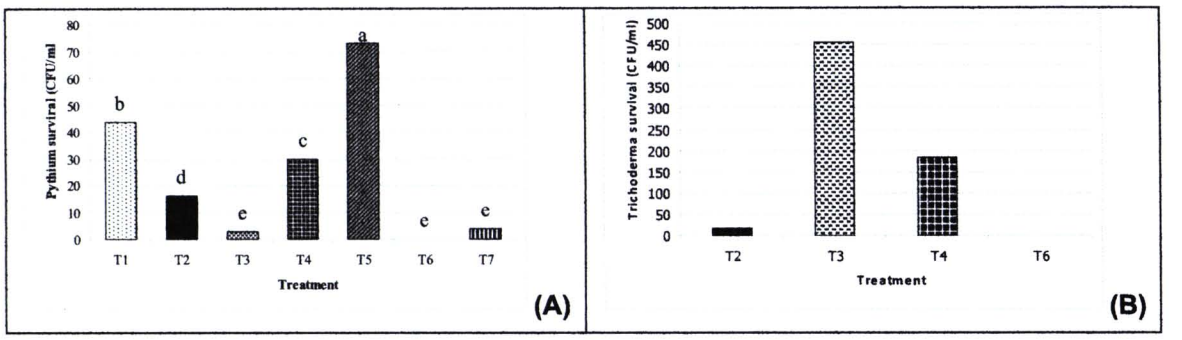
Treatment	Disease severity[1/]				
	1 dpi	2 dpi	4 dpi	11 dpi	21 dpi (at harvest)
T1 (KUKL205-seed treatment)	0.80ab[2]	1.90b	1.90b	2.20ab	1.30ab
T2 (KUKL205-seed treatment + A003 in NS)	1.00ab	1.80b	1.80b	1.40ab	1.10ab
T3 (KUKL205-seed treatment + A018 in NS)	0.80ab	1.40b	1.90b	2.60ab	1.90b
T4 (KUKL205-seed treatment + A019 in NS)	1.20ab	1.20b	1.40ab	2.80ab	1.80b
T5 (Inoculated control)I	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

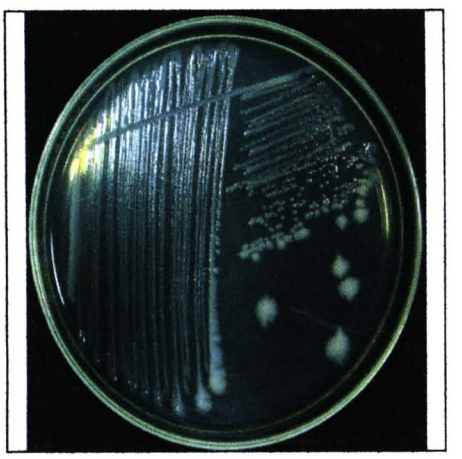
จากวัตถุประสงค์ของการทดลองในส่วนนี้ เพื่อพัฒนาประสิทธิภาพการควบคุมโรค Pythium root rot โดยชีววิธีให้สูงขึ้น จึงได้นำเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อราเขตรากพืชชนิดใหม่ (new obtained indigenous antagonists) ที่ได้รับผลดีจากการทดลองที่ 2 และ 3 ได้แก่ KUKL205 และ เชื้อรา ปฏิปักษ์ 3 ไอโซเลท มาใช้ร่วมกันเพื่อประเมินประสิทธิภาพร่วม (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) แต่อย่างใด 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

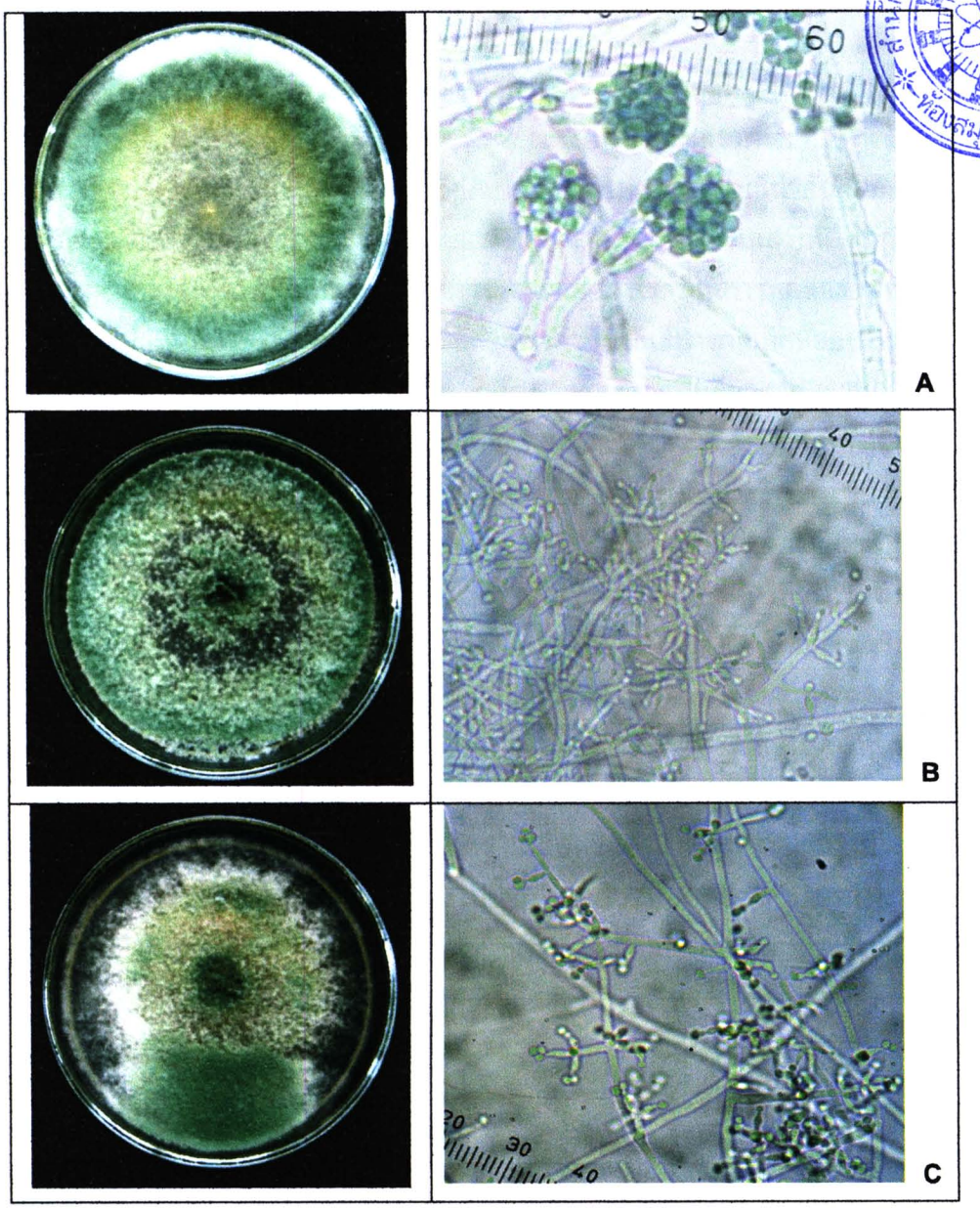
จากโครงการวิจัยนี้ ผลลัพธ์ที่ได้คือ เชื้อจุลินทรีย์เขตรากพืชที่เป็นประโยชน์ซึ่งแยกได้จากระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินและได้ผ่านการทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรครากเน่าของผักสลัดที่เกิดจากเชื้อ *Pythium* spp. ทั้งในสภาพห้องปฏิบัติการและในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน และทำการจัดจำแนกเชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าวตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมี

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