รายงานการวิจัย

เรื่อง

การควบคุมโรคโคนเน่ารากเน่าจากเชื้อราของพรรณไม้น้ำสกุลอนูเบียสในระบบปลูกพืชแบบไร้ดินโดยชีววิธี

Biological control in stem and root rot from fungus of *Anubias* spp. in hydroponics system

โดย

รศ. ดร. นงนุช เลาหะวิสุทธิ์ สาขาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง

ผศ. ดร. พรหมมาศ คูหากาญจน์ สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช

ผศ. สมเกียรติ สีสนอง สาขาวิชาพัฒนาการเกษตรและการจัดการทรัพยากร

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2553

รายงานการวิจัย

เรื่อง

การควบคุมโรคโคนเน่ารากเน่าจากเชื้อราของพรรณไม้น้ำสกุลอนูเบียสในระบบปลูกพืชแบบไร้ดินโดยชีววิธี

Biological control in stem and root rot from fungus of *Anubias* spp. in hydroponics system

12776282

โดย

นางนงนุช เลาหะวิสุทธิ์ สาขาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง

นายพรหมมาศ คูหากาญจน์ สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช

นายสมเกียรติ สีสนอง สาขาวิชาพัฒนาการเกษตรและการจัดการทรัพยากร

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2553

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ทำซ้ำ ดัดแปลง หรือนำไปใช้ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการวิจัย **การควบคุมโรคโคนเน่ารากเน่าจากเชื้อราของพรรณไม้น้ำสกุลอนูเบียสในระบบปลูกพืชแบบไร้ดินโดยชีววิธี**
Biological control in stem and root rot from fungus of *Anubias* spp. in hydroponics system

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก งบประมาณแผ่นดิน **ประจำปี** 2553
จำนวนเงิน 300,000 บาท
ระยะเวลาที่ทำการวิจัย เดือนตุลาคม 2552 – เดือนกันยายน 2553

หน่วยงานและผู้ดำเนินการการวิจัย รศ.ดร.นางนงนุช เลาหะวิสุทธิ์ **E-mail**:klnongnu@kmitl.ac.th
หลักสูตรวิทยาศาสตร์การประมง
สาขาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ถนนฉลองกรุง เขตลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร 10520
โทร. 0-2329-8517 โทรสาร 0-2329-8517

การควบคุมโรคโคนเน่ารากเน่าจากเชื้อราของพรรณไม้น้ำสกุลอนูเบียสในระบบปลูกพืชแบบไร้ดินโดยชีววิธี

นงนุช เลาหะวิสุทธิ์ พรหมมาศ คูหากาญจน์ และสมเกียรติ สีสนอง

บทคัดย่อ

การศึกษาโรคโคนเน่ารากเน่าจากเชื้อราของพรรณไม้น้ำสกุลอนูเบียสในระบบปลูกพืชแบบไร้ดิน โดยประกอบด้วย การสำรวจเชื้อราจากเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำสกุลอนูเบียส การทดลองความสามารถในการทำให้เกิดโรคและประสิทธิภาพของชีวผลิตภัณฑ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา การสำรวจเชื้อราจากเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำสกุลอนูเบียส พบว่า การแยกและจำแนกเชื้อราจากเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำสกุลอนูเบียสได้เชื้อรา *Pythium* sp. และเชื้อรา *Fusarium* sp. การทดลองความสามารถในการทำให้เกิดโรค จากการ inoculation เชื้อรา *Fusarium* sp. และเชื้อรา *Pythium* sp. ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำสกุลอนูเบียส พบว่า การ inoculation ด้วยวิธี patch inoculation สัมผัสกับพรรณไม้น้ำ พบว่าเชื้อรา *Fusarium* sp. ไม่ทำให้ต้นพรรณไม้น้ำ *Anubias barteri* “broad leaf” เกิดโรค การ inoculation ด้วยวิธี spore suspension ที่มีผลในการเกิดโรคของพรรณไม้น้ำสกุลอนูเบียส พบว่าเชื้อรา *Fusarium* sp. ไม่ทำให้ต้น *Anubias barteri* “broad leaf” เกิดโรค การ inoculation ด้วยวิธีการใช้ส่วนของเชื้อราวางบริเวณโคนต้น ที่มีผลในการเกิดโรคของพรรณไม้น้ำสกุลอนูเบียส เชื้อรา *Pythium* sp. ไม่ทำให้ต้น *Anubias barteri* “broad leaf” เกิดโรคและการทดลองประสิทธิภาพของชีวผลิตภัณฑ์ (เชื้อรา *Trichoderma harzianum*) ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pythium* sp. ANBR754-1 ในสภาพห้องปฏิบัติการ พบว่าชีวผลิตภัณฑ์ของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pythium* sp. ANBR754-1 ได้ภายในระยะเวลา 8 วัน โดยที่ความเข้มข้น 10^5 cfu/ml เชื้อรา *Trichoderma harzianum* มีการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pythium* sp. ANBR754-1 ที่เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 5.75 เซนติเมตร และที่ความเข้มข้น 10^6 cfu/ml เชื้อรา *Trichoderma*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

harzianum มีการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pythium* sp. ANBR754-1 ที่เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 6.13 เซนติเมตร
คำสำคัญ: ชีววิธี โรคโคนเน่ารากเน่า ต้นอนูเบียส การปลูกพืชไร้ดิน

Biological control in stem and root rot from fungus of *Anubias* spp. in hydroponics system

Nongnuch Laohavisuti, Prommart Koohakan and Somkiat Seesanong

Abstract

The study on biological control in stem and root rot from fungus of *Anubias* spp. in hydroponics system consists of one survey and two experiments. Experiments were conducted to investigate the ability to cause disease and efficiency of bio-product to inhibit fungus growth. Survey of stem and root rot from fungus of *Anubias* sp. in hydroponics system found that isolation and identification of stem and root rot from fungus of *Anubias* sp. were *Furasium* sp. and *Pythium* sp. The *Furasium* sp. and *Pythium* sp. isolates were assayed for *in vitro* pathogenicity using patch inoculation, spore suspension and placing these fungus closed to the Anubias stem. The result showed that *Anubias* sp. was not affected by the challenge of *Furasium* sp. and *Pythium* sp. isolates. The effectiveness of bio-product (*Trichoderma harzianum*) to inhibit growth of *Pythium* sp. ANBR754-1 was investigated in the laboratory. The result showed that *T. harzianum* has inhibited the growth of *Pythium* sp. ANBR754-1 within 8 days at 10^5 and 10^6 cfu/ml by the widest clear zones (5.75 and 6.13 cm, respectively).

Keywords: Biological control, stem and root rot, *Anubias* spp., hydroponics system

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	V
สารบัญภาพ	VII
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ตรวจเอกสาร	3
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	20
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์	23
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	30
เอกสารอ้างอิง	31

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การแยกเชื้อราจากพรรณไม้น้ำสกุลอนูเบียสที่แสดงอาการเน่า	23

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	พรรณไม้น้ำสกุลอนูเบียส	3
2	การปลูกพืชแบบไร้ดินในทรายหยาบ	4
3	การปลูกพืชแบบไร้ดินด้วยระบบ Nutrient film technique (NFT)	4
4	การปลูกพืชแบบไร้ดินด้วยระบบ Deep flow techniques (DFT)	5
5	การปลูกพืชแบบไร้ดินด้วยระบบ Floating system	5
6	สามเหลี่ยมโรคพืช (Disease triangle)	7
7	Classification of Fungi	9
8	แสดงรูปแบบต่างๆ ของวิธีการผ่านเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านโดยสปอร์ของเชื้อรา (zoospore) A = กรณีของ *Rozella allomycis*, B = *Olpidium brassicae*, C = *Chytridium* sp., D = *Phytophthora parasitica*, E = *Pythium aphanidermatum*, F = Plasmodiophorales (Ad = adhesorium, Ap = appressorium, cw = cyst wall, GT = germ tube, Ha = haustorium, Hy = hypha, pp = parasite protoplast, PT = penetration tube, Sch = sehlauch, st = satchel และ V = vacuole)	11
9	A-F *Pythium solare.* (A-C) oogonia มี spine ยาว, ไม่แหลม, คล้ายนิ้วมือ, บาง spine มีผนังกั้น (A-B) หรือแตกแขนง (B-C) (D-F) Hyplal พอง, กับ spine (D) หรือเรียบ (E-F) : Bar = 10 µm	13
10	รายละเอียดของ *Pythium undulatum* : a.เส้นใยยึดเกาะกับอาหาร ; b.hyphae โค้งพองฝังในอาหาร ; c.การพัฒนา chlamydospores ; d.การเจริญเติบโตของ sporangia ที่ hypha ; e,f.การเจริญเติบโตของ sporangia ในอาหาร ; g.การแพร่พันธุ์ภายใน sporangium : Bar = 10 µm	14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อ

และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
11	เชื้อรา Fusarium sp. (A) ลักษณะอาการ (B) กาบใบเน่า (C) โคโลนี (D) hypha และ mycelium และ (E) spore	24
12	เชื้อรา *Pythium* sp. (A) ลักษณะอาการ (B) รากเน่า (C) โคโลนี และ (D) hyphae และ mycelium	25
12	เชื้อรา *Pythium* sp. (A) ลักษณะอาการ (B) รากเน่า (C) โคโลนี และ (D) hyphae และ mycelium	25
13	patch inoculation (A) Control (B) ต้นพรรณไม้น้ำ *Anubias broad leaf* ที่ไม่มีการทำให้เกิดแผล และ (C) ต้นพรรณไม้น้ำ *Anubias broad leaf* ที่ใช้เข็มเจาะให้เกิดแผล	27
14	spore suspension (A) Control (B) ต้นพรรณไม้น้ำ *Anubias broad leaf* ที่ไม่มีการทำให้เกิดแผล และ (C) ต้นพรรณไม้น้ำ *Anubias broad leaf* ที่ใช้เข็มเจาะให้เกิดแผล	28
15	(A) Control (B) ต้นพรรณไม้น้ำ *Anubias broad leaf* ที่วาง agar plug ของเชื้อรา *Pythium* sp. บริเวณโคนต้น	28
16	ประสิทธิภาพของชีวผลิตภัณฑ์ของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pythium* sp. ANBR754-1 ;(A) เชื้อรา *Pythium* sp. ANBR754-1 (B) ความเข้มข้น 10^5 cfu/ml และ(C) ความเข้มข้น 10^6 cfu/ml	29

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1 บทนำ

พรรณไม้น้ำ เป็นพืชที่อาศัยและมีการเจริญเติบโตอยู่ในน้ำ โดยอาจจะอยู่ใต้น้ำทั้งหมด โผล่บางส่วนขึ้นมาอยู่เหนือน้ำ หรือเป็นพืชที่ขึ้นอยู่ตามริมน้ำ ชายตลิ่ง นอกจากนี้ยังรวมถึงพืชที่เจริญเติบโตอยู่ในบริเวณที่ลุ่มน้ำขังหรือที่ชื้นแฉะ (กาญจนรี, 2543) พรรณไม้น้ำจัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่ได้รับความนิยมเป็นอย่างมาก ซึ่งสามารถนำมาจัดตกแต่งตู้ปลาเพื่อเพิ่มความสวยงามได้ จึงเป็นที่ต้องการของตลาดทั้งในและต่างประเทศ หนึ่งในนั้นคือ พรรณไม้น้ำอนูเบียส จัดเป็นพืชมีดอก ใบเลี้ยงคู่ เป็นพืชล้มลุกอายุหลายฤดู มีต้นเป็นแท่งใต้ดิน มีกาบประดับลักษณะคล้ายใบสีน้ำตาลขาว ชอบขึ้นในที่ร่ม ชื้นแฉะ และมีความชื้นสูง ในปัจจุบันนิยมปลูกพรรณไม้น้ำแบบไร้ดิน เป็นการปลูกพืชเพื่อให้พืชได้รับสารอาหารหรือสารละลายธาตุอาหารพืชที่มีน้ำผสมกับธาตุอาหารที่พืชต้องการจากทางรากพืช โดยพืชที่ปลูกนั้นจะปลูกลงบนวัสดุปลูกหรือไม่ต้องมีวัสดุปลูกก็ได้ ซึ่งการปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินมีข้อดี ได้แก่ สามารถปลูกพืชในบริเวณพื้นที่ที่ดินไม่ดีหรือสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมต่อการเพาะปลูก ใช้พื้นที่ปลูกน้อยและสามารถผลิตได้อย่างสม่ำเสมอ ประหยัดเวลา แรงงาน และค่าใช้จ่ายในการเตรียมดิน สามารถปลูกพืชได้อย่างต่อเนื่องตลอดปีในพื้นที่เดียวกัน พืชเจริญเติบโตได้เร็วและให้ผลผลิตที่เร็วกว่าการปลูกพืชแบบธรรมดาอย่างน้อย 2 สัปดาห์ ตัดปัญหาเกี่ยวกับศัตรูพืชที่เกิดจากดิน สามารถใช้น้ำและธาตุอาหารพืชอย่างมีประสิทธิภาพ เช่น ใช้น้ำลดลงไม่ต่ำกว่า 10 เท่าของการปลูกพืชแบบธรรมดา สามารถควบคุมสภาพแวดล้อมต่างๆ ที่เกี่ยวกับการเจริญของพืชได้อย่างถูกต้อง แน่นอนและรวดเร็ว โดยเฉพาะในระดับรากพืช ได้แก่ การควบคุมปริมาณธาตุอาหาร ความเป็นกรด-ด่าง (pH) อุณหภูมิ ความเข้มข้นของออกซิเจน ฯลฯ ซึ่งการปลูกพืชแบบทั่วไปทำได้ยาก (ดิเรก, 2548) แต่ปัจจุบันพบว่า เชื้อราเป็นปัญหาสำคัญในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินที่มีการหมุนเวียนนำเอาสารละลายส่วนเกินกลับมาใช้ใหม่ (recirculating system) ด้วย ถ้าหากมีการปนเปื้อนของเชื้อเข้าไปในระบบ (พรหมมาศ, 2539)

ในบรรดาสาเหตุที่ทำให้พืชเกิดโรคได้นั้น เชื้อรานับว่าเป็นจุลินทรีย์ที่มีมากชนิดที่สุดที่ทำให้พืชเป็นโรคได้ ตั้งแต่ระยะเมล็ด ต้นกล้า และส่วนต่างๆ ของต้นไม้ ได้แก่ ใบ กิ่ง ก้าน ดอก ผล ลำต้น โคนต้น และราก การทำลายของเชื้อราโดยเฉพาะส่วนของราก โคนต้น และลำต้น ซึ่งเป็นส่วนสำคัญของพืช เมื่อส่วนดังกล่าวเป็นโรคทำให้เกิดเซลล์ของเนื้อเยื่อเน่า เป็นการตัดการลำเลียงน้ำและอาหารสู่ส่วนบนของพืช ซึ่งเชื้อราเป็นปัญหาสำคัญในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินที่มีการหมุนเวียนนำเอาสารละลายส่วนเกินกลับมาใช้ใหม่ สามารถติดต่อและแพร่กระจายอยู่ในระบบหมุนเวียนสารละลายธาตุอาหารได้เป็นอย่างดี ซึ่งถ้าหากในขณะนั้นต้นพืชมีอาการอ่อนแอร่วมด้วย จะเป็นผลให้เชื้อเข้าไปทำลายได้โดยง่าย และส่งผลกระทบต่อผลผลิตเป็นอย่างมาก

ดังนั้นจึงได้ดำเนินการศึกษาเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรครากเน่าและโคนเน่ากับพรรณไม้น้ำอนูเบียสในระบบปลูกพรรณไม้น้ำแบบไร้ดิน และทดสอบการใช้เชื้อจุลินทรีย์และสารเคมีกำจัดเชื้อราควบคุมเชื้อราในพรรณไม้น้ำอนูเบียสในระบบปลูกพืชแบบไร้ดิน ซึ่งการใช้เชื้อจุลินทรีย์ควบคุมโรคพรรณไม้น้ำยังไม่มีการศึกษา จึงเป็นสิ่งที่จำเป็นเนื่องจากเชื้อรา มีผลก่อให้เกิดโรคแก่พรรณไม้น้ำ ซึ่งมีผล

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต่อการเจริญเติบโตของพรรณไม้น้ำสกุลอนูเบียส ทำให้ต้นทุนการผลิตสูงแต่ผลผลิตที่ได้ต่ำ และยังไม่ก่อให้เกิดสารตกค้างจากการใช้สารเคมีในการรักษาพรรณไม้น้ำ

1.1 วัตถุประสงค์

1.1.1 เพื่อจำแนกชนิดเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคโคนเน่าและรากเน่า

1.1.2 เพื่อหาประสิทธิภาพของชีวผลิตภัณฑ์ในการยับยั้งเชื้อราในสภาพ *in vitro*

1.1.3 เพื่อศึกษาชนิดของจุลินทรีย์ที่เป็นแบคทีเรีย และเชื้อราที่เหมาะสมต่อการควบคุมโรคโคนเน่าและรากเน่าที่มาจากเชื้อรา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2 ตรวจเอกสาร

2.1 พรรณไม้น้ำสกุลอนูเบียส

Anubias เป็นพรรณไม้น้ำและกึ่งน้ำ ชนิดดอก ใน Family *Araceae* เป็นไม้พื้นเมืองเขตร้อนทางตอนกลางและตะวันตกของ Africa พบได้ในแม่น้ำ ลำธารและยังสามารถพบในบึง ลักษณะโดยทั่วไป ใบกว้างและสีเข้มที่มาในหลายรูปแบบที่แตกต่างกัน ชนิดพันธ์สามารถแบ่งแยกได้โดยใช้ลักษณะของช่อดอก (http://aqua.c1ub.net/forum/lite.php?topic=46427.0) ซึ่งการเพาะปลูกพรรณไม้น้ำสกุลอนูเบียสในปัจจุบันนั้นจะนิยมเพาะปลูกด้วยระบบปลูกพืชแบบไร้ดิน

ภาพที่ 1 พรรณไม้น้ำสกุลอนูเบียส
ที่มา : http://www.akvarijni-rostliny.cz/images/echinodorus/barteri.jpg

2.2 ระบบการปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน

การปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน (Hydroponics system) คำว่า “Hydroponics” มาจากการรวมคำในภาษากรีกสองคำคือคำว่า “Hydro” หมายถึง “น้ำ” และ “Ponos” หมายถึง “งาน” เมื่อรวมคำสองคำเข้าด้วยกันแล้วความหมายก็คือ “Water working” หรือหมายถึง การทำงานของน้ำที่มีสารละลายธาตุอาหารผ่านรากพืช การปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินจึงหมายถึง วิธีการปลูกพืชเพื่อให้พืชได้รับสารอาหารหรือสารละลายธาตุอาหารพืชที่มีน้ำที่ผสมกับธาตุอาหารที่พืชต้องการจากทางรากพืช โดยพืชที่ปลูกนั้นจะปลูกลงบนวัสดุปลูกหรือไม่ต้องมีวัสดุปลูกก็ได้ ซึ่งการปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินมีข้อดี ได้แก่ สามารถปลูกพืชในบริเวณพื้นที่ที่ดินไม่ดีหรือสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมต่อการเพาะปลูก ใช้พื้นที่ปลูกน้อยและสามารถผลิตได้อย่างสม่ำเสมอ ประหยัดเวลา แรงงาน และค่าใช้จ่ายในการเตรียมดินและกำจัดวัชพืช สามารถปลูกพืชได้อย่างต่อเนื่องตลอดปีในพื้นที่เดียวกัน พืชเจริญเติบโตได้เร็วและให้ผลผลิตที่เร็วกว่าการปลูกพืชแบบธรรมดาอย่างน้อย 2 สัปดาห์ ตัดปัญหาเกี่ยวกับศัตรูพืชที่เกิดจากดิน สามารถใช้น้ำและธาตุอาหารพืช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

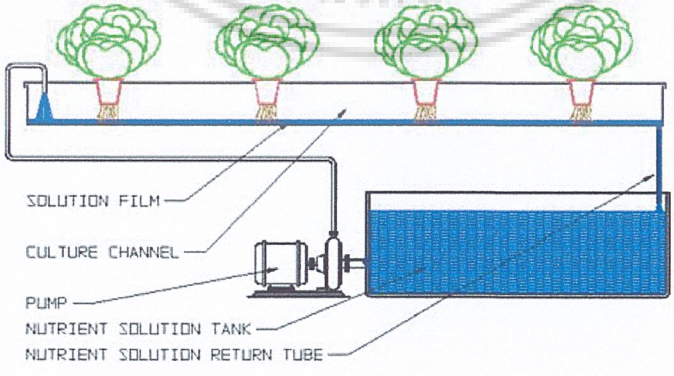
อย่างมีประสิทธิภาพ เช่น ใช้น้ำลดลงไม่ต่ำกว่า 10 เท่าของการปลูกพืชแบบธรรมดา สามารถควบคุมสภาพแวดล้อมต่างๆ ที่เกี่ยวกับการเจริญของพืชได้อย่างถูกต้อง แน่นอนและรวดเร็ว โดยเฉพาะในระดับรากพืช ได้แก่ การควบคุมปริมาณธาตุอาหาร ความเป็นกรด-ด่าง (pH) อุณหภูมิ ความเข้มข้นของออกซิเจน ฯลฯ ซึ่งการปลูกพืชแบบทั่วไปทำได้ยาก (ดิเรก, 2548) ซึ่งแบ่งได้ 2 แบบ คือ

2.2.1 การปลูกในทรายหยาบ (Coarse sand culture) เป็นการปลูกโดยใช้ทรายหยาบเป็นวัสดุปลูก ซึ่งกรวดมีคุณสมบัติอุ้มน้ำได้น้อยมาก เป็นสารเฉื่อยไม่ทำปฏิกิริยาเคมี ความพรุนระหว่างก้อนมาก และมีอายุการใช้งานนาน ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1-3 มิลลิเมตร และในการปลูกจะใช้ความหนาของทรายหยาบประมาณ 15-20 เซนติเมตร (ภาพที่ 2) (นงนุช, 2551)

ภาพที่ 2 การปลูกพืชแบบไร้ดินในทรายหยาบ

2.2.2 การปลูกในสารละลาย (Water culture) เป็นการปลูกโดยที่รากจะเจริญอยู่ในสารละลายธาตุอาหารพืชโดยไม่มีวัสดุปลูก (นงนุช, 2551)

2.2.2.1 ระบบ Nutrient film technique (NFT) เป็นการปลูกโดยให้สารละลายธาตุอาหารพืชไหลผ่านรากอย่างต่อเนื่องตลอดเวลา เป็นแผ่นฟิล์มที่มีความบางประมาณ 5 มิลลิเมตร ระบบนี้ประกอบรางปลูก ขนาดกว้าง 10 เซนติเมตร สูง 5 เซนติเมตร ยาว 4-8 เมตร (ภาพที่ 3)

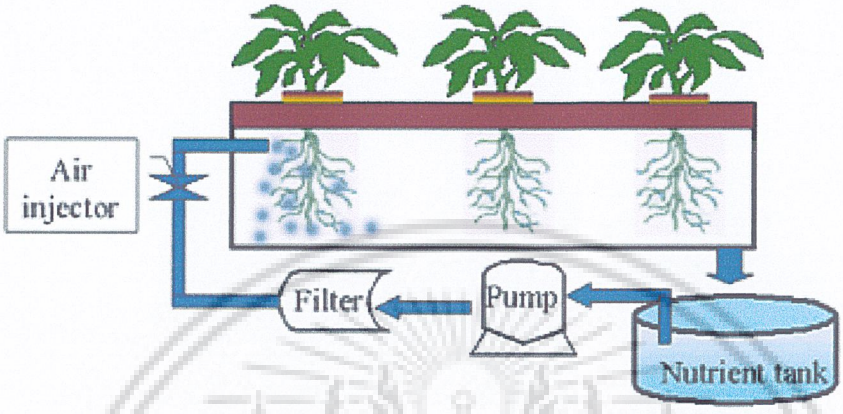


ภาพที่ 3 การปลูกพืชแบบไร้ดินด้วยระบบ Nutrient film technique (NFT)

ที่มา : http://images.google.co.th/imglanding

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2.2 ระบบ Deep flow techniques (DFT) เป็นการปลูกโดยที่รากแช่อยู่ในน้ำสูงประมาณ 3 เซนติเมตร ให้สารละลายธาตุอาหารพืชไหลผ่านช่องว่างภายในตลอดเวลา ซึ่งประกอบด้วยท่อปลูก ทำมาจากท่อ PVC สีขาว ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 นิ้ว ยาว 4-18 เมตร และด้านข้างของท่อเจาะรูเพื่อปลูกพรรณไม้น้ำ (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 การปลูกพืชแบบไร้ดินด้วยระบบ Deep flow techniques (DFT)
ที่มา : http://images.google.co.th/imglanding

2.2.3 ระบบ Floating system เป็นการปลูกโดยที่รากแช่อยู่ในน้ำ ซึ่งประกอบด้วยแผ่นโฟมเจาะรูเพื่อปลูกพรรณไม้น้ำ และแผ่นโฟมนี้จะลอยอยู่ในถาดที่ใส่สารละลายธาตุอาหารพืช (ภาพที่ 5) (นงนุช, 2551)

ภาพที่ 5 การปลูกพืชแบบไร้ดินด้วยระบบ Floating system
ที่มา : http://images.google.co.th/imglanding

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระบบปลูกพรรณไม้น้ำสกุลอนูเบียสแบบไร้ดินนั้นพบว่ามีการประสบกับปัญหาโรคพรรณไม้น้ำ ทำให้มีปัญหาด้านการส่งออกพรรณไม้น้ำสกุลอนูเบียส

2.3 โรคพืชวิทยา (Plant pathology)

โรคพืชวิทยามาจากภาษากรีก 2 คำ คือ pathos หมายถึง suffering การทนทุกข์ทรมาน ความเจ็บปวด หรือความเสียหายและ logos หมายถึง to speak, to study หรือ description การศึกษาหรือการกล่าวถึง ดังนั้นโรคพืชวิทยาจึงหมายถึง การศึกษาถึงลักษณะอาการที่เจ็บปวด หรือความเสียหาย หรือการทนทุกข์ทรมานของพืช ดังนั้นเมื่อนำคำว่า 'Plant' ผสมกับ 'Pathology' จึงมีความหมายว่า เป็นการศึกษาถึงลักษณะอาการที่ผิดไปจากปกติ หรือเสียหายของพืช ซึ่งลักษณะอาการที่ผิดไปจากปกติหรือเสียหายของพืชนั้น รวมเรียกว่าพืชเป็นโรค หรือ 'Plant Disease' (พิบูลย์, 2530)

Plant Disease เป็นปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นกับพืชตามความเป็นจริงในธรรมชาติ เมื่อมีสิ่งรบกวนเกิดขึ้นทั้งภายในและภายนอกต้นพืช โดยสิ่งนั้นจะต้องมีอิทธิพลตอการดำรงชีวิตของพืชทางด้านสรีรวิทยาและสัณฐานวิทยา (พิบูลย์, 2530)

Disease cycle ประกอบไปด้วย ระยะการเข้าทำลายพืช (penetration) การแพร่ระบาด (dissemination) และการอยู่ข้ามฤดูการเพาะปลูก (overwintering) ของเชื้อสาเหตุโรคพืช ความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อสาเหตุโรคพืชกับการทำให้เกิดโรคขึ้นได้นั้นมีอยู่สองประการดังนี้

2.3.1 ความต้องการอาหารของเชื้อสาเหตุโรคพืช (Food relationship of plant pathogen) เป็นปัจจัยประการหนึ่งที่จะบอกถึงความสามารถในการดำรงชีวิต แบบปรสิต (parasite) หรือ pathogen มากน้อยเพียงไร โดยมีพืชซึ่งจัดว่าเป็นโฮสต์ (host) เป็นแหล่งของอาหาร ปรสิตทั้งหมดไม่ใช่ที่เป็น pathogen นอกจากนี้การเป็นปรสิตของเชื้อสาเหตุโรคพืชยังมีข้อจำกดที่แตกต่างกันไปกล่าวคือ

ปรสิตแบบถาวร (obligate parasite) เป็นเชื้อสาเหตุโรคพืชที่ดำรงชีวิตอยู่เฉพาะบนเซลของพืชอาศัยที่มีชีวิตอยู่เท่านั้น ถ้าพืชเกิดการตายปรสิตชนิดนี้ก็จะตายตามไปด้วย และไม่สามารถเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ทั่วไป (artificial media)

ปรสิตแบบชั่วคราว (facultative parasite) หมายถึงเชื้อสาเหตุโรคพืชดำรงชีวิตโดยการเกาะกินพืชอาศัย เพื่อการเจริญเติบโตชั่วระยะหนึ่งเท่านั้น และอีส่วนหนึ่งของวงจรชีวิตจะอาศัยอยู่บนสิ่งที่เน่าเปื่อยผุพัง เมื่อกล่าวถึงปรสิตก็ควรที่จะต้องกล่าวถึงการดำรงชีวิตแบบแซโปรไฟท์ชั่วคราว (facultative saprophyte) ซึ่งมีลักษณะใกล้เคียงกัน แตกต่างในส่วนของระยะเวลาของการดำรงชีวิตบนพืชอาศัย และสิ่งที่เน่าเปื่อยผุพัง (พิบูลย์, 2530)

2.3.2 ปัจจัยของการเกิดโรค (Diseases relationship) โรคพืชจะเกิดขึ้นได้จำเป็นต้องประกอบไปด้วยความสำคัญของปัจจัย 3 ประการดังต่อไปนี้คือ

2.3.2.1 ต้นเหตุหรือสาเหตุของโรคพืช (Causal agents) อันได้แก่สิ่งมีชีวิต (animate agent) เช่น แบคทีเรีย, รา, ไวรัส, ไส้เดือนฝอย และพืชชั้นสูงบางชนิด เช่น ต้นกาฝากและฝอยทอง และสิ่งไม่มีชีวิต (inanimate agent) เช่น แสง อุณหภูมิ เป็นต้น สาเหตุเกิดจากสิ่งมีชีวิตต่างๆ นั้นอาจเรียกได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ว่าเป็นสาเหตุจากเชื้อโรคพืช (pathogen) ซึ่งการเกิดโรคของพืชเกิดขึ้นได้โดยเชื้อโรคพืชจะต้องมีความรุนแรง (virulent) และและสามารถเข้าทำลายให้พืชเกิดสภาพการติดเชื้อ และแสดงอาการของโรคพืชขึ้นได้ เชื้อโรคพืชทำลายพืชโดยวิธีการดังต่อไปนี้

(1) ดูดกินสารภายในเซลพืช

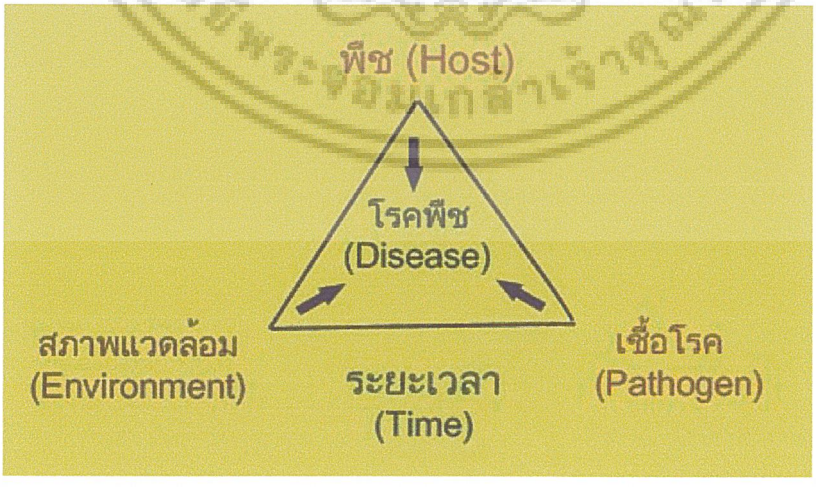
(2) รบกวนขบวนการเมตาโบลิซึมของเซลพืชด้วยการปล่อยสารพิษ (toxin) เอนไซม์ และสารเร่งการเจริญเติบโต (growth regulator) บางชนิดให้กับพืช

(3) ทำให้พืชอาศัยอ่อนแอ และเป็นช่องทางการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคพืชอื่นๆ ต่อไป

(4) สกัดกั้นการเคลื่อนย้ายธาตุอาหารของพืช

2.3.2.2 พืชอาศัย (Host) พืชอาศัยจะต้องเป็นพืชที่อ่อนแอต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคพืช ซึ่งลักษณะความอ่อนแอของพืชนั้น อาจเกิดจากปัจจัยภายในต้นพืช ได้แก่ ลักษณะทางพันธุกรรม และปัจจัยภายนอกต้นพืช ได้แก่ สภาพอากาศ ธาตุอาหาร การถูกแมลงศัตรูพืช และวัชพืชรบกวนเป็นสิ่งควบคุม การที่พืชจะเกิดโรคขึ้นได้นั้น เชื้อโรคพืชจะต้องมีความสามารถเจาะผ่านเซลผิวของพืชที่อ่อนแอเข้าสู่ภายในเซลพืชให้ได้ก่อน ปรากฏการณ์ดังกล่าวจะไม่สามารถเกิดขึ้น ถ้าเชื้อสาเหตุโรคพืชไม่มีความสัมพันธ์กับพืชอาศัยอย่างใกล้ชิด (host-pathogen incompatibility)

2.3.2.3 สภาพแวดล้อมที่เหมาะสม (Suitable environment) โรคของพืชจะเกิดขึ้นไม่ได้เลย ถ้าสภาพแวดล้อมต่างๆ เช่น แสง อุณหภูมิ ความชื้นไม่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรคพืช และโรคจะเกิดขึ้นได้รุนแรงรวดเร็ว เมื่อสิ่งต่างๆ เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรคพืช จุดเหมาะสมของสิ่งแวดล้อมของการเกิดโรคแต่ละชนิดนั้นแตกต่างกัน จากความสัมพันธ์ของสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมมีผลต่อการส่งเสริมการเกิดโรคของพืชนี้สามารถใช้เป็นสิ่งช่วยในการพยากรณ์การเกิดโรคของพืชล่วงหน้าได้ดีพอสมควร



ภาพที่ 6 สามเหลี่ยมโรคพืช (Disease triangle)

ที่มา : http://www.malaeng.com/blog/?p=9147

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(1) สาเหตุของการเกิดโรค (Causes of plant diseases)

(1.1) สาเหตุที่เกิดมาจากสิ่งไม่มีชีวิต (abiotic agent or noninfectious agent) ได้แก่ ปัจจัยทางกายภาพและทางเคมีต่างๆ ที่แวดล้อมต้นพืช และไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาของพืช เช่น อุณหภูมิและความชื้นที่สูงหรือต่ำเกินไป การขาดธาตุอาหารและการมีธาตุอาหารมากเกินไปจนเป็นพิษ และอากาศเสีย เป็นต้น ตัวการเหล่านี้ไม่สามารถติดต่อจากต้นที่เป็นโรคไปยังต้นพืชที่ไม่เป็นโรคได้ โรคพืชที่เกิดจากตัวการที่ไม่มีชีวิตนี้ เรียกว่า noninfectious disease ต้นพืชที่ได้รับผลจากตัวการนี้จะอ่อนแอมากกว่าปกติ จนทำให้ตัวการที่มีชีวิต (biotic agents) เข้าทำลายซ้ำเติมได้ง่ายขึ้น

(1.2) สาเหตุที่เกิดมาจากสิ่งมีชีวิต (biotic agent or pathogen or infectious agent) ได้แก่ รา (fungi) แบคทีเรีย (bacteria) มัยโคพลาสมา (mycoplasmas or mycoplasmalike organisms) ไวรัส (virus) พืชชั้นสูงที่เป็นปรสิต (parasitic higher plants) และไส้เดือนฝอย (nematodes) โดยตัวการที่มีชีวิตนี้สามารถติดต่อจากพืชที่เป็นโรคไปยังพืชที่ไม่เป็นโรคได้ จึงเรียกโรคพืชที่เกิดจากตัวการที่มีชีวิตนี้ว่า infectious disease

2.4 โรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา (Plant diseases Caused by Fungi)

2.4.1 ลักษณะของเชื้อราสาเหตุโรคพืช

2.4.1.1 สัณฐานวิทยา (Morphology) ราสาเหตุโรคพืชทั่วไปจะมีลักษณะเป็นเส้นสายยาวตลอด เส้นสายแต่ละเส้นอาจเรียกว่า ฮายฟ่าหรือเส้นใย โดยที่เส้นใยแต่ละเส้นของเชื้อราบางชนิดพบว่ามีผนังกั้นตามขวาง และเชื้อราบางชนิดก็ไม่พบว่าเส้นใยมีผนังกั้นตามขวาง เส้นผ่าศูนย์กลางของเส้นใยมีขนาดตั้งแต่ 0.5-100 ไมโครมิเตอร์ แต่ละเซลที่เกิดจากการขวางกั้นของผนังเซลดังกล่าว อาจพบว่ามีนิวเคลียสเพียงหนึ่งหรือสองอน สำหรับเชื้อราพวกไม่พบผนังกั้นตามขวางนี้ นิวเคลียสจะอยู่กระจัดกระจายทั่วตลอดทั้งเส้นใย การเจริญเติบโตของเส้นใยทั้งสองนี้พบได้ในบริเวณปลายสุด และเชื้อราชั้นต่ำบางกลุ่มที่รูปร่างโดยทั่วไปไม่เป็นเส้นใย แต่มีลักษณะเป็นเซ,เดี่ยวๆ ตลอด ไม่มีผนังเซลห่อหุ้ม และในแต่ละเซลมีจำนวนนิวเคลียสได้หลายอัน (พิบูลย์, 2530)

2.4.1.2 การสืบพันธุ์ (Reproduction) ราสาเหตุโรคพืชมักอาศัยสปอร์ที่เกิดขึ้นจากการผสมพันธุ์ (sexual spores) และไม่ได้ผสมพันธุ์ (asexual spores) เป็นสิ่งช่วยในการแพร่พันธุ์

2.4.2 การจำแนกหมวดหมู่ของเชื้อรา แบ่งออกเป็น 3 ดิวิชัน ดังนี้

2.4.2.1 ดิวิชัน Amastigomycota แบ่งออกเป็น 4 class คือ

(1) Zygomycetes

(2) Basidiomycetes

(3) Ascomycetes

(4) Deuteromycetes

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.2.2 ดิวิชัน Mastigomycota แบ่งออกเป็น 2 class คือ

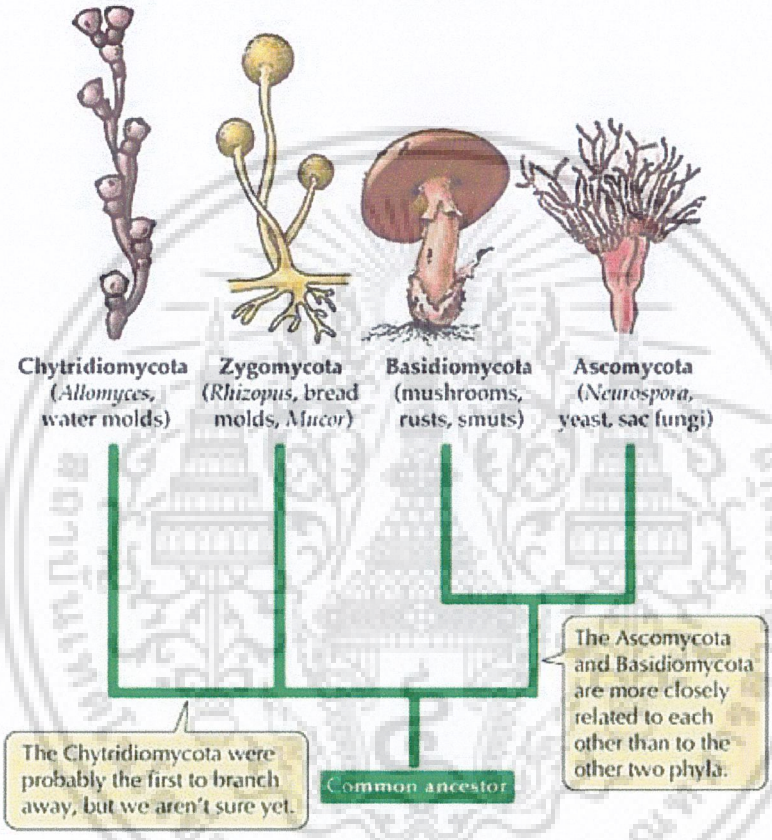
(1) Oomycetes

(2) Chytridiomycetes

2.4.2.3 ดิวิชัน Gymmnomycota แบ่งออกเป็น 2 class คือ

(1) Myxomycetes

(2) Acrasiomycetes (cellular slime mold)



ภาพที่ 7 Classification of Fungi

ที่มา : http://www.thaigoodview.com/node/72944

2.4.3 วิธีการผ่านเข้าสู่เนื้อเยื่อพืช

การที่เชื้อราผ่านบริเวณผิวเข้าสู่เนื้อเยื่อภายในของพืชเรียกโดยทั่วไปว่า primary penetration เริ่มต้นจากการสัมผัสโดยตรงของเชื้อกับผิวอวัยวะส่วนต่างๆ ของพืช แล้วแทงเข้าสู่เนื้อเยื่อเพื่อดูดกินอาหารและทำลายเซลล์พืชต่อไป (พรทิพย์, 2533)

2.4.3.1 ประเภทของ primary penetration แบ่งตามลักษณะโครงสร้างที่ใช้ในการแทงผ่านเข้าสู่เนื้อเยื่อภายในพืชคือ

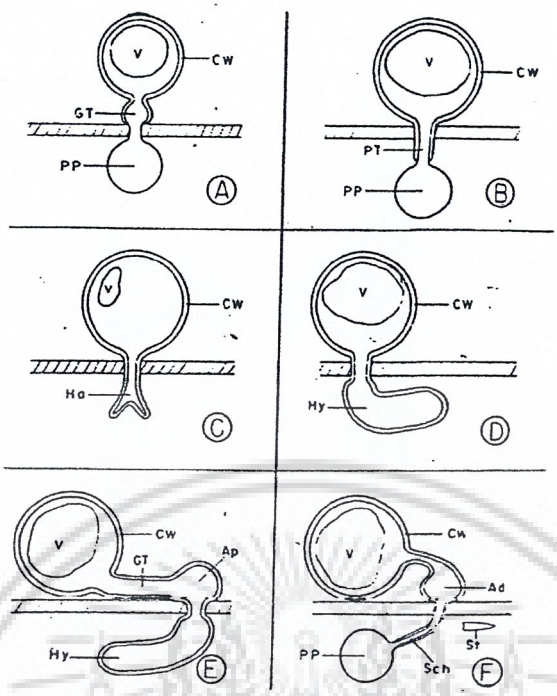
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(1) การผ่านเข้าเนื้อเยื่อพืชโดยตรง Zoospore Cysts ซึ่งมีลักษณะการแทงเข้าได้ 6 ลักษณะ ขบวนการแทงข้าวของ zoospore มักเกี่ยวข้องกับการ encysment ที่ผิวสัมผัส และการขยายตัวของช่องว่าง vacuole ภายใน cyst ภาพที่ 4A เป็นตัวอย่าง zoospore ของ *Rozella* ที่ encyst บนเส้นใยของ *Allomyces* แล้วงอกออกมาสร้าง germ tube รูปทรงกลม แล้วโปรโตพลาสต์ของเชื้อปรสิตจะเข้าสู่เส้นใยเจ้าบ้านผ่านทางรูเล็กๆ ที่ผนังเซลล์ ซึ่งทั้งหมดใช้เวลาหลายนาทีจึงจะครบขั้นตอน ภาพที่ 4B เป็นการแทงข้าวของ zoospore ของ *Olpidium* โดยการสร้าง germ tube ผ่านผนังเซลล์เจ้าบ้านตามด้วยการถ่ายโปรโตพลาสต์เข้าสู่เซลล์ภายใน ขบวนการนี้ใช้เวลาประมาณ 10 นาที ภาพที่ 4C เป็นการแทงเข้าเซลล์พืชโดยเชื้อ *Chytridium* sp. ซึ่งต้องออกไปตรงที่แม้จะเกิด vacuole ใน cyst แต่จะไม่ขยายใหญ่ขึ้น และมีการสร้าง haustoria ที่แตกสาขาเป็นโครงสร้างในการแทงเข้าสู่เซลล์พืช ภาพที่ 4D เป็นตัวอย่างของ *Phytophthora*

(2) การแทงผ่านโดยโครงสร้างที่ไม่เคลื่อนที่ เป็นการแทงผ่านของเส้นใยเดี่ยวเข้าสู่เซลล์มีชีวิตซึ่งมีหลายลักษณะ 1) กรณี *Rhizoctonia* ที่เริ่มจากการสร้าง appressorium ที่ปลายเส้นใยที่สัมผัสกับผนังเซลล์กล้วยไม้ และเกิดการอัดแน่นของเส้นใยระหว่างการเจริญบีบตัวผ่านผนังเซลล์ แล้วจึงมีการสร้างเส้นใยขนาดปกติขึ้นอีกครั้งหนึ่งหลังการผ่านเข้าสู่ภายในเซลล์ ขบวนการนี้ใช้เวลาประมาณ 30 นาที 2) กรณีของเชื้อ *Pythium* เส้นใยแทงผ่านผนังเซลล์เข้าไปโดยไม่จำเป็นต้องสร้าง appressorium 3) กรณีเชื้อ *R. solani* เส้นใยมักจะรวมกลุ่มกันสร้าง infection cushion โดยการแทงผ่านหลายๆ จุดด้วย appressorium และ penetration peg 4) กรณีการแทงผ่านชั้น periderm ของรากที่จุดสัมผัสของ *Armillaria mellea* โดยใช้ rhizomorph ที่มีลักษณะคล้ายรากจากการรวมตัวของเส้นใย 5) กรณี Cladosporium ที่ conidia จะงอก germ tube ออกมาโดยไม่สร้าง appressoria แล้วแทงผ่านผิว cuticle และ middle lamella ระหว่างเซลล์ผิว 6) กรณี *Colletotrichum* spp. ที่ conidia จะงอกเป็น germ tube และสร้าง appressorium สำหรับแทงผ่าน 7) กรณีราแป้ง เชื้อจะสร้าง hautorium โดยตรงจาก appressorium แทงผ่านผนังเซลล์ และ 8) กรณีของราสนิมที่มีการงอกของ uredospore เพื่อสร้างเส้นใยปฐมภูมิจาก appressorium ผ่านปากใบเข้าสู่ช่องภายในปากใบ แล้วพัฒนาเส้นใยทุติยภูมิเข้าสู่ vesicle และเซลล์พืชข้างเดียวโดยแทงเข้าสู่เซลล์ด้วยโครงสร้าง haustorial mother cells ในลักษณะเดียวกันกับการแทงผ่านผนังเซลล์พืชด้วย appressorium ของราแป้ง

2.4.3.2 กลไกการผ่านเข้าสู่เซลล์ การแทงผ่านผิวและผนังเซลล์พืชโดยเชื้อโดยทั่วไปมักจะใช้แรงทางกลช่วยในการขับดันหรือใช้เอนไซม์ย่อยสลายส่วนประกอบผนังเซลล์พืช อย่างใดอย่างหนึ่งหรือใช้ร่วมกันทั้งสองวิธีการใช้แรงทางกลในการแทงเข้าสู่เซลล์พืชจะเกิดขึ้นได้เมื่อมีเหตุการณ์เช่น 1) turgor pressure ของเซลล์พืชจะต้องอยู่ในระดับที่มากกว่าเซลล์ของเชื้อ 2) เชื้อสามารถใช้แรงผลักดันให้ผนังเซลล์พืช และเยื่อหุ้มเซลล์เว้าเข้าไปในเซลล์พืช 3) เส้นใยสามารถแทงผ่านเยื่อ gold foil 4) cuticle มีการโค้งเข้าข้างในรอบๆ รูที่แทงเข้าขณะมีการเจริญของ penetration peg ผ่านผนังเซลล์ 5) ในบางกรณีการลด turgor pressure ลงจากปกติก็ช่วยทำให้เชื้อแทงเข้าสู่เซลล์ได้ดีขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 8 รูปแบบต่างๆ ของวิธีการผ่านเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านโดยสปอร์ของเชื้อรา (zoospore) A= กรณีของ *Rozella allomycis*, B = *Olpidium brassicae*, C = *Chytridium* sp., D= *Phytophthora parasitica*, E = *Pythium aphanidermatum*, F= Plasmodiophorales (Ad= adhesorium, Ap = appressorium, cw = cyst wall, GT = germ tube, Ha= haustorium, Hy = hypha, pp = parasite protoplast, PT = penetration tube, Sch = sehlauch, st = satchel และ V = vacuole)

ที่มา : พรทิพย์ (2553)

ได้มีความพยายามในการอธิบายปรากฏการณ์การแทงผ่านเข้าเซลล์พืชของเชื้อโดยแรงกลว่า การดันของส่วนปลาย penetration peg ที่ cuticle จะต้องการแรงมากที่สุด แรงนี้สร้างขึ้นโดยผลสะท้อนจากการเจริญของผนังเซลล์ที่ปลาย peg ทำให้มีแรงตรงกันข้ามส่งมาทางผนังของ peg มากกว่าแรงเดิมโดยแรงดันความเต่งของ appressorium ถ้า penetration peg นี้มีขนาดเล็กก็ยิ่งจะทำให้มีแรงกดมากขึ้น ซึ่งพบได้ในหลายกรณีของเชื้อราที่สร้าง appressorium สำหรับ penetration peg ที่มีผนังหนา แรงทางกลของผนังด้านข้างควรจะเป็นสัดส่วนกับพื้นที่ผิวของ peg และแรงที่ต้องการแทงผ่านผนังเซลล์ควรเป็นสัดส่วนกับพื้นที่ผิวของรูที่จะเจาะผ่าน เมื่อพิจารณาขนาดของพื้นที่ผิวจากสูตร 2 rh ของรูปทรงกระบอกและของรูปทรงกลม r^2 ก็จะเห็นว่าถ้ารัศมีของรูลดลง พื้นที่ผิวของปลายรูจะลดลงเร็วกว่าทรงกระบอก ดังนั้นขนาดของ peg ที่เล็กลงจะทำให้มีสัดส่วนระหว่างผนังด้านข้างต่อรูที่จะเจาะมากขึ้นจึงสามารถจัดการใช้แรงได้มากกว่า และเกิดแรงมากกว่าแรงต้านของผนังเซลล์พืชขณะแทงเข้า ถ้า penetration peg มีขนาดใหญ่ก็จะต้องการแรงในการแทงผ่านสูงขึ้น ขณะเดียวกันผนังของ peg ขนาด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

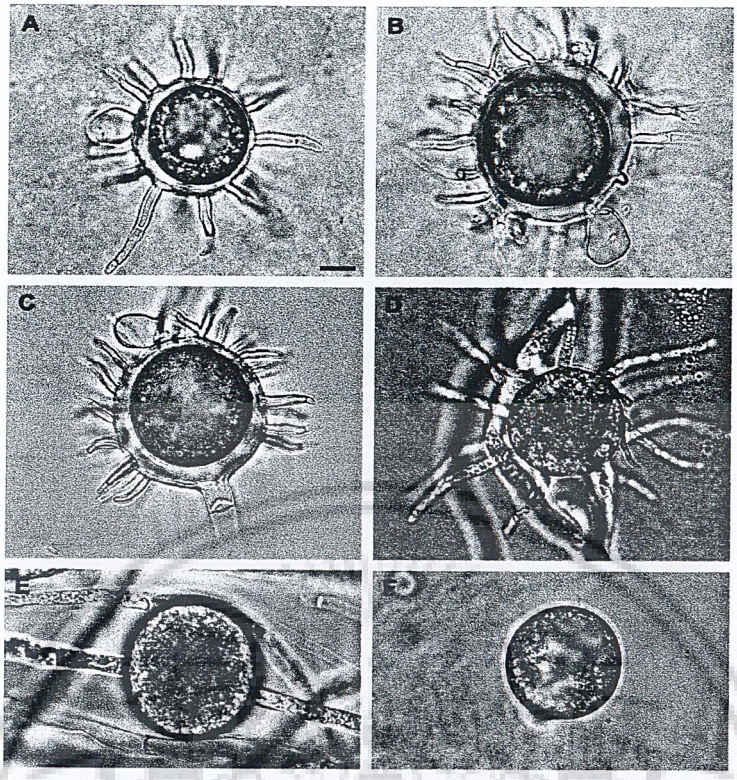
ใหญ่ก็จะมีความอ่อนแอกว่าขนาดเล็ก สำหรับแรงดันความเต่ง (turgor pressure) มีส่วนส่งเสริมการเข้าสู่เซลล์พืชโดย 1) penetration peg ที่ส่วนปลายภายใน appressorium จะสร้างบริเวณเฉพาะของแรงทางกลที่ผนังค่อนข้างต่ำ และ appressorium ที่มี turgor pressure สูงเพียงพอก็มีแนวโน้มที่จะผลักดันตัวเองผ่านบริเวณอ่อนแอของผิวพืชได้ 2) แรงที่ตามการเคลื่อนที่ของของเหลวจะบังคับให้มี turgor pressure ในระดับที่แน่นอนใน appressorium และ penetration peg ขนาดเล็กจะเข้าสู่ผนังพืชจากการกระต้นของ turgor pressure ได้ดีกว่า peg ขนาดใหญ่ในด้านที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์จากการตรวจสอบทางเคมีของเซลล์วิทยาพบว่ามีเหตุการณ์ต่างๆ ที่ชี้ว่าเอนไซม์ของเชื้อมีส่วนช่วยในการแทงผ่านเข้าสู่เซลล์เป็นผลสำเร็จ คือ 1) พบการย่อยสลายของผนังเซลล์หรือ cuticle รอบๆ จุดที่เชื้อแทงเข้า 2) ผนังเซลล์โดยรอบจุดที่เชื้อแทงเข้าจะสูญเสียโครงสร้างความเหนียวแน่นและเกิดสารประกอบซึ่งมีคุณสมบัติติดสีที่ใช้ย้อมในปฏิกิริยาเฉพาะของการตรวจสอบทางเคมีอย่างแน่นอน 3) พบการเกิดวงที่ย้อมสีไม่ติดอยู่ล้อมรอบ penetration peg ซึ่งขนาดดวงอาจขยายมากขึ้นภายใต้ cuticle 4) ส่วนปลายของ penetration peg อาจผ่านเข้าสู่ผนังเซลล์แล้วกระจุกอยู่ตามช่องว่างต่างๆ ที่เกิดขึ้นภายในเนื้อเยื่อจากการย่อย microfibril ของผนังเซลล์ และ 5) พบว่า cuticle ที่เซลล์ผิวพืชบางส่วนสลายไปทำให้เปิดผนังเซลล์ภายนอกออกมาสัมผัสกับเชื้อโดยตรง นอกจากนี้ในการศึกษาลักษณะและคุณสมบัติของเชื้อรายังพบเชื้อมีความสามารถผลิตเอนไซม์ที่จำเป็นต่อการย่อยสลาย cuticle และส่วนประกอบผนังเซลล์ เชื้อราบางชนิดเช่น *Venturia inegualis* แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ esterase บางอย่างก่อนแทงข้าวของ appressorium และบางชนิดเช่น *E. graminis hordei* ขณะที่เหมือนว่าจะไม่สามารถแทงเข้าสู่พืชได้โดยแรงกลแต่เพียงอย่างเดียว

2.5 โรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา *Pythium* spp.

2.5.1 เชื้อรา *Pythium*

Cock *et al.* (2008) ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Pythium solare* sp. nov. ที่แยกจากต้นถั่วเขียวที่แสดงอาการรากเน่า ทำการเลี้ยงในอาหาร corn meal agar (CMA) ในที่มืดที่อุณหภูมิ 25 °C ให้เพิ่มจำนวนมากขึ้น จากนั้นย้ายไปเลี้ยงที่อาหาร CMA และ potato carrot agar (PCA) โดยการ inoculums plugs ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5x5 mm ไปวางตรงกลางจานอาหาร พบว่าลักษณะของ oogonia ของเชื้อรา *Pythium solare sp.* nov. มี spine ยาว, ไม่แหลม, คล้ายนิ้วมือ, บาง spine มีผนังกั้น หรือมีการแตกแขนง หรือ oogonia มีลักษณะเรียบ (ภาพที่ 9)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

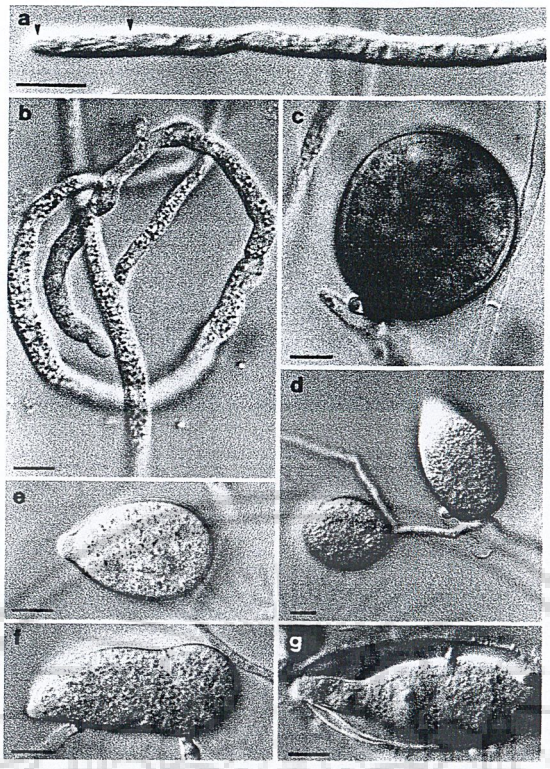


ภาพที่ 9 A-F *Pythium solare.* (A-C) oogonia มี spine ยาว, ไม่แหลม, คล้ายนิ้วมือ, บาง spine มีผนังกั้น (A-B) หรือแตกแขนง (B-C) (D-F) Hyplal พอง, กับ spine (D) หรือเรียบ (E-F) : Bar = 10 µm

ที่มา : Cock *et al.* (2008)

Weber *et al.* (2004) ทำการศึกษาลักษณะของเชื้อรา *Pythium undulatum* ที่แยกจากต้นสน ทำการเลี้ยงในอาหาร corn meal agar (CMA) และ V8 agar พบว่า hyphae มีลักษณะโค้งและพองยึดเกาะกับอาหาร oospores หรือ organ มีการเปลี่ยนแปลงของการสืบพันธุ์แบบมีเพศอย่างสมบรูณ์ chlamydospores เป็นการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ มีรูปร่างกลมสร้างจากส่วนหนึ่งส่วนใดของเส้นใย sporangia มีรูปร่างคล้าย lemon หรือ รูปร่างไม่แน่นอน และปลาย sporangium จะมี vesicle ซึ่ง zoospores ประมาณ 10-25 zoospores จะถูกปล่อยออกมาจากแต่ละ vesicle (ภาพที่ 10)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 10 รายละเอียดของ *Pythium undulatum* : a.เส้นใยยึดเกาะกับอาหาร ; b.hyphae โค้งพองฝังในอาหาร ; c.การพัฒนา chlamydospores ; d.การเจริญเติบโตของ sporangia ที่ hypha ; e,f.การเจริญเติบโตของ sporangia ในอาหาร ; g.การแพร่พันธุ์ภายใน sporangium : Bar = 10 µm

ที่มา : Weber *et al.* (2004)

2.5.2 ความสามารถในการทำให้เกิดโรค

Kageyama *et al.* (2002) ทำการ inoculate เชื้อรา *Pythuum helicoides* 3 isolates (B-5, G-1 และ H-5) ในต้นอ่อนกุหลาหนูและให้เติบโตใน chamber ที่อุณหภูมิ 15, 20, 25, 30 และ 35 $^{\circ}$C สังเกตอาการรากที่เป็นโรคที่มองเห็นหลังจาก inoculation 7 วัน ที่ระดับความรุนแรงของโรค 0 ถึง 3; 0 = รากสมบูรณ์, 1 = รากเน่าเล็กน้อย, 2 = รากเน่าปานกลาง, 3 = รากเน่ารุนแรงและพืชตาย พบว่าทั้ง 3 isolates (B-5, G-1 และ H-5) มีอัตราการเกิดโรค 100% และที่อุณหภูมิ 35 $^{\circ}$C ของทุก isolates ก่อให้เกิดความรุนแรงของโรคสูงที่สุด ซึ่งความรุนแรงของโรคที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ อุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของเส้นใย คือ 35 $^{\circ}$C นอกจากนี้อุณหภูมิที่เหมาะสมของการพัฒนา zoospores ต่ำกว่าการเจริญเติบโตของเส้นใย และ Schwarz and Grosch (2003) ทดลอง inoculate เชื้อรา *Pythium aphanidermatum* ในต้นมะเขือเทศด้วยสารละลาย 0, 10^2, และ 10^4 oospores ml^{-1} (O0, O2 และ O4 ตามลำดับ) พบว่า ที่ความเข้มข้นสารละลาย 10^4 oospores ml^{-1} (O4) ทำให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำหนักแห้งของรากและความยาวทั้งหมดของรากลดลงมากที่สุด ซึ่งความยาวรากที่ลดลงส่งผลต่อน้ำหนักราก เชื้อโรคจะทำให้เกิดการทำลายเซลล์และทำให้เซลล์แตกหลังจากแทงผ่าน exodermis ราก

2.5.3 อาการของพืช

Kageyama *et al.* (2002) ศึกษาอาการจากการ inoculate เชื้อรา *Pythuum helicoides* ในต้นกุหลาบหนู ในระบบปลูกพืชแบบไร้ดิน ทำการเก็บกุหลาบหนูที่เป็นโรครากเน่าในช่วงฤดูร้อน นำมาแยกเชื้อ *Pythium* จากนั้นนำเชื้อที่ได้ไป inoculate ในกระถางกุหลาบหนูที่อยู่ตรงกลางของ bench จำนวน 1 กระถาง และวางกระถางที่ไม่ได้ inoculate รอบกระถางที่ inoculate จำนวน 96 กระถาง พบว่าใบของกุหลาบหนูเปลี่ยนเป็นสีเหลือง (chlorosis) และรากเน่าเป็นสีน้ำตาล และ Cock *et al.* (2008) ทำการ inoculate เชื้อรา *Pythium solare* sp. nov. ในต้นถั่วเขียว (*Phaseolus vulgaris*) เป็นระยะเวลา 11 สัปดาห์ พบว่าส่วนใหญ่อาการของพืชที่ inoculate เชื้อรา *Pythium solare* sp. nov. จะเป็นตามลำดับที่ราก, hypocotyls necrosis (การตายของเนื้อเยื่อลำต้นเริ่มแรกใต้ใบเลี้ยง), necrotic streaks ที่ลำต้น, เหี่ยว และประมาณ 1 สัปดาห์หลังจากปรากฏอาการครั้งแรกพืชมีการตายเกิดขึ้น

2.6 การควบคุมทางชีวภาพ

2.6.1 การควบคุมทางชีวภาพด้วยเชื้อรา *Trichoderma*

John *et al.* (2010) ศึกษาศักยภาพของเชื้อรา *Trichoderma viride* ที่ควบคุมเชื้อรา *Pythium arrhenomanes* ในต้นถั่วเหลือง ทำการเลี้ยงเชื้อรา *Trichoderma viride* และ *Pythium arrhenomanes* ในอาหาร potato dextrose agar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิ 25-30 $^{\circ}$C เป็นระยะเวลา 3 วัน นำ plug 1 cm^{2} จำนวน 6 plug ที่เติบโตจากอาหาร PDA แต่ละเชื้อราวางใน flask 500 ml ใส่ทราย 200 ml, corn meal 11.2 ml และน้ำกลั่น 80 ml (นึ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง ระยะเวลา 40 นาที และอีกครั้งเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง) เขย่า flask สลับกันทุกวัน เป็นระยะเวลา 10 วัน ตัวอย่างดิน(ผสม silica:vermiculite,1:1) ผสมดินกับเชื้อราแตกต่างกัน ; (1) ไม่ใส่เชื้อรา (control), (2) ผสมดินกับ *Trichoderma viride*, (3) ผสมดินกับ *Fusarium* sp., (4) ผสมดินกับ *Pythium arrhenomanes*, (5) ผสมดินกับเชื้อรา *Trichoderma viride* และ *Fusarium* sp. (1:1) และ (6) ผสมดินกับเชื้อรา *Trichoderma viride* และ *Pythium arrhenomanes* (1:1) ให้เติบโตใน chamber (22/17 $^{\circ}$C day/night อุณหภูมิ, 16 h ช่วงแสง) พบว่าผลผลิต, ระบบ shoot และ root ที่เลี้ยงด้วยเชื้อรา *Trichoderma viride* ร่วมกับ *Pythium arrhenomanes* มีการเจริญเติบโตและน้ำหนักเพิ่มขึ้นมากกว่าที่เลี้ยงด้วยเชื้อรา *Pythium arrhenomanes* เพียงอย่างเดียว ซึ่งเชื้อรา *Trichoderma viride* เป็นปรสิตของเชื้อรา *Pythium arrhenomanes* (mycroparasitic) เชื้อรา *Trichoderma viride* จะไปขดพันรัดเชื้อรา *Pythium arrhenomanes*, มีการแข่งขันกับเชื้อรา *Pythium arrhenomanes* ซึ่งเชื้อรา *Trichoderma viride* สามารถครอบครองรากได้เร็วกว่าเชื้อรา *Pythium arrhenomanes* และช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และ Pill *et al.* (2009) ศึกษาประสิทธิภาพของการใช้เชื้อรา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Trichoderma ควบคุมการติดเชื้อ *Pythium* ในเมล็ดแตงกวา โดยทำการแช่เมล็ดแตงกวาในสารละลายดังนี้ Non-primed (ไม่แช่เมล็ดในสารละลาย), Primed-osmomatric (แช่เมล็ดด้วย -1.0 MPa จาก $Ca(NO_3)_2$ 0.135 โมแลล เพิ่ม -1.5 MPa จาก 50% น้ำหนักแห้ง vermiculite) และ Primed-osmotic (-2.5 MPa จาก $Ca(NO_3)_2$ 0.337 โมแลล) พบว่า Non-primed ที่เคลือบด้วยเชื้อรา *Trichoderma* มีการงอกถึง 76.4% ซึ่งมากว่า primed-osmotic และ primed-osmomatric ที่เคลือบด้วยเชื้อรา *Trichoderma* primed-osmotic และ Non-primed ที่เคลือบด้วยเชื้อรา *Trichoderma* มี damping-off เกิดขึ้นลดลง และ primed-osmotic ที่เคลือบด้วยเชื้อรา *Trichoderma* มีน้ำหนักสด shoot เพิ่มขึ้นมากที่สุด

2.6.2 การควบคุมทางชีวภาพด้วยเชื้อ *Bacillus*

Intana *et al.* (2008) ทดสอบประเมินผลของสารต้านเชื้อราจาก *Bacillus* spp. ควบคุมเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* ภายใต้สภาวะห้องปฏิบัติการและโรงเรือนในมะเขือเทศ ทำสารสกัดต้านเชื้อราจากแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร nutrient agar (NA) อายุ 2 วัน ขูดเชื้อแบคทีเรียด้วยแท่งแก้วนำมาวัดความขุ่นของเชื้อให้ได้ 0.2 optical density เติมน้ำที่ปราศจากเชื้อให้ได้ $1.0x10^8$ cell/ml นำ 3 ml ของเชื้อ *Bacillus* spp. แต่ละสายพันธุ์ (B-NST-01, B-NST-02, B-NST-03 และ B-NST-04) ใส่ใน 1 L ของ nutrient broth (NB) บ่มที่อุณหภูมิ 27±2 °C ที่ rotary shaker (เครื่องเขย่า) เป็นระยะเวลา 4 วัน แยกเชื้อ *Bacillus* spp. มาสกัดด้วย ethyl acetate นำไประเหยด้วย rotary evaporator น้ำหนักแห้งสารต้านเชื้อราผสมกับ 25 ml 2% methanol และปรับความเข้มข้น 1000 mg/l การทดสอบในห้องปฏิบัติการวางแผ่นกระดาษกรองที่ inoculate เชื้อรา *Pythium aphanidermatum* ในจานอาหาร potato dextrose agar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิ 27±2 °C จนกระทั่งโคโลนี เชื้อรา *Pythium aphanidermatum* เต็มจาน แล้ววางกระดาษกรองที่ชับด้วยสารสกัดหยาบ *Bacillus* spp. 1000 mg/l 10 แผ่น วางเมล็ดมะเขือเทศที่ฆ่าเชื้อ 1 เมล็ดต่อแผ่น และการทดสอบในสภาวะเรือนกระจก ใส่แผ่นเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* (0.5x0.5 cm^2) ในกระถางที่ความลึก 0.5 cm นำเมล็ดมะเขือเทศที่แช่น้ำตลอดคืนมาแช่ในสารสกัดหยาบ *Bacillus* spp. 1000 mg/l เป็นระยะเวลา 10 นาที นำไปวางในกระถางที่ความลึก 0.3 cm จากผิวหน้าดิน พบว่าการทดสอบในห้องปฏิบัติการ เมล็ดมะเขือเทศที่วางบนแผ่นกระดาษกรองสารสกัด *Bacillus* spp. ความเข้มข้น 1000 mg/l จากสายพันธุ์ B-NST-03 และ B-NST-02 มีการงอกที่ 85.5% และ 82% ตามลำดับ ส่วนการทดลองในสภาวะเรือนกระจกที่แช่เมล็ดมะเขือเทศในสารสกัด *Bacillus* spp. ความเข้มข้น 1000 mg/l จากสายพันธุ์ B-NST-03 และ B-NST-02 มีการงอกที่ 92.5% และ 92% ตามลำดับ สายพันธุ์ทั้ง 4 ของเชื้อ *Bacillus* spp. เป็นปฏิปักษ์ยับยั้งการเจริญเติบโต mycelia ของเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* ซึ่งเชื้อ *Bacillus* spp. สามารถสร้างสารปฏิชีวนะต่อต้านเชื้อราเช่น bacitracin, bacilomycin, mycosubtilin, fungistatin และ subsporrin และ Abdelzaher (2003) ศึกษาการใช้เชื้อ *Bacillus subbtilis* ควบคุมเชื้อรา *Pythium ultimum* var. *ultimum* ในกะหล่ำดอก เชื้อรา *Pythium ultimum* (Isolate 1) แยกมาจากรากกะหล่ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดอก เชื้อรา *Pythium ultimum* (Isolate 2) แยกมาจากดินรอบรากกะหล่ำดอก นำดินที่นึ่งฆ่าเชื้อและดินธรรมชาติมาผสมด้วย *Pythium* ที่ soil-cornmeal culture อัตรา 10% ความหนาแน่นของเชื้อ (100 g หัวเชื้อ + 900 g ของดินที่ฆ่าเชื้อและดินธรรมชาติ) *Pythium* 2 สายพันธุ์ ผสมดินกับเชื้อ *Bacillus subbtilis* ที่ 10^8 เซลล์ต่อกรัมดินแห้ง หรือรากของต้นอ่อนอายุ 10 วัน จุ่มที่ $2x10^9$ bacteria ต่อ ml + 2% (w/v) carboxymethylcellulose (CMC) ทันทีก่อนปลูก พบว่ากะหล่ำดอกที่เจริญเติบโตในดินที่มีเชื้อ *Bacillus subbtilis* และจุ่มรากด้วยเชื้อ *Bacillus subbtilis* ก่อนย้ายปลูกมีการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักแห้ง root และ shoot ดินที่ผสมเชื้อ *Bacillus subbtilis* ส่งผลให้เกิดการควบคุมโรครากเน่าที่ดีขึ้นกว่ารากที่จุ่มด้วยเชื้อ *Bacillus subbtilis* ซึ่งเชื้อ *Bacillus subbtilis* จะแข่งขันกับเชื้อราโดยมีการเข้าครอบครองรากพืชได้ดี

2.6.3 การควบคุมทางชีวภาพด้วยเชื้อ *Pseudomona*

Chatterton *et al.* (2004) ศึกษาช่วงเวลาของการใช้เชื้อ *Pseudomonas chlororaphis* Tx-1 ที่ความหนาแน่น $1x10^7$ CFU/ml ในวันที่ 0 (ครั้งที่ 1) และวันที่ 14 (ครั้งที่ 2) ในรากพริกที่ inoculate ด้วยเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* ที่ความหนาแน่น $1x10^4$ zoospores/ml เป็นระยะเวลา 30 นาที ที่วันที่ 3 และวันที่ 17 พบว่าการใช้เชื้อ *Pseudomonas chlororaphis* ในวันที่ 0 อย่างเดียว และวันที่ 0 กับวันที่ 14 มีการลดลงของรากที่เป็นสีน้ำตาลอย่างชัดเจน ซึ่งเชื้อ *Pseudomonas chlororaphis* สามารถผลิตสารปฏิชีวนะยับยั้ง ทำลาย หรือแข่งขันกับเชื้อรา และชักนำให้พืชต้านทานต่อเชื้อรา และ Zheng *et al.* (2000) ศึกษาการเจริญเติบโตของรากและการเปลี่ยนสีที่รากของแตงกวาในระบบปลูกพืชแบบไร้ดิน ที่ inoculate ด้วยเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* และควบคุมด้วยเชื้อ *Pseudomonas fluorescens* และ *Pseudomonas chlororaphis* ทำการ inoculate ด้วยเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* 100 zoospores ในสารละลายธาตุอาหารหลังจาก 14 วัน ที่ทำการย้ายปลูกแตงกวา หลังจาก 2 วัน ใส่เชื้อ *Pseudomonas fluorescens* และ *Pseudomonas chlororaphis* ในสารละลายธาตุอาหารที่ความเข้มข้น 10^5 CFU/ml พบว่ารากเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วหลังจากย้ายปลูกเพิ่มขึ้นสูงสุดที่ 4.2 cm/day ในวันที่ 35 แต่ต่อมามีการลดลงน้อยกว่า 0.5 cm/day ในวันที่ 60 เชื้อ *Pseudomonas* ยับยั้งการเปลี่ยนสีของรากส่วนที่แก่ ในวันที่ 47-61 ซึ่งเชื้อ *Pseudomonas* จะชักนำการต่อต้านเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* ในรากแตงกวา

2.7 การป้องกันกำจัดโรคโดยใช้แบคทีเรีย (Antagonistic Bacteria for Plant Diseases Control)

การป้องกันกำจัดโรคพืชโดยชีววิธีนั้น มียุทธศาสตร์หลักคือ การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพสูงมาต่อต้านหรือยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคพืช หรือชักนำให้พืชสร้างความต้านทานต่อการทำลายของเชื้อสาเหตุโรคพืช ต้องไม่เป็นสาเหตุของโรคพืชเสียเอง ต้องไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์ หรือสัตว์ และต้องไม่ทำให้สภาพแวดล้อมเสียหาย (มณจันทร์, 2552)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทำงานของแบคทีเรียปฏิปักษ์

2.7.1 การแข่งขันและครอบครองพื้นที่ (Competition and Colonization)

แบคทีเรียปฏิปักษ์ จะมีความสามารถในการแข่งขันกับเชื้อโรคพืชในหลายๆ ด้าน เช่น การแย่งธาตุอาหาร อากาศ ตลอดจนการครอบครองพื้นที่ได้ดีกว่า (colonization) ทำให้เชื้อสาเหตุของโรคพืชไม่สามารถเจริญเข้าทำลายพืชได้

2.7.2 การสร้างสารปฏิชีวนะและเอนไซม์ (Antibiosis and Enzymes)

การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ส่วนใหญ่จะเน้น ความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะ ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งหรือทำลายเชื้อสาเหตุโรคพืช หรือผลิตเอนไซม์ออกมาย่อยผนังเซลหรือเส้นใยของเชื้อรา หรือแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุโรคพืช

2.7.3 การชักนำให้เกิดความต้านทานโรค (Induced disease resistance)

การนำเอาจุลินทรีย์ ไม่ว่าจะเป็นเชื้อราหรือแบคทีเรียที่เคยเป็นสาเหตุของโรคพืชมาทำให้เสียความสามารถในการเข้าทำลายพืช แล้วสามารถชักนำหรือกระตุ้นให้พืชสร้างความต้านทานต่อการทำลายของเชื้อโรคได้

. 2.7.4 การเป็นปรสิต (parasitism)

เชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นปรสิต (phage) สามารถเข้าไปเจริญอาศัยทำลายจุลินทรีย์ที่เป็นโรคพืชนั้น ตัวอย่างก็คือ แบคทีเรียในสกุล *Bacillus*

แบคทีเรียในสกุล *Bacillus* มีหลายชนิด และหลายสายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการเป็นปฏิปักษ์สำหรับใช้ป้องกันกำจัดโรคพืชได้หลายชนิด

ประโยชน์ของ *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรคพืช

กลไกการทำงานของแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* ในการควบคุมโรคพืชนั้นก็จะคล้ายกับจุลินทรีย์ปฏิปักษ์อื่นคือ การเจริญแข่งขันแย่งชิงพื้นที่และอาหาร (competition) การครอบครองพื้นที่ตลอดจนเจริญคลุมโคโลนีของเชื้อสาเหตุโรคพืช (colonization) และการสร้างสารต่างๆออกมาภายนอกเซลล์ เพื่อหยุดการเจริญหรือย่อยสลายเส้นใยของเชื้อราโรคพืช ได้แก่ สารปฏิชีวนะและเอนไซม์ ตลอดจนผลิตสารคีเลต เช่น siderophore ซึ่งมีความสามารถในการแย่งจับธาตุเหล็ก โดยเฉพาะอย่างยิ่ง Fe^{3+} หรือแร่ธาตุแทรนซิชันอื่นๆ ทำให้จุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคพืชได้รับแร่ธาตุต่างๆ ไปใช้เป็นแหล่งอาหาร ในกระบวนการเจริญไม่เพียงพอ

2.8 การป้องกันกำจัดโรคพืชโดยใช้เชื้อรา (Antagonistic Fungi for Plant Diseases Control)

กลไกการทำงานของเชื้อราปฏิปักษ์นั้นจะคล้ายกับกลไกการทำงานของแบคทีเรียปฏิปักษ์ เช่น การแข่งขันในการแย่งพื้นที่ แย่งธาตุอาหารต่างๆ และครอบครองพื้นที่ (competition and colonization) การสร้างสารปฏิชีวนะและเอนไซม์ (antibiosis and enzymes) แต่สิ่งที่แตกต่างจากแบคทีเรียปฏิปักษ์ คือ hyperparasite (มณจันทร์, 2552)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำว่า hyperparasite หมายถึง เชื้อราปฏิปักษ์ที่มีลักษณะเป็นปรสิตของเชื้อราที่เป็นปรสิตของพืชหรือสัตว์ แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มหลัก กลุ่มแรก คือ necrotrophic parasite ซึ่งจะฆ่าเซลล์ของ host ทันทีที่เข้าทำลาย โดยการใช้เส้นใยของตัวมันเองพันรัดเส้นใยของเชื้อราโรคพืช หรืออาจจะใช้เส้นใยของมนแทงทะลุเส้นใยของเชื้อราโรคพืช เข้าไปเจริญและอาศัยอาหารจากเชื้อราที่มันฆ่าสำหรับการเจริญต่อไป ส่วนอีกกลุ่ม คือ biotrophic parasite เชื้อราในกลุ่มนี้จะไม่ฆ่าเชื้อราที่มันเข้าไปปรสิตทันที แต่จะค่อยๆ อาศัยดูดซึมอาหารจากเชื้อราตัวนั้นสำหรับการเจริญ ซึ่งในที่สุดเชื้อราที่ถูกปรสิตก็จะค่อยๆ ตายลงอย่างช้าๆ

กลไกการทำงานของเชื้อรา *Trichoderma* ก็คือ เชื้อราปฏิปักษ์ในสกุล *Trichoderma* จะมีกลไกในการป้องกันกำจัดเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคพืช คล้ายกันกับเชื้อราปฏิปักษ์สกุลอื่น คือ การเป็นปรสิต (hyperparasitism) การสร้างสารปฏิชีวนะและเอนไซม์ (antibiosis and enzymes) และการแข่งขันและครอบครองพื้นที่ (competition and colonization)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ

3.1อุปกรณ์

3.1.1 พรรณไม้น้ำทดลอง ได้แก่ พรรณไม้น้ำสกุลอนูเบียส

3.1.2 เครื่องแก้ว เช่น บีกเกอร์ แท่งแก้ว ขวดเก็บอาหาร ขวดเก็บเชื้อ

3.1.3 อาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) สำเร็จรูป

3.1.4 ผงวุ้น

3.1.5 Plate พลาสติก

3.1.6 อุปกรณ์สำหรับแยกเชื้อรา เช่น ใบมีดผ่าตัดเบอร์ 11 และกรรไกร

3.1.7 เข็มเขี่ยเชื้อ

3.1.8 น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ

3.1.9 โซเดียมไฮโปคลอไรด์ (NaOCL)

3.1.10 cock borer

3.2 วิธีการ

3.2.1 การทดลองที่ 1 การแยกและการจำแนกชนิดเชื้อรา

การเก็บตัวอย่างเชื้อราจากพรรณไม้น้ำสกุลอนูเบียสจากฟาร์มพรรณไม้น้ำเอกชน และโรงเรือนพรรณไม้น้ำของภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง เพื่อทราบถึงชนิดของเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคโคนเน่ารากเน่าพรรณไม้น้ำ การแยกจากเนื้อเยื่อพืชอาศัย ตัดส่วนของพรรณไม้น้ำสกุลอนูเบียสที่เป็นโรคมาล้างด้วยน้ำไหล แช่ส่วนของพรรณไม้น้ำสกุลอนูเบียสที่เป็นโรคในคลอรอกซ์ (chlorox) ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็ฯต์ เป็นระยะเวลา 30 วินาที - 2 นาที และล้างอีกครั้งด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ซับให้แห้งด้วยกระดาษที่ฆ่าเชื้อแล้ว หลังจากนั้นนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ water agar (WA) ที่มีส่วนผสมของ Penicillin 100 µg/ml เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของแบคทีเรีย บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 1-3 วัน จากนั้นย้ายเชื้อราลงใน potato dextrose agar (PDA) ที่มีส่วนผสมของ Penicillin 100 µg/ml เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของแบคทีเรีย บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 3-5 วัน จากนั้นย้ายเชื้อราลงใน PDA-slant บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3-5 วัน จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 15-23 องศาเซลเซียส นำเชื้อราที่ได้มาส่องกล้องจุลทรรศน์เพื่อจัดจำแนกเชื้อรา ตามรูปร่างและลักษณะของโครงสร้างที่ใช้ในการจัดจำแนกดังนี้ sporangium, oogonium, antherdium, oospore, hyphal swelling และลักษณะของโคโลนี ต่อมาเชื้อที่แยกได้จะถูกนำมาทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค และเก็บรักษาเชื้อไว้เพื่อการศึกษาทดลองต่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.2 การทดลองที่ 2 การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค

3.2.2.1 โดยวิธี patch inoculation (ใช้ส่วนของ agar plug) สัมผัสกับพรรณไม้น้ำ

(1) วางแผนการทดลองแบบ CRD (complete randomized design)โดยมีการ inoculation แบ่งการทดลองออกเป็น 4 ชุดการทดลองๆ ละ 5 ซ้ำ ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 กลุ่มควบคุม 1 (ไม่มีการสร้างแผล)

ชุดการทดลองที่ 2 กลุ่มควบคุม 2 (มีการสร้างแผล)

ชุดการทดลองที่ 3 วางส่วนของ agar plug ที่โคนต้น *Anubias barteri* "broad leaf" ที่ไม่มีการทำให้เกิดแผล

ชุดการทดลองที่ 4 วางส่วนของ agar plug ที่โคนต้น *Anubias barteri* "broad leaf" ที่มีการทำให้เกิดแผล

โดยทำการทดลองเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

(2) เตรียมเชื้อรา *Fusarium* sp. เพื่อ inoculation กับต้น *Anubias barteri* "broad leaf" โดยเลี้ยงเชื้อรา *Fusarium* sp. ในอาหาร PDA เป็นระยะเวลา 7 วัน จากนั้นใช้ cock borer เจาะชิ้นวุ้น นำส่วนของ agar plug ไปวางให้สัมผัสกับโคนต้นพรรณไม้น้ำ *Anubias barteri* "broad leaf" ที่ไม่มีการทำให้เกิดแผล และโคนต้น *Anubias barteri* "broad leaf" ที่ใช้เข็มเจาะให้เกิดแผล สังเกตอาการและบันทึกผล

3.2.2.2 โดยใช้วิธี spore suspension

(1) วางแผนการทดลองแบบ CRD (complete randomized design)โดยมีการ inoculation แบ่งการทดลองออกเป็น 4 ชุดการทดลองๆ ละ 5 ซ้ำ ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 กลุ่มควบคุม 1 (ไม่มีการสร้างแผล)

ชุดการทดลองที่ 2 กลุ่มควบคุม 2 (มีการสร้างแผล)

ชุดการทดลองที่ 3 ใส่ spores suspension เชื้อรา *Fusarium* sp. 10^6 CFU ที่โคนต้นพรรณไม้น้ำ *Anubias broad leaf* ที่ไม่มีการทำให้เกิดแผล

ชุดการทดลองที่ 4 ใส่ spores suspension เชื้อรา *Fusarium* sp. 10^6 CFU ที่โคนต้นพรรณไม้น้ำ *Anubias barteri* "broad leaf" ที่มีการทำให้เกิดแผล

โดยทำการทดลองเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

(2) เตรียมเชื้อรา *Fusarium* sp. เพื่อ inoculation กับต้น *Anubias barteri* "broad leaf" โดยเลี้ยงเชื้อรา *Fusarium* sp. ในอาหาร PDA เป็นระยะเวลา 7 วัน จากนั้นเทน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วลงไปในจานเลี้ยงเชื้อรา *Fusarium* sp. นำ suspension ไปนับ spores ให้ได้ 10^6 CFU นำ suspension ที่ได้ไปเทลงที่โคนต้น *Anubias barteri* "broad leaf" ที่ไม่มีการทำให้เกิดแผล และโคนต้น *Anubias barteri* "broad leaf" ที่ใช้เข็มเจาะให้เกิดแผล ปริมาตร 10 มิลลิลิตรต่อต้น สังเกตอาการและบันทึกผล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(3) ใช้ส่วนของเชื้อราวางบริเวณโคนต้น

เตรียมเชื้อรา *Pythium* sp. เพื่อ inoculation กับต้นพรรณไม้น้ำ *Anubias* โดยเลี้ยงเชื้อรา *Pythium* sp. ในอาหาร PDA เป็นระยะเวลา 7 วัน Inoculation โดยการใช้ cock borer เจาะชิ้นวุ้น แล้วนำส่วนของ agar plug ไปวางบริเวณโคนต้นพรรณไม้น้ำ *Anubias barteri* "broad leaf" ที่เลี้ยงด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

3.2.3 การทดลองที่ 3 การทดสอบประสิทธิภาพของชีวผลิตภัณฑ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราในสภาพห้องปฏิบัติการ

3.2.3.1 เตรียมเชื้อรา *Pythium* sp. ANBR754-1 เพื่อนำไปทดสอบกับ biocontrol โดยเลี้ยงเชื้อรา *Pythium* sp. ANBR754-1 ในอาหาร PDA จนเต็ม plate (อายุประมาณ 6- 7 วัน)

3.2.3.2 เตรียม suspension ของผลิตภัณฑ์ที่ความเข้มข้น 10^5 และ 10^6 cfu/ml

3.2.3.3 เจาะชิ้นวุ้นใน plate ของเชื้อราที่จะทดสอบด้วย cock borer เบอร์ 3 แล้วหยด suspension ของผลิตภัณฑ์ (เชื้อรา *Trichoderma harzianum*) ลงไป ปริมาตร 100 µl

3.2.3.4 บันทึกการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น

สถานที่ทำการทดลอง

1. ห้องปฏิบัติการภาควิชากีฏวิทยา คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

2. ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำและโรงเรือนพรรณไม้น้ำ ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์

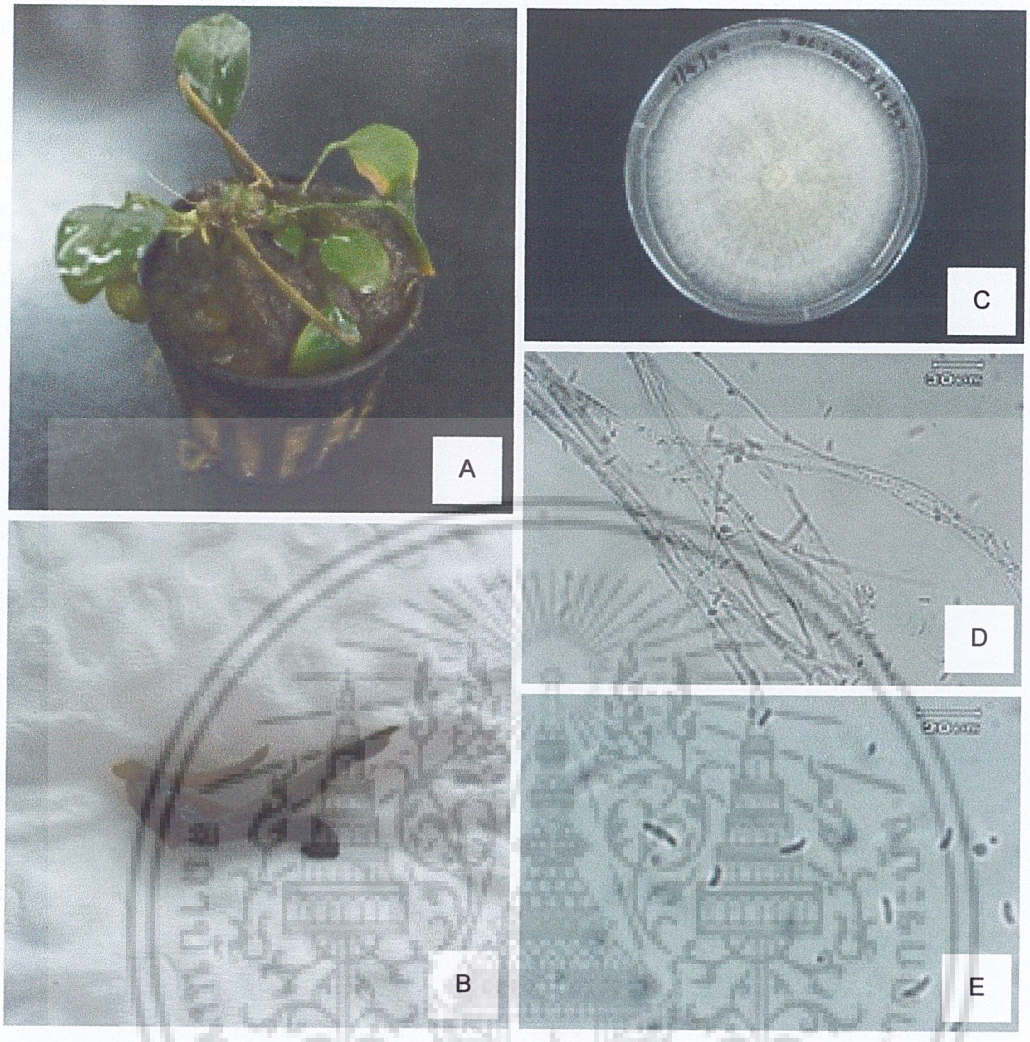
4.1 การทดลองที่ 1 การแยกและการจำแนกชนิดเชื้อรา

จากการทดลองแยกเนื้อเยื่อพืชอาศัยพรรณไม้น้ำสกุลอนูเบียสจากฟาร์มพรรณไม้น้ำเอกชน และโรงเรือนพรรณไม้น้ำของภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง เพื่อทราบถึงชนิดของเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคโคนเน่ารากเน่าพรรณไม้น้ำ ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ water agar (WA) เป็นระยะเวลา 1-3 วัน และอาหาร potato dextrose agar (PDA) เป็นระยะเวลา 3-5 วัน พบว่า สามารถแยกและจำแนกได้เชื้อรา *Pythium* sp. และเชื้อรา *Fusarium* sp. ที่มีอยู่ในเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำสกุลอนูเบียส (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 การแยกเชื้อราจากพรรณไม้น้ำสกุลอนูเบียสที่แสดงอาการเน่า

พืช	ส่วนที่แยก	อาการ	Isolates	เชื้อ	Inocolation
Anubias nana	ราก	รากเน่า	ANNR753-1	*Fusarium* sp.	ไม่ได้ทดสอบ
Anubias nana	กาบใบ	กาบใบเน่า	ANNS753-1	*Fusarium* sp.	ไม่ได้ทดสอบ
Anubias barteri "broad leaf"	กาบใบ	กาบใบเน่า	ANBS753-1	*Fusarium* sp.	ไม่ทำให้เกิดโรค
Anubias nana	กาบใบ	กาบใบเน่า	ANNS753-1	*Fusarium* sp.	ไม่ได้ทดสอบ
Anubias nana	กาบใบ	กาบใบเน่า	ANNS753-2	*Fusarium* sp.	ไม่ได้ทดสอบ
Anubias nana	ส่วนยอด	ยอดเน่า	ANNA753-1	*Pythium* sp.	ไม่ได้ทดสอบ
Anubias nana	กาบใบ	กาบใบเน่า	ANNS753-3	*Fusarium* sp.	ไม่ได้ทดสอบ
Anubias barteri "broad leaf"	ราก	รากเน่า	ANBR754-1	*Pythium* sp.	ไม่ทำให้เกิดโรค
Anubias barteri "broad leaf"	ราก	รากเน่า	ANBR954-1	*Pythium* sp.	ไม่ได้ทดสอบ
Anubias barteri "broad leaf"	ราก	รากเน่า	ANBR954	*Pythium* sp.	ไม่ได้ทดสอบ
Anubias barteri "broad leaf"	ราก	รากเน่า	ANBR954	*Pythium* sp.	ไม่ได้ทดสอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

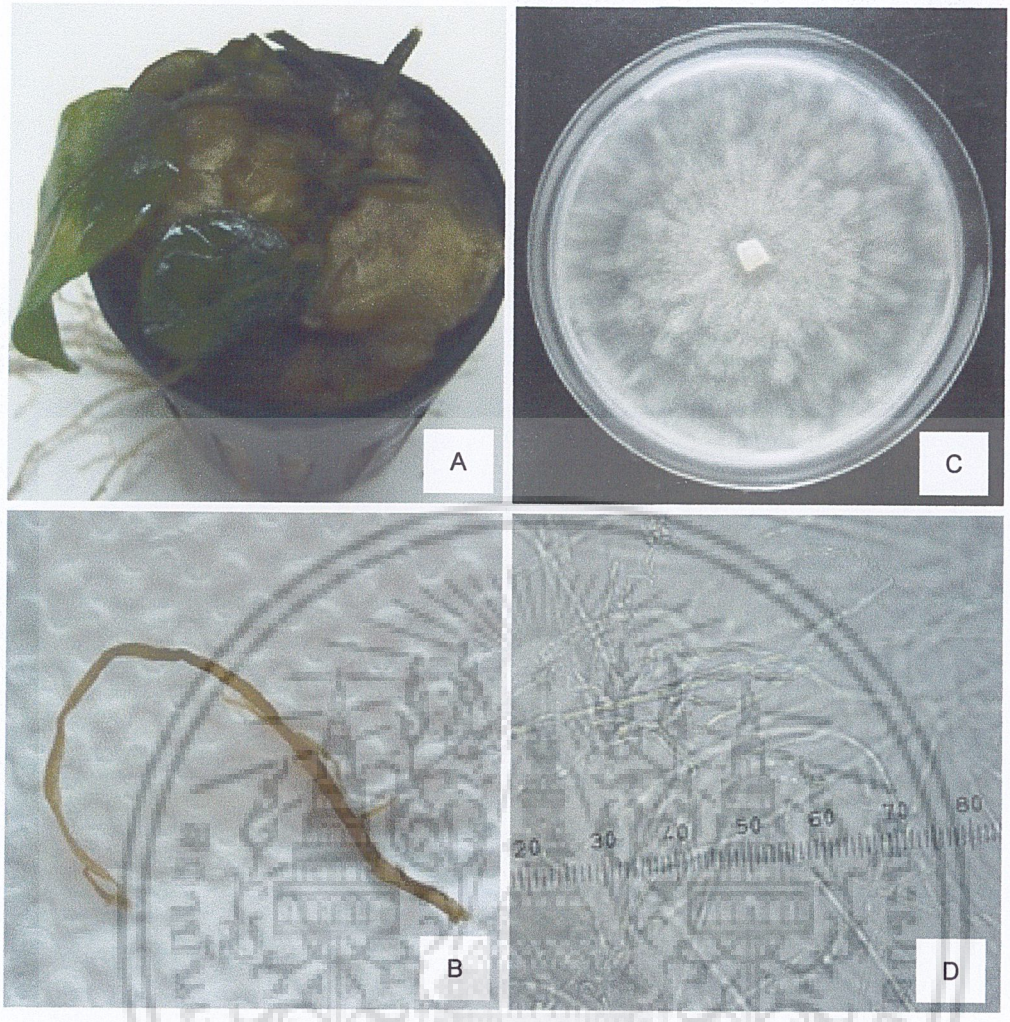


ภาพที่ 11 เชื้อรา *Fusarium* sp. (A) ลักษณะอาการ (B) กาบใบเน่า (C) โคโลนี (D) hypha และ mycelium และ (E) spore

Fusarium เป็นราชั้นสูงที่จัดอยู่ใน Class Deuterromycetes ที่พบการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (Asexual spore) เพียงอย่างเดียว จะไม่พบการขยายพันธุ์แบบใช้เพศ Asexual spore สร้างบนเส้นใยและถูกปลดปล่อยเป็นอิสระบนอากาศ

ลักษณะอาการ (symtomps) ของโรคที่เกิดจากเชื้อรา *Fusarium* เข้าทำลายพรรณไม้น้ำสกุลอนูเบียสทำให้เกิดอาการเน่าที่ราก, โคนต้น, ยอด และกาบใบ การที่เนื้อเยื่อพืชบริเวณรากถูกทำลายทำให้สูญเสียความสามารถในการดูดน้ำและดูดอาหาร เชื้อรา *Fusarium* จะมีโคโลนีและเส้นใยสีขาว สปอร์เป็น conidia ที่มีรูปโค้งคล้ายรูปเคียว ไม่มีสี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 12 เชื้อรา *Pythium* sp. (A) ลักษณะอาการ (B) รากเน่า (C) โคโลนี และ (D) hyphae และ mycelium

รูปร่างและลักษณะของโครงสร้างที่สำคัญของเชื้อ *Pythium* ที่ใช้ในการจัดจำแนก

1. sporangium มี 4 ลักษณะ คือ

- filamentous : เป็น sporangium ที่มีลักษณะและขนาดใกล้เคียงกับเส้นใยปกติ

- filamentous dendroid : ยังคงมีลักษณะคล้ายเส้นใยอยู่ แต่มีขนาดอ้วนพองกว่าเล็กน้อย และมีลักษณะเป็นกิ่งก้าน

- (sub) globose spherical : มีลักษณะกลมหรือค่อนข้างกลม และแบ่งย่อยออกเป็น 2 ชนิด คือ proliferating และ non-proliferating

2. oogonium มี 2 ลักษณะ คือ

- smooth-walled oogonia : ผนัง oogonium จะเรียบ

- ornamented oogonia : ผนัง oogonium จะมีลักษณะคล้ายหนาม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเกิดของ oogonium อาจเกิดระหว่างเส้นใย (intercalary) หรือที่ปลายเส้นใย (terminal) ก็ได้

3. antherdium ส่วนใหญ่จะมีรูปร่างคล้ายกระบอง (club-shape) การเกิดของ antherdium มี 3 ลักษณะ คือ

- ถ้าเกิดจากก้านหรือเส้นใยเดียวกันกับ oogonium เรียกว่า monoclinous
- ถ้าเกิดจากก้านหรือเส้นใยคนละอันกับ oogonium เรียกว่า diclinous
- ถ้าเกิดอยู่ภายในก้านของ oogonium เลย เรียกว่า hypogynous

จำนวน antherdium ที่มาเกาะกับ oogonium อาจมีมากกว่า 1 อันก็ได้ ขึ้นอยู่กับแต่ละ species

4. oospore : oospore ส่วนใหญ่จะมีผนังหนาเรียบ ยกเว้น ใน *Pythium dictyosporum* ผนังจะขรุขระ ลักษณะของ oospore มีอยู่ 2 แบบ คือ

- pherotic : oospore จะมีขนาดเต็ม oogonium
- apherotic : oospore จะมีขนาดไม่เต็ม oogonium มองเห็นช่องว่างระหว่าง oospore กับ oogonium ได้ชัดเจน

5. hyphal swelling : ใน *Pythium* บาง species เส้นใยจะโป่งพองออก เรียกว่า hyphal swelling ซึ่งเกิดขึ้นได้ทั้งแบบ intercalary หรือ terminal ก็ได้ และบางครั้งอาจพบต่อกันเป็นสาย (chain) เช่น ใน *P. intermedium*

6. ลักษณะของโคโลนี : โคโลนีของ Pythium ส่วนใหญ่จะเจริญฟูคล้ายปุยฝ้าย (cottony) แต่ในบาง species ก็มี pattern การเจริญที่แตกต่างกันไปดังนี้

- เจริญฟูเรียบเหมือนปุยฝ้าย (cottony pattern)
- เจริญซ้อนกันเป็นกลีบแหลมคล้ายดอกเบญจมาศ (chrysanthemum pattern)
- เจริญซ้อนกันเป็นกลีบโค้งมนคล้ายดอกกุหลาบ (rosette pattern)
- เจริญบางเรียบเป็นแนวรัศมีออกจากจุดศูนย์กลาง (radiate pattern)

ลักษณะอาการ (symtomps) ของโรคที่เกิดจากเชื้อรา *Pythium* เข้าทำลายพรรณไม้น้ำสกุลอนูเบียสทำให้เกิดอาการเน่าที่ราก, โคนต้น, ยอด และกาบใบ การที่เนื้อเยื่อพืชบริเวณรากถูกทำลาย ทำให้สูญเสียความสามารถในการดูดน้ำและดูดอาหาร เชื้อรา *Pythium* โคโลนีมีลักษณะเป็นสีขาวฟูเรียบเหมือนปุยฝ้าย เส้นใยโป่งพองออก sporangium มีลักษณะคล้ายเส้นใยอยู่ แต่มีขนาดอ้วนพองกว่าเล็กน้อย และมีลักษณะเป็นกิ่งก้าน

4.2 การทดลองที่ 2 การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค

4.2.1 ผลของการ inoculation ด้วยวิธี patch inoculation (ใช้ส่วนของ agar plug) สัมผัสกับพรรณไม้น้ำ ที่มีผลในการเกิดโรคของพรรณไม้น้ำสกุลอนูเบียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

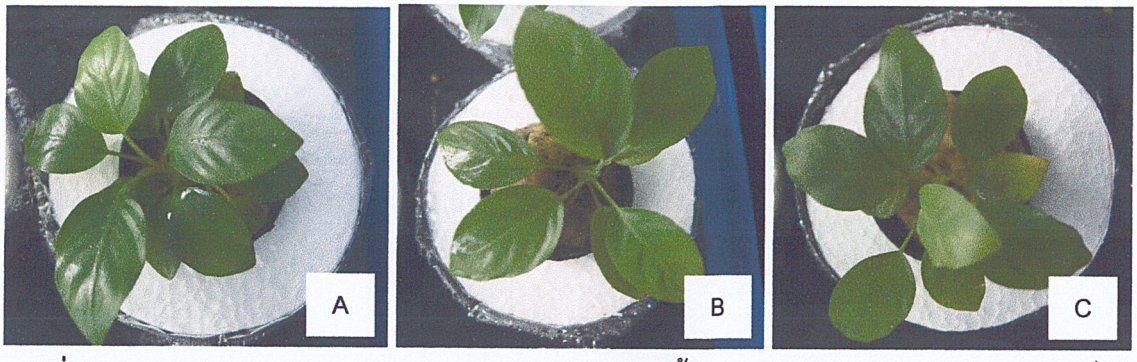
จากการทดลอง inoculation ที่อัตราการทำให้เกิดโรค ไม่มีการสร้างแผล, มีการสร้างแผล, วางส่วนของ agar plug (เชื้อรา *Fusarium* sp.) ที่โคนต้น *Anubias barteri* "broad leaf" ที่ไม่มีการทำให้เกิดแผล และวางส่วนของ agar plug (เชื้อรา *Fusarium* sp.) ที่โคนต้น *Anubias barteri* "broad leaf" ที่มีการทำให้เกิดแผล พบว่าเชื้อรา *Fusarium* sp. ไม่ทำให้ต้นพรรณไม้น้ำ *Anubias barteri* "broad leaf" เกิดโรค (ภาพที่ 22)

ภาพที่ 13 patch inoculation (A) Control (B) ต้นพรรณไม้น้ำ *Anubias barteri* "broad leaf" ที่ไม่มีการทำให้เกิดแผล และ (C) ต้นพรรณไม้น้ำ *Anubias barteri* "broad leaf" ที่ใช้เข็มเจาะให้เกิดแผล

4.2.2 ผลของการ inoculation ด้วยวิธี spore suspension ที่มีผลในการเกิดโรคของพรรณไม้น้ำสกุลอนูเบียส

จากการทดลอง inoculation ที่อัตราการทำให้เกิดโรค ไม่มีการสร้างแผล, มีการสร้างแผล, spores suspension เชื้อรา *Fusarium* sp. 10^6 CFU (ไม่มีการทำให้เกิดแผล) และ suspension spores เชื้อรา *Fusarium* sp. 10^6 CFU (มีการทำให้เกิดแผล) พบว่าเชื้อรา *Fusarium* sp. ไม่ทำให้ต้น *Anubias barteri* "broad leaf" เกิดโรค (ภาพที่ 23)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 14 spore suspension (A) Control (B) ต้นพรรณไม้น้ำ *Anubias barteri* "broad leaf" ที่ไม่มีการทำให้เกิดแผล และ (C) ต้นพรรณไม้น้ำ *Anubias barteri* "broad leaf" ที่ใช้เข็มเจาะให้เกิดแผล

4.2.3 ผลของการ inoculation ด้วยวิธีการใช้ส่วนของเชื้อราวางบริเวณโคนต้น ที่มีผลในการเกิดโรคของพรรณไม้น้ำสกุลอนูเบียส

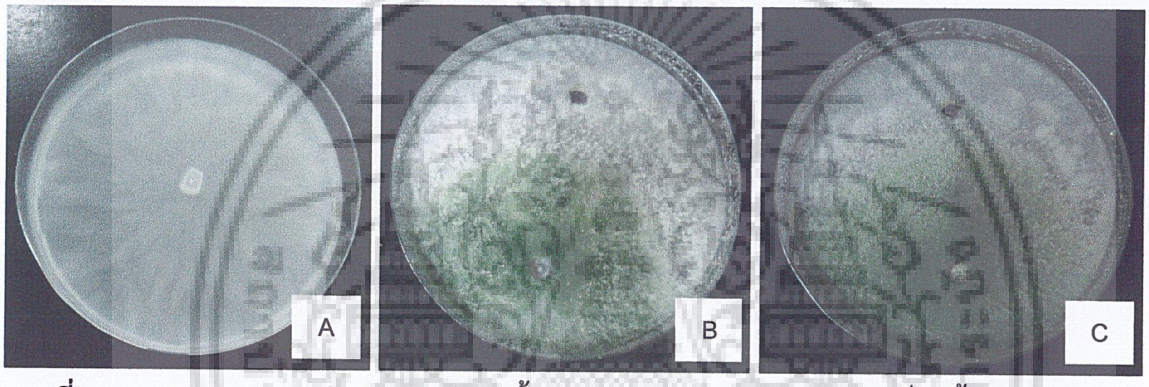
จากผลการทดลองใช้ส่วนของเชื้อรา *Pythium* sp. (agar plug) วางบริเวณโคนต้น *Anubias barteri* "broad leaf" ที่เลี้ยงด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่าเชื้อรา *Pythium* sp. ไม่ทำให้ต้น *Anubias barteri* "broad leaf" เกิดโรค (ภาพที่ 24)

ภาพที่ 15 (A) Control (B) ต้นพรรณไม้น้ำ *Anubias barteri* "broad leaf" ที่วาง agar plug ของเชื้อรา *Pythium* sp. บริเวณโคนต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 การทดลองที่ 3 การทดลองประสิทธิภาพของชีวผลิตภัณฑ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราในสภาพห้องปฏิบัติการ

การทดลองประสิทธิภาพของชีวผลิตภัณฑ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราในสภาพห้องปฏิบัติการ พบว่า การทดสอบประสิทธิภาพของชีวผลิตภัณฑ์ (เชื้อรา *Trichoderma harzianum*) เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pythium* sp. ANBR754-1 ในสภาพห้องปฏิบัติการ พบว่าชีวผลิตภัณฑ์ของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pythium* sp. ANBR754-1 ได้ภายในระยะเวลา 8 วัน โดยที่ความเข้มข้น 10^5 cfu/ml เชื้อรา *Trichoderma harzianum* มีการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pythium* sp. ANBR754-1 ที่เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 5.75 เซนติเมตร และที่ความเข้มข้น 10^6 cfu/ml เชื้อรา *Trichoderma harzianum* มีการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pythium* sp. ANBR754-1 ที่เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 6.13 เซนติเมตร (ภาพที่ 25)



ภาพที่ 16 ประสิทธิภาพของชีวผลิตภัณฑ์ของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pythium* sp. ANBR754-1 ;(A) เชื้อรา *Pythium* sp. ANBR754-1 (B) ความเข้มข้น 10^5 cfu/ml และ(C) ความเข้มข้น 10^6 cfu/ml

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง

การศึกษาโรคโคนเน่ารากเน่าจากเชื้อราของพรรณไม้น้ำสกุลอนูเบียสในระบบปลูกพืชแบบไร้ดิน โดยการแยกและจำแนกเชื้อราจากเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำสกุลอนูเบียส, การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคและการทดสอบประสิทธิภาพของชีวผลิตภัณฑ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ ดังนี้

5.1 การแยกและจำแนกเชื้อราจากเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำสกุลอนูเบียสได้เชื้อรา *Pythium* sp. และเชื้อรา *Fusarium* sp.

5.2 การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค จากการ inoculation เชื้อรา *Fusarium* sp. และเชื้อรา *Pythium* sp. ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำสกุลอนูเบียสไม่สามารถทำให้ต้นพรรณไม้น้ำ *Anubias barteri* "broad leaf" เกิดโรคได้

5.3 การทดสอบประสิทธิภาพของชีวผลิตภัณฑ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pythium* sp. ANBR754-1 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pythium* sp. ANBR754-1 ได้ภายในระยะเวลา 8 วัน โดยที่ความเข้มข้น 10^5 cfu/ml เชื้อรา *Trichoderma harzianum* มีการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pythium* sp. ANBR754-1 ที่เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 5.75 เซนติเมตร และที่ความเข้มข้น 10^6 cfu/ml มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 6.13 เซนติเมตร

ข้อเสนอแนะ

การศึกษาต่อไปควรมีการแยกและจำแนกเชื้อสาเหตุโรคชนิดอื่นนอกเหนือจากเชื้อรา เช่น แบคทีเรีย, ไวรัส และไส้เดือนฝอย และนำไปทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กาญจนรี พงษ์ฉวี. 2543. พรรณไม้น้ำสวยงาม. กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ. 233 น.

ดิเรก ทองอร่าม. 2548. การปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน. ธรรมรักษ์. นนทบุรี. 724 น.

นงนุช เลาหะวิสุทธิ์. 2551. ปลาสวยงามและพรรณไม้น้ำ. เอกสารคำสอน ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง, คณะเทคโนโลยีการเกษตร, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 138 น.

พิบูลย์ มงคลสุข. 2530. โรคพืชวิทยา. ภาควิชาชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยรามคำแหง.

พรทิพย์ วงศ์แก้ว. 2533. โรคพืชวิทยาขั้นสูง. ภาควิชาโรคพืชวิทยา, คณะเกษตรศาสตร์, มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

พรหมมาศ คูหากาญจน์. 2539. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า. ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช, คณะเทคโนโลยีการเกษตร, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า. 14(3):41-45.

มณจันทร์ เมฆธน. 2552. ชีวภัณฑ์ควบคุมศัตรูทางการเกษตรและสาธารณะสุข. ภาควิชาสัตววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

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.

Cock, A.W.A.M.D., C.A. Levesque, J.M. Melero-Vara, Y. Serrano, M.L. Guirado and J. Gomez. 2008. Pythium solare sp. nov., a new pathogen of green beans in Spain. Mycological Research. 112: 1115-1121.

Intana, W., P. Yenjit, T. Suwanno, S. Sattasakulchai, M. Suwanno and C. Chamswarng. 2008. Efficacy of Antifungal Metabolites of *Bacillus* spp. for Controlling Tomato Damping-off caused by *Pythium aphanidermatum*. Sci & Tech. 5: 29-38.

John, R.P., R.D. Tyagi, D. Prevost, S.K. Brar, S. Pouleur and R.Y. Surampalli. 2010. Mycoparasitic *Trichoderma viride* as a biocontrol agent against *Fusarium oxysporum* f. sp. adzuki and *Pythium arrhenomanes* and as a growth promoter of soybean. Crop Protection. 29: 1452-1459.

Kageyama, K., T. Aoyagi, R. Sunouchi and H. Fukui. 2002. Root rot of Miniature Roses caused by *Pythium helicoides*. Plant Pathol. 68: 15-20.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Pill, W.G., C.M. Collins, B. Goldberger and N. Gregory. 2009. Responses of non-primed or primed seeds of 'Marketmore 76' cucumber (*Cucumis sativus* L.) slurry coated with *aphanidermatum*. Scientia Horticulturae. 121: 54–62.

Schwarz, D. and R. Grosch. 2003. Influence of nutrient solution concentration and a root pathogen (*Pythium aphanidermatum*) on tomato root growth and morphology. Scientia Horticulturae. 97: 109–120.

Weber, R.W.S., F.L. Sulzer and M. Haarhaus. 2004. *Pythium undulatum*, cause of root rot of *Abies procera* Christmas trees and *Pseudotsuga menziesii* in Northern Germany. Mycological Progress. 3: 179–188.

Zheng, J., J.C. Sutton and H. Yu. 2000. Interactions among *Pythium aphanidermatum*, roots, root mucilage, and microbial agents in hydroponic cucumbers. Plant Pathol. 22: 368-379.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้