การชักนำให้มะเขือเทศสร้างความต้านทานโรคใบจุดเป้ากระสุนโดยเชื้อ *Trichoderma* spp. และกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลาย

Induction of Tomato Resistance against Corynespora Leaf Spot from *Trichoderma* spp. and Degrading Enzymes Activities

สุวิตา แสไพศาล (Suwita Saepisan)[1,3]
วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์ (Weerasak Saksirirat)[2,3]
พัฒนา ศรีฟ้า ฮุนเนอร์ (Pattana Srifah Huehne)[4]

บทคัดย่อ

นำเชื้อรา *Trichoderma* spp. จำนวน 35 ไอโซเลต มาทดสอบความสามารถในการชักนำให้ ต้นมะเขือเทศมีความต้านทานต่อโรคใบจุดเป้ากระสุนที่เกิดจากเชื้อรา *Corynespora cassiicola* พบว่าต้นมะเขือเทศที่ปลูกด้วยเชื้อราไอโซเลต T24, T17 และ 88 มีจำนวนแผลจุดเฉลี่ยต่อต้นต่ำที่สุด คือ 41.0, 43.3 และ 55.7 จุด ตามลำดับ เมื่อตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลาย chitinase, protease และ β-1,3-glucanase จากใบมะเขือเทศ พบว่าต้นมะเขือเทศที่ปลูกด้วยเชื้อรา *Trichoderma* ไอโซเลต 162, T18 และ T13 มีกิจกรรมของเอนไซม์ chitinase สูงที่สุด คือ 857.2, 763.7 และ 750.6 µmol (GlcNAc equivalent)/mg protein/hr ตามลำดับ สำหรับกิจกรรมของเอนไซม์ protease พบสูงที่สุดในมะเขือเทศที่ปลูกด้วยเชื้อรา *Trichoderma* ไอโซเลต 85, 67 และ 115 เท่ากับ 850.3, 778.0 และ 775.5 µmol (tyrosine equivalent)/mg protein/hr ตามลำดับ ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์ β-1,3-glucanase พบสูงในต้นมะเขือเทศที่ปลูกด้วยเชื้อรา *Trichoderma* ไอโซเลต T4, 103 และ 106 คือ 498.6, 471.1 และ 466.4 µmol (glucose equivalent)/mg protein/hr ตามลำดับ ผลการศึกษานี้จะนำไปสู่การคัดเลือกไอโซเลตของเชื้อรา *Trichoderma* เพื่อส่งถ่ายยีนไคติเนสต่อไป

Abstract

Thirty five isolates of *Trichoderma* spp. were tested on induce resistance to Corynespora leaf spot in tomato. The high potential induce resistance was *Trichoderma* isolate T24 showing lowest number of spot 41.0 spots followed by isolates T17 and 88 with number of spots 43.3 and 55.7, respectively. All 35 isolates were also evaluated on their ability to induce degrading enzymes in tomato leaves, which showed that tomato inoculated with *Trichoderma* isolate 162 expressed high chitinase activity of 857.2 µmol (GlcNAc equivalent)/mg protein/hr, isolates T18 and T13 showed

[1] นักศึกษาปริญญาเอก
[2] รองศาสตราจารย์ ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
[3] ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตรเพื่อเศรษฐกิจที่ยั่งยืน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอนแก่น 40002 และ ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สบว.) สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ (AG-BIO/PERDO-CHE)
[4] ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900
* corresponding author, e-mail weerasak@kku.ac.th

activities of 763.7 and 750.6 µmol (GlcNAc equivalent)/mg protein/hr, respectively. For protease activity, tomato inoculated with *Trichoderma* isolates 85, 67 and 115 showed activity of 850.3, 778.0 and 775.5 µmol (tyrosine equivalent)/mg protein/hr, respectively. Hight activities of β-1,3-glucanase were obtained from tomato inoculated with *Trichoderma* isolates T4, 103 and 106 with 498.6, 471.1 and 466.4 µmol (glucose equivalent)/mg protein/hr, respectively. This result is to applied for isolate selection of *Trichoderma* for further chitinase gene transformation.

คำสำคัญ : โรคใบจุดเป้ากระสุนของมะเขือเทศ, *Corynespora cassiicola*, *Trichoderma* spp.
Keywords: Corynespora leaf spot of tomato, *Corynespora cassiicola*, *Trichoderma* spp.

บทนำ

เชื้อรา *Trichoderma* spp. เป็นเชื้อราในกลุ่ม Deuteromycetes ลักษณะของเส้นใยมีผนังกั้น ผิวเรียบ แตกแขนงมาก เริ่มแรกเส้นใยมีสีขาวขนาดเฉลี่ยประมาณ 5–10 ไมครอน เมื่ออายุมากขึ้นจะมีสีเขียวค่อนข้างเหลืองจนถึงเขียวเข้ม สร้างก้านชูสปอร์ (conidiophore) มีสีจางหรือใสไม่มีสี แตกกิ่งก้านเป็นช่อ พบ phialides เกิดเดี่ยวๆหรือเป็นกลุ่ม โคนิเดีย (conidia) เซลล์เดียว รูปไข่ ส่วนมากมีสีเขียว ผิวเรียบหรือขรุขระ เกิดเป็นกลุ่มเล็กๆ ที่ปลาย phialides มีขนาดเฉลี่ย 3.2 x 2.7 ตารางไมครอน สร้างคลามายโดสปอร์ (chlamydospore) ลักษณะกลมใส เจริญอยู่ระหว่างเส้นใยหรือปลายเส้นใย ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 6.9 ไมครอน (Homer et al., 1972) เชื้อราชนิดนี้นิยมนำมาใช้ในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีเป็นอย่างมาก เนื่องจากมีกลไกในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชหลายกลไก คือ การสร้างสารปฏิชีวนะที่มีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรคพืช ได้แก่ gliotoxin, gliovirin และ trichodermin เป็นต้น การแก่งแย่งแข่งขันและครอบครองพื้นที่ เชื้อราชนิดนี้มีความสามารถสูงในการแก่งแย่งแข่งขันกับเชื้อสาเหตุโรคพืชในด้านการใช้อาหาร เนื่องจากเจริญเติบโตสร้างเส้นใยและสปอร์ได้ค่อนข้างรวดเร็ว สามารถเจริญได้ตั้งแต่อุณหภูมิ 15–20 องศาเซลเซียส มีชีวิตอยู่รอดได้ในสภาพที่มีอุณหภูมิต่ำประมาณ 10–12 องศาเซลเซียส (Johnson et al.,1987) และการเป็นปรสิต โดยการสร้างเส้นใยพันรัดเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืช สร้างเอนไซม์ย่อยสลาย คือ เอนไซม์ chitinase, β-1,3-glucanase, protease และ cellulase มาย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อราสาเหตุโรคพืช ได้แก่ *Sclerotium rolfsii, Rhizoctonia solani, Pythium* sp. และ *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. สามารถชักนำให้พืชสร้างความต้านทานโรค (Systemic Acquired Resistance, SAR) ได้ ซึ่งถูกค้นพบครั้งแรกโดย Bigirimana et al. (1997) จากการนำเชื้อรา *T. harzianum* (T-39) มาใช้ควบคุมโรคทางใบที่เกิดจากเชื้อรา *Botrytis cinerea* และ *Colletotrichum lindemuthianum* ของต้นถั่ว โดยการผสมลงไปในดิน พบว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. แทงเส้นใยเข้าไปในชั้นเซลล์ epidermis ชั้นที่ 1 หรือ 2 ทำให้พืชเกิดการตอบสนองต่อการเจริญของเส้นใย โดยการสร้างสารประกอบฟีโนลิคและสารเคมีส่งสัญญาณ คือ salicylic acid (SA) และ jasmonic acid (JA) ไปกระตุ้นการทำงานของ R gene (resistant gene) ที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตัวเองของพืช คือ PR gene (pathogenesis-related gene) ทำหน้าที่สังเคราะห์ PR protein (pathogenesis-related protein) Van and Van Strien (1999) ได้ทำการศึกษา PR protein และแบ่ง PR protein ออกเป็น 14 กลุ่ม ซึ่งพบว่าเอนไซม์ chitinase และ β–1,3–glucanase นั้นถูกจัดอยู่ในกลุ่มของ PR-protein ด้วย เอนไซม์ chitinase จัดอยู่ในกลุ่มของ PR-3, PR-4, PR-8 และ PR-11 ส่วนเอนไซม์ β–1,3–

glucanase จัดอยู่ในกลุ่มของ PR-2 ทั้งนี้เอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้ เป็นเอนไซม์ย่อยสลายที่เชื้อรา *Trichoderma* spp. สามารถสร้างได้ และมีบทบาทหลักในการย่อยสลายผนังเส้นใยของเชื้อราที่มี chitin และ β–1,3–glucan เป็นองค์ประกอบหลัก ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าการที่เชื้อรา *Trichoderma* spp. อาศัยและมีปฏิสัมพันธ์กับพืชอย่างใกล้ชิดจะกระตุ้นให้พืชสร้างสารเคมีส่งสัญญาณ ส่งผลให้พืชเกิดความต้านทานขึ้น และความต้านทานจะเกิดอย่างต่อเนื่องตลอดเวลาที่เชื้ออาศัยอยู่กับพืช (Hurtado, 2004) ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาเพื่อคัดเลือกเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพสูงในการชักนำให้มะเขือเทศสร้างความต้านทานต่อโรคใบจุดเป้ากระสุนที่เกิดจากเชื้อรา *Corynespora cassiicola* และมีกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายที่มะเขือเทศสร้างขึ้นสูง

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการชักนำให้มะเขือเทศสร้างความต้านทานโรคใบจุดเป้ากระสุนที่เกิดจากเชื้อรา *Corynespora cassiicola*

นำเชื้อรา *Trichoderma* spp.จำนวน 35 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต T1, T4, T9, T10, T13, T14, T17, T18, T19, T20, T21, T24, T25, T30, T35, 38, 57, 67, 74, 77, 78, 85, 88, 89, 90, 103, 106, 111, 115, 119, 122, 133, 139, 162 และ 177 มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 5 วัน ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร เจาะชิ้นวุ้นอาหาร PDA และย้ายชิ้นวุ้นจำนวน 3 ชิ้น ลงในหัวเชื้อข้าวฟ่าง บ่มที่อุณหภูมิ 28 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน นำหัวเชื้อข้าวฟ่างที่ได้ไปผสมกับวัสดุปลูกนึ่งฆ่าเชื้อในกระถางขนาด 6 นิ้ว ในอัตราส่วน 20 กรัมต่อวัสดุปลูก 1 กิโลกรัม เป็นระยะเวลา 7 วัน จากนั้นทำการย้ายปลูกมะเขือเทศอายุ 14 วัน ลงในกระถาง เป็นเวลา 7 วัน จึงทำการปลูกเชื้อรา *C. cassiicola* สาเหตุโรคใบจุดเป้ากระสุน โดยการฉีดพ่นสารแขวนลอยสปอร์ความเข้มข้น 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 มิลลิลิตรต่อต้นต่อกระถาง วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 35 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 4 ซ้ำ (1 ซ้ำ คือ 1 ต้น /กระถาง) ทั้งนี้มีกรรมวิธีควบคุม 3 กรรมวิธี กรรมวิธีควบคุมที่ 1 คือ มะเขือเทศปลูกเชื้อด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ กรรมวิธีควบคุมที่ 2 คือ มะเขือเทศปลูกเชื้อด้วยเชื้อรา *Trichoderma* spp. เพียงอย่างเดียว และกรรมวิธีที่ 3 คือ มะเขือเทศปลูกเชื้อด้วยเชื้อรา *C. cassiicola* เพียงอย่างเดียว หลังจากปลูกเชื้อเป็นระยะเวลา 14 วัน ทำการบันทึกข้อมูลจำนวนจุดแผลที่เกิดขึ้นบนใบของมะเขือเทศทุกใบ นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติโดยใช้โปรแกรม Statistical Analysis System (SAS)

การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายจากใบมะเขือเทศ

เก็บใบมะเขือเทศหลังปลูกเชื้อสาเหตุโรคเป็นเวลา 14 วัน โดยเก็บจำนวน 5 ใบต่อต้น ทั้งหมด 4 ต้น (4 ซ้ำ) จากนั้นนำใบมะเขือเทศมาสกัดโปรตีนโดยชั่งตัวอย่างใบมะเขือเทศน้ำหนัก 0.5 กรัม บดในโกร่งที่เย็นจัด เติม 0.1 M sodium acetate buffer pH 5.0 (sodium acetate trihydrate 13.6 g/ H_2O 1 ลิตร ปรับ pH ด้วย 1 N acetic acid) ปริมาณ 1,200 ไมโครลิตร เทตัวอย่างใส่ในหลอดไมโครทิวบ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 13,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที ดูดส่วนใส (supernatant) ซึ่งเป็น crude proteins นำไปเก็บที่ -20องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ในการทดลองต่อไป

นำ crude proteins ที่สกัดได้มาวัดปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนตามวิธีการของ Bradford (1976) โดยใช้ Bovine serum albumin (BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐาน การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ chitinase โดยนำ crude protein ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร บ่มร่วมกับสารละลาย colloidal chitin 1 เปอร์เซ็นต์ ใน 0.1 M acetate buffer pH 5.0 ปริมาตร 0.9 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (ดัดแปลงจาก Saksirirat and Hoppe, 1991) หยุดปฏิกิริยา

ด้วยการนำไปต้มในน้ำเดือด 100 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที นำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ตามวิธีการของ Somogyi (1952) กิจกรรมของเอนไซม์ประเมินจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (N-acetylglucosamine equivalent) คิดเป็น µmol ที่ถูกย่อยออกจาก colloidal chitin ใน 1 ชั่วโมงต่อ mg protein ใน reaction mixture สำหรับการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ protease นำ crude protein บ่มร่วมกับสารละลายเคซีน (casein) 1 เปอร์เซ็นต์ ใน 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0 จำนวนอย่างละ 1.0 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาด้วย trichloroacetic acid 10 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 3.0 มิลลิลิตร นำส่วนน้ำใส (supernatant) จำนวน 0.5 มิลลิลิตร มาทดสอบโดยเติม 0.4 M sodium carbonate (Na_2CO_3) จำนวน 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เติม Folin-ciocalteuphenol's reagent จำนวน 0.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (O.D.) ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร (nm) ตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์โดยการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ถูกย่อยออกจากเคซีน เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน ซึ่งใช้ tyrosine เป็นกรดอะมิโนมาตรฐาน ดัดแปลงตามวิธีของ Yang and Wang (1999) กิจกรรมของเอนไซม์ประเมินจากปริมาณกรดอะมิโน [amino acid (tyrosine equivalent)] คิดปริมาณเป็น µmol ที่ถูกย่อยออกจากเคซีนใน 1 ชั่วโมงต่อ mg protein ใน reaction mixture และตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ β-1,3-glucanase นำ crude protein ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร บ่มร่วมกับสารละลายลามินาริน (laminarin) 0.09 เปอร์เซ็นต์ ใน 0.1 M acetate buffer, pH 5.0 จำนวน 0.9 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง (ดัดแปลงจาก Saksirirat and Hoppe, 1991) ตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์โดยการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (glucose equivalent) ที่ถูกย่อยออกจากลามินาริน ตามวิธีของ Somogyi (1952) กิจกรรมของเอนไซม์ประเมินจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (glucose equivalent) คิดเป็น µmol ที่ถูกย่อยออกจากลามินารินใน 1 ชั่วโมงต่อ mg protein ใน reaction mixture นำข้อมูลจากการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายทั้ง 3 เอนไซม์ไปวิเคราะห์หาความแปรปรวนทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SAS

ผลการศึกษา

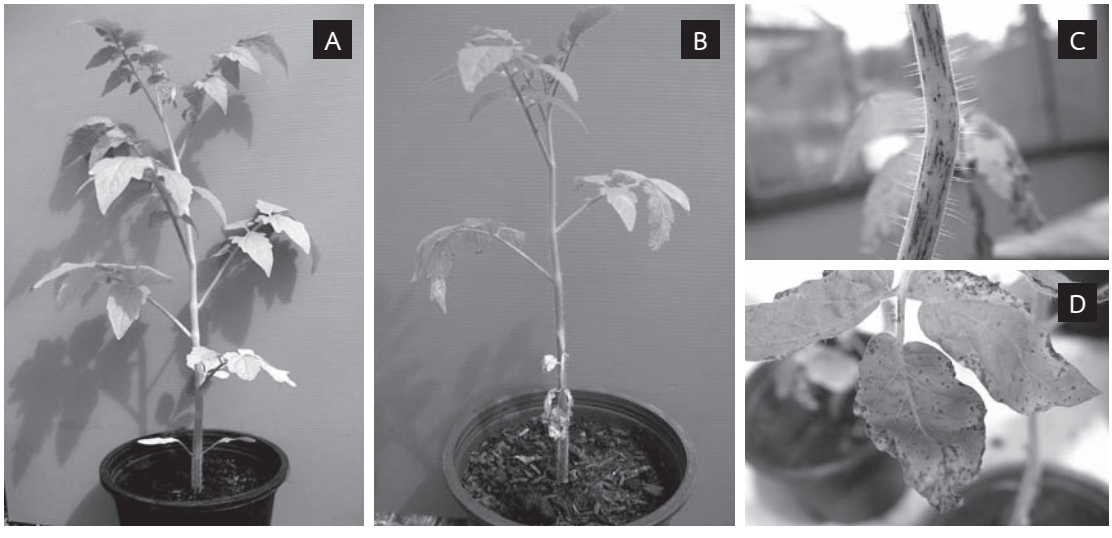
การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการชักนำให้มะเขือเทศสร้างความต้านทานโรคใบจุดเป้ากระสุนที่เกิดจากเชื้อรา *Corynespora cassiicola*

เชื้อรา *Trichoderma* T24, T17 และ 88 สามารถชักนำให้ต้นมะเขือเทศมีความต้านทานต่อโรคใบจุดเป้ากระสุนได้ดีที่สุด โดยไอโซเลต T24 มีจำนวนจุดแผลเฉลี่ยต่อต้นต่ำที่สุด คือ 41.0 จุด รองมาคือ ไอโซเลต T17 และ 88 มีจำนวนจุดแผลเฉลี่ยต่อต้นเท่ากับ 43.3 และ 55.7 จุด ตามลำดับ ขณะที่กรรมวิธีควบคุมซึ่งปลูกเชื้อรา *C. cassiicola* เพียงอย่างเดียวมีจำนวนจุดแผลเฉลี่ยต่อต้นเท่ากับ 254.3 จุด มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่1 และรูปที่1) เมื่อพิจารณาเปอร์เซ็นต์การลดลงของจำนวนจุดแผลพบว่ามะเขือเทศที่ปลูกด้วยเชื้อรา *Trichoderma* ไอโซเลต T24, T17 และ 88 มีจำนวนจุดแผลลดลงถึง 83.9, 83.1 และ 78.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (ตารางที่ 1 และรูปที่ 2)

การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายจากใบมะเขือเทศ

ใบของต้นมะเขือเทศที่ปลูกด้วยเชื้อรา *Trichoderma* ไอโซเลต 162 มีกิจกรรมของเอนไซม์ chitinase สูงที่สุด เท่ากับ 857.2 µmol (GlcNac equivalent)/mg protein/hr รองลงมาคือ ใบของต้นมะเขือเทศที่ปลูกด้วยเชื้อรา *Trichoderma* ไอโซเลต T18 และ T13 เท่ากับ 763.7 และ 750.7 µmol (GlcNac equivalent)/mg protein/hr ตามลำดับ (ตารางที่ 2) สำหรับกิจกรรมของเอนไซม์ protease พบสูงที่สุดในใบของต้นมะเขือเทศ

ที่ปลูกด้วยเชื้อรา *Trichoderma* ไอโซเลต 85 เท่ากับ 850.3 µmol of amino acid (tyrosine equivalent)/mg protein/hr รองมาคือ ใบมะเขือเทศที่ปลูกด้วยเชื้อรา *Trichoderma* ไอโซเลต 67 และ 115 เท่ากับ 778.0 และ 775.5 µmol of amino acid (tyrosine equivalent)/mg protein/hr ตามลำดับ (ตารางที่ 2) ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์ β-1,3-glucanase นั้น พบสูงในใบของต้นมะเขือเทศที่ปลูกด้วยเชื้อรา *Trichoderma* ไอโซเลต T4, 103 และ 106 มีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 498.6, 471.1 และ 466.4 µmol (glucose equivalent)/mg protein/hr ตามลำดับ (ตารางที่ 2)



รูปที่ 1. อาการใบจุดเป้ากระสุนบนใบและต้นมะเขือเทศหลังจากปลูกเชื้อเป็นเวลา 14 วัน; A: ปลูกเชื้อด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ; B, C และ D: ปลูกด้วยเชื้อรา *Corynespora cassiicola* เพียงอย่างเดียว

รูปที่ 2. อาการใบจุดเป้ากระสุนบนใบมะเขือเทศหลังจากปลูกเชื้อรา *Trichoderma* ไอโซเลต T24 ร่วมกับเชื้อรา *Corynespora cassiicola* เป็นเวลา 14 วัน

ตารางที่ 1 จำนวนจุดแผลที่เกิดขึ้นบนใบมะเขือเทศหลังจากปลูกเชื้อรา Corynespora cassiicola ร่วมกับเชื้อรา *Trichoderma* ไอโซเลตต่างๆ เป็นเวลา 14 วัน

ไอโซเลต	จำนวนจุดแผลเฉลี่ย[1/]	จำนวนจุดแผลลดลง (%)	ไอโซเลต	จำนวนจุดแผลเฉลี่ย[1/]	จำนวนจุดแผลลดลง (%)
T1	106.7 b-g	58.6	77	67.7 d-g	73.4
T4	58.7 e-g	76.9	78	93.3 c-g	63.3
T9	114.3 b-f	55.1	85	86.7 c-g	65.9
T10	68.3 d-g	73.1	88	55.7 efg	78.1
T13	84.0 c-g	67.0	89	98.7 b-g	61.2
T14	73.3 d-g	71.2	90	64.0 d-g	74.8
T17	43.3 fg	83.0	103	111.7 b-f	56.1
T18	91.0 c-g	64.2	106	108.3 b-g	57.0
T19	125.7 b-f	50.6	111	169.3 abc	33.4
T20	106.7 b-g	58.1	115	81.7 c-g	67.9
T21	93.3 c-g	63.3	119	200.0 ab	21.4
T24	41.0 g	83.9	122	106.7 b-g	58.1
T25	106.7 b-g	58.1	133	86.7 c-g	65.9
T30	147.7 bcd	41.9	139	71.3 d-g	72.0
T35	149.7 bcd	41.4	162	103.3 b-g	59.4
38	122.7 b-f	51.8	177	90.7 c-g	64.4
57	73.0 d-g	71.3	Control1	0.0 h	-
67	70.0 d-g	72.5	Control2	0.0 h	-
74	70.7 d-g	72.2	Control3	254.3 a	100.0
F-test	**		**F-test**	**	
C.V. (%)	**22.1**		**C.V. (%)**	**22.1**	

Control 1 = ปลูกเชื้อด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ

Control 2 = ปลูกเชื้อด้วยเชื้อรา *Trichoderma* spp. เพียงอย่างเดียว

Control 3 = ปลูกเชื้อด้วยเชื้อรา *C. cassiicola* เพียงอย่างเดียว

[1/] ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรเดียวกันในแนวตั้งเดียวกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P > 0.01$, DMRT) ต่างๆ เป็นเวลา 14 วัน

ตารางที่ 2. กิจกรรมของเอนไซม์ chitinase, protease และ β-1,3-glucanase จากใบมะเขือเทศที่ปลูกด้วยเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่างๆ ร่วมกับเชื้อรา *Corynespora cassiicola* เป็นเวลา 14 วัน

ไอโซเลต	กิจกรรมของเอนไซม์ **Chitinase** [µmol(GlcNAc equivalent)/mg protein/hr][1/]	กิจกรรมของเอนไซม์ **Protease** [µmol(tyrosine equivalent)/mg protein/hr][1/]	กิจกรรมของเอนไซม์ **β-1,3-glucanase** [µmol(glucose equivalent)/mg protein/hr][1/]
T1	744.5 a-d	646.3 b-e	276.9 c-m
T4	746.9 abc	683.3 a-e	498.6 a
T9	727.8 a-d	672.2 a-e	304.6 b-k
T10	723.0 a-d	637.5 b-e	222.5 g-m
T13	750.7 a-c	693.1 a-e	404.5 a-g
T14	699.7 a-e	577.4 de	251.1 d-m
T17	705.5 a-d	575.1 de	228.1 e-m
T18	763.7 ab	558.2 de	413.7 a-e
T19	731.6 a-d	632.0 b-e	276.0 c-m
T20	653.8 a-g	689.1 a-e	236.7 e-m
T21	583.5 b-g	706.6 a-e	319.2 a-j
T24	639.2 b-g	558.6 de	96.9 m
T25	722.5 a-d	648.4 b-e	286.6 b-l
T30	629.2 b-g	746.8 a-d	312.3 a-k
T35	477.7 f-h	558.1 cde	223.8 f-m
38	575.5 b-g	672.8 a-e	319.2 a-j
57	573.8 b-g	714.5 a-e	144.3 j-m
67	561.2 b-g	778.0 ab	406.2 a-g
74	539.1 c-g	583.4 de	211.4 h-m
77	574.8 b-g	709.2 a-e	186.7 h-m
F-test	**	**	**
C.V.(%)	**16.7**	**14.1**	**22.2**

Control 1 = ใบของต้นมะเขือเทศปลูกเชื้อด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ

Control 2 = ใบของต้นมะเขือเทศปลูกเชื้อด้วยเชื้อรา *Corynespora cassiicola* เพียงอย่างเดียว

[1/] ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรเดียวกันในแนวตั้งเดียวกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (P > 0.01, DMRT)

ตารางที่ 2. กิจกรรมของเอนไซม์ chitinase, protease และ β-1,3-glucanase จากใบมะเขือเทศที่ปลูกด้วยเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่างๆ ร่วมกับเชื้อรา *Corynespora cassiicola* เป็นเวลา 14 วัน (ต่อ)

ไอโซเลต	กิจกรรมของเอนไซม์ **Chitinase** [µmol(GlcNAc equivalent)/mg protein/hr][1/]	กิจกรรมของเอนไซม์ **Protease** [µmol(tyrosine equivalent)/mg protein/hr][1/]	กิจกรรมของเอนไซม์ **β-1,3-glucanase** [µmol(glucose equivalent)/mg protein/hr][1/]
78	593.6 b-g	708.7 a-e	362.4 a-i
85	492.5 e-h	850.3 a	448.3 abc
88	564.5 b-g	561.6 de	111.7 lm
89	606.1 b-g	713.0 a-e	411.1 a-f
90	619.2 b-g	605.7 b-e	130.4 klm
103	711.0 a-d	719.4 a-e	471.1 ab
106	763.6 a-f	713.2 a-e	466.4 ab
111	587.1 b-g	641.0 b-e	403.8 a-g
115	616.7 b-g	775.5 abc	437.4 a-d
119	565.7 b-g	720.3 a-e	435.2 a-d
122	530.1 d-g	713.2 a-e	341.3 a-i
133	577.8 b-g	539.8 ef	185.4 i-m
139	706.7 a-d	611.4 b-e	266.1 c-m
162	857.2 a	733.6 a-d	453.5 abc
177	456.8 gh	696.8 a-e	252.4 d-m
Control1	337.7 h	389.5 f	182.1 i-m
Control2	637.7 b-g	713.2 a-e	373.6 a-h
F-test	**	**	**
C.V.(%)	**16.7**	**14.1**	**22.2**

Control 1 = ใบของต้นมะเขือเทศปลูกเชื้อด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ

Control 2 = ใบของต้นมะเขือเทศปลูกเชื้อด้วยเชื้อรา *Corynespora cassiicola* เพียงอย่างเดียว

[1/] ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรเดียวกันในแนวตั้งเดียวกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (P > 0.01, DMRT)

สรุปและวิจารณ์

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. จำนวน 35 ไอโซเลต ในการชักนำให้ต้นมะเขือเทศสร้างความต้านทานโรคใบจุดเป้ากระสุนที่เกิดจากเชื้อรา *C. cassiicola* พบว่าเชื้อรา *Trichoderma* ไอโซเลต T24, T17 และ 88 สามารถชักนำให้ต้นมะเขือเทศมีความต้านทานโรคได้มากที่สุด มีจำนวนจุดแผลเฉลี่ยต่อต้นน้อยที่สุด สามารถลดจำนวนจุดแผลได้ถึง 83.9, 83.1 และ 78.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายในใบของต้นมะเขือเทศที่ปลูกด้วยเชื้อรา *C. cassiicola* ร่วมกับเชื้อรา *Trichoderma* ทั้ง 35 ไอโซเลต พบว่าใบของต้นมะเขือเทศที่ได้รับการปลูกเชื้อรา *Trichoderma* ไอโซเลต 162 มีกิจกรรมของเอนไซม์ chitinase สูงที่สุด และพบกิจกรรมของเอนไซม์ β-1,3-glucanase ในระดับสูง เช่นเดียวกับใบของต้นมะเขือเทศที่ปลูกด้วยเชื้อรา *Trichoderma* ไอโซเลต T4 พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์ β-1,3–glucanase สูงที่สุด และมีกิจกรรมของเอนไซม์ chitinase ในระดับสูง และยังพบว่าใบของต้นมะเขือเทศที่ปลูกด้วยเชื้อรา *Trichoderma* ไอโซเลต 85 มีกิจกรรมของเอนไซม์ protease สูงที่สุด และพบกิจกรรมของเอนไซม์ β -1,3–glucanase ในระดับสูงอีกด้วย ซึ่งมีความสอดคล้องกับการศึกษาของ Charirak และคณะ (2008) ที่ได้ศึกษาการชักนำให้ต้นมะเขือเทศมีความต้านทานต่อโรคใบจุดที่เกิดจากเชื้อรา *Stemphylium solani* และเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas vesicotoria* pv. *vesicatoria* โดยใช้เชื้อรา *Trichoderma* พบว่า ต้นมะเขือเทศที่ปลูกเชื้อรา *Trichoderma* ไอโซเลต T18 สามารถลดจำนวนแผลจุดที่เกิดจากเชื้อรา *S. solani* ได้ 19.2 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเชื้อรา *Trichoderma* ไอโซเลต T9 สามารถลดจำนวนจุดเนื้อเยื่อตายบนใบมะเขือเทศได้ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *X. vesicotoria* pv. *vesicatoria* ได้ 62.3 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้พบว่าต้นมะเขือเทศมีกิจกรรมของเอนไซม์ chitinase และ β-1,3–glucanase เพิ่มขึ้นสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม หลังจากปลูกเชื้อเป็นเวลา 14 วัน

การใส่เชื้อรา *Trichoderma* spp. ลงไปในดินนอกจากจะช่วยควบคุมโรคพืชทางดินได้โดยตรงแล้ว ยังสามารถชักนำให้ต้นมะเขือเทศสร้างความต้านทานโรคได้จากการกระตุ้นการทำงานของยีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตัวเองของพืช ส่งผลให้พืชสร้างเอนไซม์ย่อยสลายในปริมาณเพิ่มมากขึ้น ทั้งนี้เชื้อรา *Trichoderma* spp. เองสามารถสร้างเอนไซม์ chitinase ได้เช่นกัน และยีน chitinase ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. สามารถเพิ่มปริมาณและโคลนยีนได้ จากผลการทดลองดังกล่าวจึงได้ทำการคัดเลือกเชื้อรา *Trichoderma* ไอโซเลต 162 เพื่อนำไปศึกษาการโคลนยีน chitinase และการใช้ประโยชน์จากยีน chitinase เนื่องจากมีกิจกรรมของเอนไซม์ chitinase สูงที่สุด รวมทั้งมีกิจกรรมของเอนไซม์ protease และ β-1,3–glucanase ในระดับสูง ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับเชื้อรา *Trichoderma* ไอโซเลตที่มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุด เมื่อพิจารณาถึงความสามารถในการสร้างความต้านทานโรคใบจุดเป้ากระสุนของเชื้อรา *Trichoderma* ไอโซเลต 162 พบว่าสามารถลดจำนวนจุดแผลได้ 59.4 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้ความสามารถในการควบคุมโรคพืชของเชื้อรา *Trichoderma* แต่ละไอโซเลตนั้นจะอาศัยกลไกการควบคุมโรคพืชที่แตกต่างกันไป เช่น การแข่งขันเพื่อครอบครองพื้นที่ การสร้างสารปฏิชีวนะ และการเป็นปรสิต หรืออาศัยกลไกการควบคุมโรคพืชหลายกลไกร่วมกัน จึงส่งผลให้เชื้อรา *Trichoderma* แต่ละไอโซเลตมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคแตกต่างกันไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่ง จากศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตรเพื่อเศรษฐกิจที่ยั่งยืน มหาวิทยาลัยขอนแก่นและศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สบว.) สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ (AG-BIO/PERDO-CHE)

เอกสารอ้างอิง

Bigirimana, J., De Meyer G., Poppe J., Y. Elad, and M. Hofte. 1997. Induction of systemic resistance on bean (*Phaseolus vulgaris*) by *Trichoderma harzianum*. **Med. Fac. Landbouw, Univ. Gent.** 62: 1001-1007.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem. 72:** 248-254.

Charirak, P., W. Saksirirat, and W. Bunyatratchata. 2008. **Effect of antagonistic fungi, *Trichoderma* spp. on enzyme activity induction of β-1,3-glucanase and chitinase derived from tomato leaf**. 9th National Grad Research Conference. 14-15 March 2008.

Homer, DW., DK. Bell, and CA. Jaworki. 1972. Efficacy of *Trichoderma harzianum* as a biocontrol for Sclerotium rolfsii. **Phytopathology** 62: 442-447.

Hurtado, O. 2004. **Study and manipulation of the salicylic acid-dependent defense pathway in plants parasitized by *Orobanche aegyptiaca* Pers.** Master of Sciences Thesis, Plant Physiology, Virginia Polytechnic Institute and State University, USA.

Johnson, LE., EC. Bernard, and P. Qian. 1987. Isolation of *Trichoderma* spp. at low temperature from **Tennessee and Alaska. Soil. Pl. Dis.** 71: 137-140.

Saksirirat, W. and HH. Hoppe. 1991. Secretion of extracellular enzyme by *Verticillium psalliotae* Treschow and *Verticillium lecanii* (Zimm,) Viegas during growth on uredospore of the soybean rust fungus (*Phakopsora pachryrhizi* Syd). Inliquid cultures. **J. Phytopathol.** 131: 161-173.

Somogyi, M. 1952. Notes on sugar determination. **J. Bio. Chem.** 195: 19-23.

Yang, SS. and Y. Wang. 1999. **Protease and amulase production of *Streptomyces rimosus* in submerged and solid state cultivations.** Bot. Bull. Acad. Sin. 40: 259-265.

Van Loon, LC. and EA. Van Strien. 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiol. Molec. Pl. Pathol.** 55: 85-97.