

รายงานการวิจัย

เรื่อง

การคัดเลือกและวิเคราะห์หายีนที่ต้านสาร Benzimidazole
ของ *Trichoderma harzianum* โดยเทคนิค Expressed
Sequence Tags (ESTs)

Screening and identification of benzimidazole resistant
genes of *Trichoderma harzianum* by Expressed
Sequence Tags (ESTs)

คณะผู้วิจัย

ที่ปรึกษา Prof. Dr. Yang Qian

หัวหน้าโครงการ รศ.ดร. ดุชนิ ชนะบริพัฒน์

ผู้ร่วมโครงการ รศ.ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง

ผู้ร่วมโครงการ ผศ.ดร. สุพิตรา โพธิ์เอี่ยม

ผู้ร่วมโครงการ ผศ.ดร. อุ่นเรือน เพชรวัลย์

REH
AK
625
M4

๑๗๐๓๖

73032

27 ส.ย. 2550

ปีงบประมาณ 2548-2549

b. 119๒๗๙๙

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ทางการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่องการคัดเลือกและวิเคราะห์หายีนที่ต้านสาร Benzimidazole ของ *Trichoderma harzianum* โดยเทคนิค Expressed Sequence Tags (ESTs) ได้รับงบประมาณสนับสนุนจากแหล่งทุน ประจำปีงบประมาณ 2548 ของสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และเป็นส่วนหนึ่งของโครงการความร่วมมือทางวิชาการกับ Department of Life Science, Harbin Institute of Technology ประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทคัดย่อ

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่คัดเลือกได้จากดินธรรมชาติในประเทศไทยและทำการจำแนกเชื้อรา *Trichoderma* sp. สายพันธุ์ต่างๆด้วยเทคนิคการหาการหาลำดับเบสของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสของเชื้อราจำนวน 14 ตัวอย่าง สามารถแบ่งเชื้อราออกได้เป็น 4 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ *Trichoderma asperellum* จากตัวอย่าง TISTR 3329, TISTR 3553, SRS 1, KMC 5, MK และ SRS 4 สายพันธุ์ *Trichoderma erinaceum* จากตัวอย่าง KSR สายพันธุ์ *Trichoderma ghanennse* จากตัวอย่าง CHA, CHA 4 และ CHA 6 และสายพันธุ์ *Trichoderma longibrachiatum* จากตัวอย่าง SCP 2 และ SCP 3 สำหรับตัวอย่างชื่อ SCP 1 และ SCP 4 พบว่าเป็น *Trichoderma* sp. เช่นกัน แต่ไม่สามารถระบุสายพันธุ์ได้ สำหรับการศึกษาในจีโนมของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* โดยเทคนิค EST พบว่ายีน 55 ตัวของเชื้อรานี้มีคุณสมบัติเกี่ยวข้องกับการควบคุมโรคพืช

Abstract

From the morphological studies of *Trichoderma* spp. isolated from natural soil in Thailand and further identified by DNA sequencing technique using polymerase chain reaction, the result showed that 14 isolates were divided into 4 groups, i.e., isolates TISTR 3329, TISTR 3553, SRS 1, KMC 5, MK and SRS 4 belong to *Trichoderma asperellum*, isolate KSR belongs to *Trichoderma erinaceum*, isolates CHA, CHA 4 และ CHA 6 belong to *Trichoderma ghanense* and isolates SCP 2 and SCP 3 belong to *Trichoderma longibrachiatum* and isolates SCP 1 and SCP 4 belong to *Trichoderma* sp. However the species of isolates SCP 1 and SCP 4 could not be identified. When genome study of *Trichoderma harzianum* by EST analysis was investigated, 55 bio-control related genes have been isolated.

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ	ก.
บทคัดย่อ	ข.
Abstract	ค.
สารบัญ	ง.
สารบัญตาราง	จ.
สารบัญรูป	ฉ.
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	2
1.2 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	3
2.1 ลักษณะทั่วไปของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp.	3
2.2 การควบคุมโรคพืชด้วยเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp.	6
2.3 การจำแนกสายพันธุ์เชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp.	7
2.4 เทคนิค Expressed Sequence Tags	10
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ	12
3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี	12
3.2 วิธีการทดลอง	13
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์	18
4.1 การแยกเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. จากดินธรรมชาติ	18
4.2 การศึกษาสัณฐานวิทยาของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. ที่แยกได้จากดินธรรมชาติ	19
4.3 การสกัดดีเอ็นเอ	29
4.4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส	29
4.5 การตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (PCR-RFLP)	30
4.6 การศึกษายีนไนจีโนมของเชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> โดยเทคนิค EST	36
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย	39
เอกสารอ้างอิง	40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก.	สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ	45
ภาคผนวก ข.	การเตรียมสีย้อม	47
ภาคผนวก ค.	Key to species aggregates of <i>Trichoderma</i>	48
ภาคผนวก ง.	Key to species of <i>Trichoderma</i> section <i>Longibrachiatum</i>	50
ภาคผนวก จ.	Key to the section <i>Trichoderma</i>	51
ภาคผนวก ฉ.	Dichotomous key to species in <i>Trichoderma</i> section	52



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 4.1 แหล่งที่มาของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. ไอโซเลทต่างๆที่แยกได้จากดินธรรมชาติ	18
ตารางที่ 4.2 แสดงแหล่งที่มาของเชื้อ <i>Trichoderma</i> sp. จำนวน 15 ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง	29
ตารางที่ 4.3 การวิเคราะห์ลำดับ EST (EST sequence analysis) ของ <i>Trichoderma harzianum</i>	37
ตารางที่ 4.4 known high redundancy gene	38



สารบัญญรูป

	หน้า	
รูปที่ 1.1	ลักษณะของ <i>Trichoderma</i> spp. ที่เจริญบนอาหาร PDA	4
รูปที่ 1.2	โครงสร้างของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> sp.	4
รูปที่ 4.1	เชื้อ <i>Trichoderma</i> spp. ไอโซเลท CHA 4 ที่แยกได้จากรากต้นมันสำปะหลัง (อ.บ้านบัว จ. ชลบุรี)	21
รูปที่ 4.2	เชื้อ <i>Trichoderma</i> spp. ไอโซเลท KMC 5 ที่แยกได้จากดินปลูก (แปลงปลูกข้าวโพดทดลอง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง)	22
รูปที่ 4.3	เชื้อ <i>Trichoderma</i> spp. ไอโซเลท KSR ที่แยกได้จากดินปลูก (แปลงปลูก สับปะรด อ. เขาสก จ. สุราษฎร์ธานี)	23
รูปที่ 4.4	เชื้อ <i>Trichoderma</i> spp. ไอโซเลท SCP 1 ที่แยกได้จากดินปลูก (ไร่บัวสวรรค์ อ.ดอนเจดีย์ จ. สุพรรณบุรี)	24
รูปที่ 4.5	เชื้อ <i>Trichoderma</i> spp. ไอโซเลท SCP 2 ที่แยกได้จากดินปลูก (ไร่บัวสวรรค์ อ.ดอนเจดีย์ จ. สุพรรณบุรี)	25
รูปที่ 4.6	เชื้อ <i>Trichoderma</i> spp. ไอโซเลท SCP 3 ที่แยกได้จากดินปลูก (ไร่บัวสวรรค์ อ.ดอนเจดีย์ จ. สุพรรณบุรี)	26
รูปที่ 4.7	เชื้อ <i>Trichoderma</i> spp. ไอโซเลท SCP 4 ที่แยกได้จากดินปลูก (ไร่บัวสวรรค์ อ.ดอนเจดีย์ จ. สุพรรณบุรี)	27
รูปที่ 4.8	เชื้อ <i>Trichoderma</i> spp. ไอโซเลท SRS 4 ที่แยกได้จากดินปลูก (แปลงสับปะรด อ.เขาสก จ. สุราษฎร์ธานี)	28
รูปที่ 4.9	แสดงขนาดของดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสของตัวอย่างเชื้อทั้ง 15 ชนิดโดยมีดีเอ็นเอขนาด 100 bp เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน	31
รูปที่ 4.10	แสดงขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Hind</i> III โดยมีดีเอ็นเอขนาด 100 bp เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน	31
รูปที่ 4.11	แสดงขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Hae</i> III โดยมีดีเอ็นเอขนาด 100 bp เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน	32

รูปที่ 4.12	แสดงขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Sma</i> I โดยมีดีเอ็นเอขนาด100 bp เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน	33
รูปที่ 4.13	แสดงขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Bam</i> HI โดยมีดีเอ็นเอขนาด100 bp เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน	34



บทที่ 1

บทนำ

การเพาะปลูกพืชในประเทศไทยส่วนใหญ่มุ่งเน้นการเพิ่มผลผลิตทั้งทางด้านคุณภาพและด้านปริมาณ โดยพบว่าโรคพืชและแมลงศัตรูพืชมักเป็นปัญหาสำคัญต่อการเพาะปลูกพืช โดยทำให้เกิดความเสียหายแก่ผลผลิต ซึ่งอาจเริ่มขึ้นตั้งแต่เริ่มเพาะปลูกจนกระทั่งหลังการเก็บเกี่ยว การควบคุมโรคพืชและแมลงศัตรูพืชมีหลายวิธี แต่วิธีที่ง่ายและได้ผลเร็วก็คือการใช้สารเคมี เนื่องจากมีข้อดีคือ ออกฤทธิ์รวดเร็ว มีประสิทธิภาพที่แน่นอน และเห็นผลชัดเจน สะดวกต่อการใช้งานและการเก็บรักษา แต่มีข้อเสีย คือ มีค่าใช้จ่ายสูงเพราะต้องใช้เป็นประจำและต่อเนื่อง และเมื่อใช้ไประยะหนึ่งจะเกิดการดื้อต่อสารเคมี ทำให้ต้องเพิ่มอัตราการใช้สารเคมีในปริมาณมากขึ้น หรือเปลี่ยนชนิดของสารเคมี รวมทั้งใช้สารเคมีในหลายๆกลุ่ม ซึ่งทำให้เกิดปัญหาต่อสิ่งแวดล้อม เกิดการปนเปื้อนและการตกค้างของสารเคมี ในผลิตผลการเกษตรและในสิ่งแวดล้อม ตลอดจนทำให้สมดุลของจุลินทรีย์และสิ่งมีชีวิตในดินตามธรรมชาติเสียไป นอกจากนี้ยังทำให้ปริมาณจุลินทรีย์และสิ่งมีชีวิตที่มีประโยชน์ลดลงด้วย และมีผลกระทบต่อสุขภาพของเกษตรกรผู้ใช้และผู้บริโภคอีกด้วย

ในปัจจุบันได้มีการศึกษาค้นคว้าหาวิธีการควบคุมศัตรูพืชใหม่ๆ เพื่อลดปัญหาอันตรายและปัญหาสภาพแวดล้อมเป็นพิษอันเนื่องมาจากการใช้สารเคมีทางการเกษตรที่เพิ่มขึ้น โดยให้เกษตรกรเปลี่ยนมาใช้ในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี (biocontrol) โดยการนำสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะจุลินทรีย์มาใช้ในการยับยั้งหรือทำลายโคพืชที่เกิดจากเชื้อรา แบคทีเรีย ไวรัส และแมลง เช่น การนำเชื้อรามาใช้ในการควบคุมโรคพืชแทนการใช้สารเคมี เพื่อเป็นการลดปริมาณการใช้สารเคมีและป้องกันมลพิษที่อาจจะเกิดขึ้น ซึ่งกลุ่มเชื้อราที่นิยมนำมาใช้ในการควบคุมโรคพืชได้แก่เชื้อรา *Trichoderma* sp. และ *Chaetomium* sp. (Yang et al., 2005) โดยเชื้อรา *Trichoderma* sp. เป็นเชื้อราที่ได้รับความสนใจมากที่สุดและเป็นที่ยอมรับกันอย่างแพร่หลายในประเทศไทย (จระเข้และคณะ, 2545) เนื่องจากเชื้อราชนิดนี้นอกจากจะมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืชโดยการสร้างสารปฏิชีวนะและ ergosterol ต่างๆ แล้ว ยังมีส่วนช่วยในการเร่งการเจริญเติบโตของพืช ช่วยเพิ่มผลผลิตของพืช และยังสามารถเพิ่มความต้านทานโรคให้แก่พืชอีกด้วย แต่เนื่องจากเชื้อรา *Trichoderma* นั้นมีหลายสายพันธุ์ และแต่ละสายพันธุ์ก็มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืชที่แตกต่างกันไป มีการนำเชื้อรา *Trichoderma* สายพันธุ์ต่างๆมาใช้ในการการค้า เช่น การใช้เชื้อรา *T. harzianum* ในการควบคุมโรค root disease ที่เกิดจากที่ที่เกิดจากเชื้อรา *Fusarium*, *Rhizoctonia* และ *Pythium* หรือการใช้เชื้อรา *T. viride* ควบคุมโรค seedling rot และ damping-off ของ ผัก ถั่วเหลืองและถั่วอื่นๆ (Whipps and Lumsden, 2001) เป็นต้น สารต่างๆที่เชื้อรา *T. harzianum* ผลิตขึ้นและมีผลในการยับยั้งจุลินทรีย์ต่างๆ ได้แก่ ยาปฏิชีวนะ และเอนไซม์ชนิดต่างๆ เช่น β -1,3-glucanase, chitinase และ protease (Carlie et al., 2001; El-Katatny et al., 2001) สารต่างๆเหล่านี้เป็นผลผลิตที่ได้จากการควบคุมโดยยีนบนโครโมโซม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของเชื้อรา *T. harzianum* และถึงแม้ว่าเชื้อรา *T. harzianum* จะมีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคกับพืชเศรษฐกิจ แต่การนำไปใช้ยังมีข้อจำกัด เนื่องจากเชื้อราไม่สามารถเจริญได้ในดินที่มีสารฆ่าเชื้อรา โดยเฉพาะสารเคมี Benzimidazole ซึ่งเป็นสารที่นิยมใช้ในการกำจัดเชื้อรา ปัจจุบันมีการศึกษาจีโนม (genome) ของเชื้อราที่ใช้ในการควบคุมโรคพืช โดยใช้ข้อมูลจาก Expressed Sequence Tags (ESTs) ดังเช่น ในปีค.ศ. 2003 Jin และ Yang ได้ศึกษาและสร้าง cDNA library ของ *Chaetomium globosum* และหา EST ของเชื้อรา พบยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง cephalosporin C และยีนใหม่ๆประมาณ 500 ยีน ซึ่งการศึกษา EST เป็นวิธีการศึกษาถึงยีนที่มีอยู่ในจีโนมของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ เพื่อค้นหายีนใหม่ๆ และทำให้ทราบถึงกลไกการทำงานของยีน กลไกการออกฤทธิ์และการผลิตสารชีวโมเลกุลของสิ่งมีชีวิตเหล่านั้น ดังนั้นจึงควรศึกษาหา ยีนที่ทนต่อสารฆ่าเชื้อราในกลุ่มนี้ เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการนำไปปรับปรุงพันธุ์ เพื่อให้ได้ *T. harzianum* ที่มีประสิทธิภาพต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Trichoderma* spp. จากแหล่งดินต่างๆในประเทศไทย
2. คัดเลือกและจำแนกเชื้อรา *Trichoderma* spp. สายพันธุ์ต่างๆออกจากกัน
3. เป็นข้อมูลในการพัฒนาเชื้อราที่มีประสิทธิภาพเป็นสารชีวภัณฑ์ที่สามารถนำมาใช้ในการกำจัดโรคพืชในโรงเรือนหรือในแปลงเพาะปลูก
4. ศึกษา ยีนของ *T. harzianum* ที่ทนต่อสาร Benzimidazole

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ข้อมูลเชื้อรา *Trichoderma* spp. สายพันธุ์ต่างๆ
2. ทราบถึงยีนของเชื้อรา *T. harzianum* ที่ทนต่อสาร Benzimidazole
3. สามารถนำข้อมูลและสายพันธุ์ต่างๆของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไปใช้ประโยชน์ในการควบคุมโรคพืช

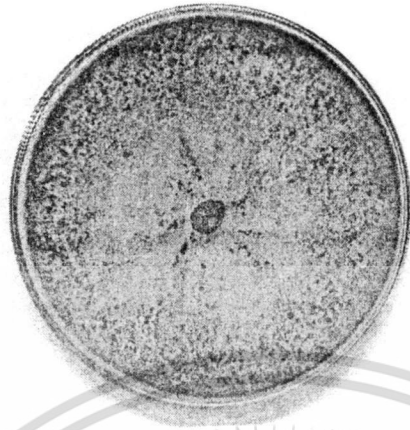
บทที่ 2

ทฤษฎีและหลักการ

2.1 ลักษณะทั่วไปของเชื้อรา *Trichoderma* spp.

เชื้อรา *Trichoderma* spp. เป็นเชื้อราที่พบทั่วไปในดิน และไม่พบว่ามีอาการเจริญบนพืชที่มีชีวิต จัดจำแนกอยู่ใน sub-division Deuteromycota, form-class Hyphomycetes, form-family Moniliaceae มี teleomorph (perfect stage) อยู่ใน genus *Hypocrea* spp. ซึ่งเป็นเชื้อราใน phylum Ascomycota, order Hypocreales (Samuels, 1996) ลักษณะทาง anamorph (imperfect stage) ของเชื้อราชนิดนี้สร้าง conidiophore มีสีจาง หรือไม่มีสี แตกแขนงมาก พบ phialide เกิดเดี่ยวๆ หรือเป็นกลุ่ม conidia หรือ phialospore เป็นแบบเชลล์เดี่ยว รูปไข่ ไม่มีสี เกิดเป็นกลุ่มเล็กๆ ที่ปลาย phialide โคโลนีสามารถเจริญบนอาหารได้อย่างรวดเร็ว (รูปที่ 1.1) ลักษณะของเส้นใยที่เจริญออกมาเริ่มแรกจะเป็นสีขาว เมื่อเชื้อราอายุมากขึ้นจะเปลี่ยนเป็นสีเขียวเข้ม เนื่องจากการสร้างสปอร์มากขึ้น ก้านชูสปอร์จะแตกกิ่ง (รูปที่ 1.2) ก้านมีลักษณะเป็นข้อ สปอร์ส่วนใหญ่จะมีสีเขียว มี 1 เซลล์ ลักษณะรูปไข่ ผิวเรียบ หรือขรุขระ เจริญออกมาจากส่วนปลายของเส้นใย มีขนาดเฉลี่ย 3.2×2.7 ไมครอน สามารถเจริญได้อย่างรวดเร็ว chlamydo-spore จะเจริญระหว่างหรือส่วนปลายของเส้นใย มีลักษณะกลมใส เส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ย 6.9 ไมครอน (Homer *et al.*, 1972) เชื้อรา *Trichoderma* ที่พบทั่วไปในดินสามารถที่จะเจริญแข่งขันกับเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 15-21 องศาเซลเซียส และสามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ที่อุณหภูมิเย็นจัดประมาณ 10-12 องศาเซลเซียส (Johnson *et al.*, 1987)

มีรายงานการจัดจำแนกเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไว้ทั้งหมด 11 ชนิด (species) โดย Domsch และคณะ (1980) และ Rifai (1969) ได้จัดจำแนกเชื้อรา *Trichoderma* spp. ออกเป็น 9 ชนิด โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ ลักษณะของโคโลนี ลักษณะของ conidia และ conidiophore เชื้อรา *Trichoderma* spp. เจริญได้ดีในดิน เศษซากพืช ซากสิ่งมีชีวิต รวมทั้งจุลินทรีย์และอินทรีย์วัตถุตามธรรมชาติ การควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชในดินโดยชีววิธีเป็นทางเลือกใหม่นอกจากการใช้สารเคมีเพื่อลดปัญหามลพิษ จากการศึกษาพบว่า *Trichoderma* หลายชนิดที่แยกได้จากดินเป็น จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืชที่เกิดจากเชื้อราทั้งภายใต้สภาพเรือนทดลองและแปลงปลูก (Chet and Inbar, 1994) โดยพบว่า *T. viride* เป็นชนิดที่พบมากในดิน สามารถปล่อยสารที่มีความเฉพาะเจาะจงในการทำลายเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืช Ingold and Hudson (1993) ได้ทดลองใช้ *T. viride* เพื่อควบคุมโรค Botrytis rot ขององุ่น โดยใช้ 4 ครั้ง ตั้งแต่เริ่มออกดอกจนถึง 3 สัปดาห์ก่อนการเก็บเกี่ยว พบว่าสามารถควบคุมโรคได้ นอกจากนี้ยังมีการค้นพบสายพันธุ์ของ *T. harzianum* ที่สามารถควบคุมโรคพืชได้หลายชนิด เช่น โรคเหี่ยวของมะเขือเทศ แดง ผ่าย และ Fusarium disease ของข้าวสาลี dry eye rot ของแอปเปิ้ล *T. harzianum* สายพันธุ์ 1295-22 เป็น



รูปที่ 1.1 ลักษณะของ *Trichoderma* spp. ที่เจริญบนอาหาร PDA



รูปที่ 1.2 โครงสร้างของเชื้อรา *Trichoderma* sp.

สายพันธุ์ทางการค้าที่สามารถเข้าครอบครองรากได้ดี (Whipps and Lumsden, 2001) นิภาพร (2538) ได้ทดสอบการควบคุมเชื้อโคนเน่าของมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อ *Sclerotium rolfsii* ด้วยเชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* (T20) ในสภาพแปลงปลูก พบว่าต้นมะเขือเทศรอดตาย 61.1% และเมื่อใช้ร่วมกับสารเคมี mancozeb ที่ความเข้มข้น 18,000 กรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าต้นมะเขือเทศรอดตายถึง 88.9 %

การศึกษาวิจัยเกี่ยวกับ *Trichoderma* spp. ในประเทศไทยมีมานาน โดยจิระเดชและววรรณวิไล (2542) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของ *T. harzianum* ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชในดินที่สำคัญ ได้แก่ *S. rolfsii*, *R. solani*, *Pythium* spp., *Phytophthora* spp. และ *Fusarium oxysporum* ทั้งนี้ได้เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนึงถึงปัญหาผลภาวะต่อสภาพแวดล้อมจากการใช้สารเคมี และปัญหาการต้านทานสารเคมีกำจัดเชื้อราของเชื้อราสาเหตุโรคพืชด้วย โดยมีการผลิต *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 เพื่อเป็นการค้า มีชื่อว่า UNIGREEN UN-1 ซึ่งเป็นความร่วมมือระหว่างบริษัท Uniseed (ประเทศไทย) และมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สำหรับกลไกในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชของเชื้อรา *Trichoderma* spp. มีหลายวิธี เช่น การสร้างสารปฏิชีวนะ การแข่งขันในแง่ของอาหารและที่อยู่ และการเป็นปรสิตต่อเชื้อสาเหตุโรคพืช เป็นต้น สำหรับความหลากหลายชนิดของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในประเทศไทยนั้น จินตนา (2543) ได้ศึกษาถึงชนิดของเชื้อรา *Trichoderma* spp. และ *Gliocladium* sp. ในดินทั่วไป โดยได้ศึกษาถึงการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* ที่เป็นสาเหตุโรคนำระดับดินของคะน้า บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA พบว่าอัตราการเจริญและความสามารถในการเจริญของเชื้อรา *Trichoderma* spp. 4 ชนิด และ *Gliocladium* sp. 1 ชนิดในการเจริญคลุมทับโคโลนีของเชื้อรา *P. aphanidermatum* ต่างกันเล็กน้อย และเมื่อนำเมล็ดคะน้าปลูกด้วยผงเชื้อราทั้ง 5 ชนิด ก่อนเพาะปลูกในดินอบฆ่าเชื้อที่มี *P. aphanidermatum* เจริญอยู่ ปรากฏว่าระดับการเกิดโรคของต้นกล้า ที่โผล่พ้นดิน หรือโรคนำระดับดินหลังงอกมีอัตราต่ำกว่าการทดลองควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

นอกจากการศึกษาถึงการนำ *Trichoderma* spp. มาใช้ควบคุมโรคพืชแล้ว ยังมีการศึกษาถึงการคัดเลือกและการปรับปรุงพันธุ์ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. เพื่อใช้ในการควบคุมการเจริญของเชื้อราที่สร้างสารพิษอีกด้วย เช่น การใช้เชื้อรา *T. viride*, *T. harzianum* และ *Trichoderma* สายพันธุ์อื่นๆ เพื่อควบคุมการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* และ *Fusarium moliniforme* (ดุชนันและคณะ, 2548; Calistru et al., 1997; Thanaboripat, 2002; Liu et al. 2004a,b) เป็นต้น

ประโยชน์ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. สามารถนำมาใช้ควบคุม ทำลาย หรือยับยั้งเชื้อราในดินที่เป็นสาเหตุโรคพืชที่ก่อให้เกิดอาการโรครากเน่าโคนเน่ากับพืช ทั้งใน พืชผัก พืชไร่ และไม้ผล ที่เกิดจากเชื้อ *Rhizoctonia solani*, *Pythium* spp., *Fusarium* spp., *Botrytis cinerea*, *Sclerotium rolfsii* และ *Phytophthora* spp. เป็นต้น (จิระเดช, 2538 ก; รัชชชัย, 2543) ในธรรมชาติจะมีเชื้อจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการนำมาใช้ควบคุมโรคพืช เรียกว่า เชื้อปฏิปักษ์ (antagonist) โดยเชื้อปฏิปักษ์จะมีกลไกควบคุมเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคพืช (Singh and Faull, 1988; Yang et al., 2005; Huang and Yang, 2005) ดังนี้

1) การแข่งขัน (competition)

เป็นลักษณะที่เกิดขึ้นเมื่อจุลินทรีย์ 2 ชนิดหรือมากกว่า มีความต้องการสารอาหาร อากาศ และพื้นที่อาศัย โดยปกติเชื้อจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในบริเวณเดียวกันในระบบนิเวศมักหลีกเลี่ยงการแข่งขันกัน โดยการครอบครองพื้นผิวดินหรือความลึกของผิวดินที่แตกต่างกัน แต่เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์จะมีความสามารถแข่งขันกับเชื้อโรคพืชในด้านต่างๆ ได้ดี เช่น การใช้สารอาหาร การใช้อากาศ และการครอบครองพื้นที่ได้ดีกว่า ทำให้เชื้อสาเหตุโรคพืชไม่สามารถเจริญเติบโต หรืออาศัยอยู่ในบริเวณที่มีเชื้อปฏิปักษ์ มีผลให้พืชเจริญเติบโตแข็งแรง ได้ผลผลิตสูงขึ้น จากการศึกษาของ Zhao และ Zhang

(1998) และ Tian และ Wang (2000) พบว่า *T. viride* สายพันธุ์ LTR-2 และ T5 มีความสามารถในการแข่งขันเจริญได้ดีกว่า *Botrytis cinerea*

2) การสร้างสารปฏิชีวนะ (antibiosis)

เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ได้รับความสนใจคัดเลือกมาใช้ในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีนั้น จะเน้นคุณสมบัติการสร้างสารปฏิชีวนะของเชื้อเป็นส่วนใหญ่ โดยเชื้อปฏิปักษ์มีความสามารถในการผลิตสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งหรือทำลายเชื้อโรคได้ เช่น สารพิษ (toxin) หรือสารปฏิชีวนะ (antibiotic) ซึ่งสารปฏิชีวนะที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นนั้น อาจเป็นสารที่ระเหยได้ หรือเป็นสารที่ระเหยไม่ได้ก็ได้ ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ จากรายงานของ Corley และคณะ (1994) พบว่า *T. harzianum* สามารถผลิตสาร harzianum A ซึ่งมีคุณสมบัติต้านทานเชื้อราได้ (antifungal activity)

3) การเป็นปรสิต (parasitism)

การเป็นไมโคปรสิต (mycoparasitism) หรือไฮเปอร์ปรสิต (hyperparasitism) เป็นปรากฏการณ์ที่เชื้อราชนิดหนึ่งเป็นปรสิตของเชื้อราอีกชนิดหนึ่ง โดยการเจริญของเส้นใยของเชื้อราชนิดหนึ่งปกคลุมและเจาะทะลุเส้นใยของเชื้อราอีกชนิดหนึ่งด้วยเส้นใยพิเศษ ที่เรียกว่า haustoria และย่อยเส้นใยราชนิดนั้นเป็นอาหาร เชื้อจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นปรสิตซึ่งเข้าไปเจริญอาศัยและทำลายสิ่งมีชีวิตอื่นนั้นพบได้ไม่มากนัก เชื้อราที่เป็นไมโคปรสิตที่พบในดินทั่วไป ได้แก่ *Trichoderma* และ *Gliocladium* (Moore-Landecker, 1996)

4) การชักนำให้เกิดความต้านทานโรค (induced disease resistance)

เป็นกลไกที่น่าสนใจ ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์ เช่น เชื้อราหรือแบคทีเรีย โดยเฉพาะพวกที่เคยเป็นเชื้อโรค เมื่อนำมาทำให้สูญเสียความสามารถในการทำให้เกิดโรคแล้วสามารถจะชักนำ หรือกระตุ้นให้พืชสร้างความต้านทานต่อการทำลายของเชื้อโรคได้ Elad (2000) รายงานว่าเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* และเชื้อรา *T. harzianum* T39 สามารถกระตุ้นให้ถั่วสร้างกรดซาลิไซลิก (salicylic acid) ซึ่งช่วยต้านทานโรคจากเชื้อ *B. cinerea* ได้

เชื้อรา *Trichoderma* spp. นอกจากจะมีกลไกในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชได้แล้ว ยังพบว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. สามารถกระตุ้นให้พืชเจริญเติบโตได้ด้วย มีรายงานว่าการคลุก *T. viride* กับเมล็ดถั่ว chick pea ที่ปริมาณ 200 และ 500 มิลลิกรัมต่อเมล็ดถั่ว 1 กิโลกรัม นอกจากจะสามารถควบคุมการเจริญของโรคพืชได้แล้ว ยังช่วยกระตุ้นให้เมล็ดงอกเป็นต้นกล้าได้เร็วขึ้นด้วย (Tong et al., 2003)

2.2 การควบคุมโรคพืชด้วยเชื้อรา *Trichoderma* spp.

เชื้อรา *Trichoderma* spp. เป็นเชื้อราที่เจริญได้ดีในดิน เศษซากพืช ซากสิ่งมีชีวิต รวมทั้งจุลินทรีย์และอินทรีย์วัตถุตามธรรมชาติ สามารถเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว สร้างสปอร์ได้ในปริมาณสูง ไม่ก่อให้เกิดโรคกับพืชที่มีชีวิตอยู่ ดังนั้นจึงมีความสามารถในการแข่งขันกับเชื้อราสาเหตุโรคพืชในแง่ของการใช้อาหารและสารที่จำเป็นต่อการเจริญของเส้นใย มีผลทำให้เชื้อราสาเหตุโรคพืชลดลงได้ เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(จิระเดช, 2538 ข) นอกจากนี้เส้นใยของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ยังสามารถเจริญไปขนานเส้นใยของเชื้อราโรคพืช เกิดการพันรัดเส้นใยของเชื้อโรครโรคพืช บางสายพันธุ์สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยเส้นใยของเชื้อราโรคพืชได้ เช่น chitinase, cellulose และ β -1-3 glucanase มีผลทำให้เชื้อโรครโรคพืชอ่อนแอและตาย บางสายพันธุ์สามารถสร้างสารปฏิชีวนะออกมายับยั้งหรือทำลายเส้นใยของเชื้อโรครจนเกิดการย่อย(lysis)ได้ ด้วยคุณสมบัตินี้จึงมีการนำเชื้อรา *Trichoderma* มาใช้เพื่อควบคุมเชื้อราสาเหตุโรครพืชหลายชนิด เช่น *Sclerotium* spp, *Pythium* spp. และ *Fusarium* spp. ซึ่งเป็นสาเหตุของโรครเมล็ดเน่า รากเน่า โดยปัจจุบันได้มีการผลิตเชื้อ *Trichoderma harzianum* เป็นผลิตภัณฑ์ใช้อย่างแพร่หลายทั้งในพืชผัก ไม้ประดับ พืชไร่ พืชสวนต่างๆ ดัน และมีการพัฒนาส่งเสริมให้เกษตรกรสามารถผลิตเชื้อสดได้ด้วยตนเอง สามารถลดต้นทุนการผลิตและมีรูปแบบการใช้ได้สะดวกไม่แตกต่างจากสารเคมี(จิระเดช และวรรณวิไล, 2545) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาถึงการใช่วัสดุในการปรับปรุงพันธุ์เชื้อรา *Trichoderma* ให้มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรครพืชให้ดีขึ้น(จิระเดช และคณะ, 2545) โดยการใช้รังสีแกมมาในการปรับปรุงสายพันธุ์ *T. harzianum* CB-Pin-01 เพื่อเป็นแนวทางในการนำสายพันธุ์กลายของเชื้อรา *T. harzianum* CB-Pin-01 มาใช้ในการผลิตเป็นชีวภัณฑ์หรือนำไปสกัดสารเพื่อใช้ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรครพืชอย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

Yang และคณะ (2003) ได้ศึกษาถึงการปรับปรุงสายพันธุ์ *T. harzianum* และ *Chaetomium globosum* ให้สามารถต้านทานสารฆ่าเชื้อรา benzimidazole เนื่องจากเชื้อรา *Trichoderma* ไม่สามารถเจริญได้ในดินที่มีสารฆ่าเชื้อรา ทำให้การนำเชื้อรานี้ไปใช้ประโยชน์ในการควบคุมเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรครกับพืชเศรษฐกิจมีข้อจำกัด ดังนั้นการปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อรา *Trichoderma* จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของเชื้อให้ดีขึ้น โดยการถ่ายทอด carbendazim resistant gene และพบว่า transformant ของ *T. harzianum* และ *C. globosum* สามารถต้านทานสารเคมีที่ระดับความเข้มข้น 150 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรได้ ตามลำดับ ในขณะที่เชื้อราที่ไม่ได้ปรับปรุงพันธุ์สามารถทนสารเคมีได้ที่ระดับความเข้มข้น 0.50 -0.80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเท่านั้น

2.3 การจำแนกสายพันธุ์เชื้อรา *Trichoderma* spp.

โดยทั่วไปแล้ววิธีการจัดจำแนกความหลากหลายทางพันธุกรรมสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การจัดจำแนกตามลักษณะทางกายภาพของเชื้อ การทดสอบทางด้านชีวเคมี และการศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์ในระดับโมเลกุล แต่วิธีที่เป็นที่ยอมรับมากที่สุด คือ การศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์ในระดับโมเลกุล เนื่องจากให้ผลการจัดจำแนกที่ถูกต้องแม่นยำ ซึ่งได้แก่เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR), Random amplified polymorphic DNA (RAPD), Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) และเทคนิคการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) เป็นต้น การจัดจำแนกตามลักษณะทางกายภาพของเชื้อราแต่ละสายพันธุ์ที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ จะมีลักษณะการเจริญของโคโลนีที่แตกต่างกัน ทั้งในด้านรูปร่าง ลักษณะ ความหนาหรือมัน เรียบหรือขรุขระของผิวหน้าของโคโลนี สีของโคโลนี ความหนาแน่นของการสร้างเส้นใยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และการพองฟูหรือยุบลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของโคลนนี้เมื่อมีอายุมากขึ้น รวมทั้งลักษณะของเส้นใย ลักษณะที่แตกต่างกันอาจเกิดจากสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน หรือแตกต่างกันอันเนื่องมาจากสายพันธุ์ได้ ดังนั้นในการศึกษาความหลากหลายจึงนิยมศึกษาด้วยเทคนิคทางพันธุศาสตร์ในระดับโมเลกุล

เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction) หรือที่เรียกอีกอย่างหนึ่งว่าเทคนิค PCR เป็นเทคนิคสำหรับเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมดีเอ็นเอในหลอดทดลองเป็นล้านๆเท่าภายในเวลาไม่กี่ชั่วโมง(พิสิฏฐ์, 2546) โดยอาศัยหลักการการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสิ่งมีชีวิตด้วยเอนไซม์ DNA polymerase (DNA Replication) ซึ่งเป็นการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอสายใหม่จากดีเอ็นเอต้นแบบในหลอดทดลองโดยใช้ไพรเมอร์ (primer) หรือดีเอ็นเอสายสั้นๆ (สิทธิรักษ์, 2544) อย่างน้อย 1 คู่ ซึ่งไพรเมอร์เป็นปัจจัยสำคัญสำหรับปฏิกิริยา PCR สำหรับปฏิกิริยา PCR มี 3 ขั้นตอนในหนึ่งรอบของกระบวนการ ดังนี้

- 1) Denaturing เป็นการทำให้เกลียวคู่ของดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบแยกจากสภาพที่เป็นเส้นคู่ให้เป็นเส้นเดี่ยวเพื่อใช้เป็นเทมเพลต (template) โดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 92-95 องศาเซลเซียส
- 2) Annealing เป็นการปล่อยให้เย็นลง จะทำให้ไพรเมอร์ ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายสั้นๆ ประมาณ 20-25 เบส ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบจับคู่กัน ตรงบริเวณที่เลือก ซึ่งนิยมใช้อุณหภูมิในช่วง 50-60 องศาเซลเซียส
- 3) Extension เป็นขั้นตอนที่เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ สังเคราะห์ต่อจากส่วนปลาย 5' ของไพรเมอร์ดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบ โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase

เมื่อเสร็จหนึ่งรอบจะทำให้ดีเอ็นเอบริเวณที่เราสนใจเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า ดังนั้นหากต้องการดีเอ็นเอเพิ่มขึ้น ก็ปล่อยให้กระบวนการนั้นเกิดขึ้นอีกรอบแล้วรอบเล่า ซึ่งหากทำครบ 30 รอบ จะได้ดีเอ็นเอเพิ่มขึ้น 2^{30} เท่า นั่นคือมากกว่าพันล้านเท่า

เทคนิค PCR สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างเฉพาะเจาะจงภายในระยะเวลาอันสั้นนำไปใช้ประโยชน์ได้ทั้งงานวิจัยทางชีวโมเลกุลและพันธุวิศวกรรม เช่น การเพิ่มปริมาณยีน (gene cloning) การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน (gene sequencing) และการสร้างดีเอ็นเอติดตาม (DNA probe) เป็นต้น ในการประยุกต์ใช้เทคนิค PCR เพื่อทำการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตนิยมศึกษาบริเวณ Internal transcribed spacer (ITS) เนื่องจากบริเวณนี้มีความผันแปรทางพันธุกรรมสูงกว่าบริเวณอื่นๆใน rDNA (Martin and Ruggiewiez, 2005) ทำให้สามารถใช้จำแนกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์และภายในสายพันธุ์เดียวกันได้ โดยบริเวณ ITS นี้มีไพรเมอร์หลากหลายชนิดที่สามารถเข้าจับกับดีเอ็นเอตำแหน่งต่างๆ และให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกัน แต่ไพรเมอร์ที่นิยมใช้คือ ไพรเมอร์ ITS 1 และ ITS 4 ซึ่งจะให้ชิ้นดีเอ็นเอที่ประกอบด้วย ITS 1, 5.8S และ ITS 2

เทคนิค RAPD (Random amplified polymorphic DNA) เป็นการเพิ่มปริมาณส่วนของดีเอ็นเอโดยไม่ทราบลำดับเบสที่บริเวณใด ใช้ไพรเมอร์เพียงชนิดเดียว ขนาดสั้นกว่าปกติ ประมาณ 8 - 10 เบส เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นิวคลีโอไทด์ (สุรินทร์, 2545) เทคนิค RAPD ทำได้โดยสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบ นำมาทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์เพียงชนิดเดียว หลังจากเสร็จสิ้นปฏิกิริยาแล้ว นำผลที่ได้มาแยกด้วยอิเล็กโทรโฟรีซิสและย้อมด้วย ethidium bromide จะปรากฏแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันหรือแตกต่างกันก็ได้ ใช้จำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิตได้เหมือน RFLP แต่ตรวจสอบผลได้ง่ายและรวดเร็วกว่า

เทคนิค RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) เป็นเทคนิคที่ใช้หาความแตกต่างหรือความหลากหลายของขนาดดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) โดยอาศัยหลักการที่ข้อมูลทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตมีความสามารถที่จำลองโมเลกุลได้อย่างถูกต้องแม่นยำ เพื่อถ่ายทอดไปสู่เซลล์ลูกและคงลักษณะที่เหมือนเดิมตลอดไป แต่บางครั้งก็มีการเปลี่ยนแปลงของเบสเนื่องจากสิ่งแวดล้อมหรือข้อผิดพลาดของเซลล์เอง โดยมีทั้งการเปลี่ยนแปลงของเบสแต่ละตัวและการเปลี่ยนแปลงระดับโครโมโซม การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวมีผลทำให้เกิดความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด และสามารถตรวจสอบความแตกต่างนั้นด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะบางชนิด แล้วนำชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ถูกตัดมาเปรียบเทียบกัน (สุรินทร์, 2545) โดยเมื่อใช้เอนไซม์ชนิดหนึ่งตัดดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตเดียวกันจะได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดและจำนวนคงที่เสมอ แต่มาจากแหล่งต่างกันและหรือมีลำดับเบสที่เปลี่ยนแปลงไปจะได้ขนาดและจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่แตกต่างจากเดิม เรียกว่าเกิดโพลิมอร์ฟิซึม (polymorphism) ขึ้น

ตัวอย่างการจำแนกสายพันธุ์โดยการศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์ในระดับโมเลกุล เช่นจากการศึกษาของ Castle และคณะ (1997) ที่จัดจำแนกเชื้อรา *Trichoderma* sp. สายพันธุ์ต่างๆ ที่พบในฟาร์มเห็ดในอเมริกาเหนือ โดยอาศัยความรู้ทางด้านสัตวศาสตร์และการตรวจสอบในระดับโมเลกุลโดยวิธี RAPD และ RFLP พบว่าฟาร์มแห่งนี้มีเชื้อรา *Trichoderma* sp. หลากหลายสายพันธุ์ โดยในแต่ละสายพันธุ์จะมีลักษณะทางสัตวศาสตร์ที่แตกต่างกันไป ส่วนการตรวจสอบในระดับโมเลกุลนั้นจากการนำเทคนิค RAPD มาใช้ในการศึกษา พบว่าเชื้อรา *T. citrinoviride* และ *T. koningii* ให้ผลของ RAPD ที่เหมือนกัน แต่เมื่อทำการศึกษาเชื้อรา 2 ชนิดนี้โดยใช้เทคนิค RFLP ที่ตำแหน่ง internal transcribed spacer 1 และ 4 (ITS 1 และ ITS 4) พบว่ามีจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะต่างกัน ดังนั้นจึงสามารถจำแนกเชื้อรา 2 สายพันธุ์นี้ออกจากกันได้

Kubicek และคณะ (2002) ได้จำแนกเชื้อรา *Trichoderma* sp. จากเอเชียตะวันออกเฉียงใต้โดยอาศัยการวิเคราะห์ทางด้านสัตวศาสตร์ ชีวเคมี และการวิเคราะห์ที่ตำแหน่ง ITS 1 และ ITS 2 พบว่าสามารถแยกเชื้อรา *Trichoderma* sp. ได้หลายชนิด และแต่ละชนิดก็ยังสามารถแยกออกได้อีกหลายสายพันธุ์ (strain) เช่น เชื้อรา *T. harzianum* สามารถแยกออกได้ 37 สายพันธุ์ เป็นต้น

Zhang และคณะ (2005) ศึกษาความหลากหลายของเชื้อรา *Trichoderma* sp. ใน 4 พื้นที่ของประเทศจีน ได้แก่พื้นที่ในมณฑลเฮอเป่ย์ (Hebei), ฉีเจียง (Zhejieng), ทิเบต (Tibet) และยูนนาน (Yunnan) พบเชื้อรา *Trichoderma* sp. หลายสายพันธุ์ เช่น *T. asperellum*, *T. virens*, *T. harzianum*, *T. sinensis*, *T. citrinoviride* และ *T. longibrachiatum* นอกจากนี้ยังพบเชื้อที่สันนิษฐานว่าเป็นเชื้อรา *Trichoderma* ชนิดใหม่อีก 2 ชนิด คือ *Trichoderma* sp. C1 และ *Trichoderma* sp. C2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
9
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Wuczkowski และคณะ (2002) ศึกษาความหลากหลายของเชื้อรา *Trichoderma* sp. ในแถบยุโรปกลาง โดยอาศัยการจัดจำแนกทางสัณฐานวิทยาและการวิเคราะห์ระดับโมเลกุลบริเวณ ITS 1 และ ITS 2 พบเชื้อราสายพันธุ์ต่างๆ คือ *T. harzianum*, *T. rossocum*, *T. hamatum* และ *T. atroviride* และยังพบเชื้อรา *Trichoderma* sp. อีก 4 สายพันธุ์ที่ไม่สามารถจำแนกสายพันธุ์ได้ จึงทำการจัดจำแนกเชื้อราทั้ง 4 สายพันธุ์นี้ให้อยู่ในกลุ่มใหม่

นอกจากการจำแนกสายพันธุ์ *Trichoderma* sp. แล้วยังสามารถศึกษาถึงการใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่น จากการศึกษาของ Gallo และคณะ (2004) ที่ตรวจหาเชื้อรา *Trichoderma* sp. ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ Trichodiene ซึ่งเป็นสารสำคัญในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี โดยทำการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน Trichodiene synthase จากการศึกษาพบว่าเชื้อรา 2 ชนิดที่ไม่มียีนชนิดนี้อยู่ในโมเลกุล ได้แก่เชื้อรา *T. citrinoviride* และ *T. hamatum* ซึ่งทำนายได้ว่าเชื้อราสองสายพันธุ์นี้มีประสิทธิภาพต่ำในการเป็นสารควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี

2.4 เทคนิค Expressed Sequence Tags

Expressed Sequence Tags (ESTs) หมายถึงลำดับดีเอ็นเอสั้นๆที่เกิดจากยีนที่มีการแสดงออก (อรินทิพย์, 2546) มีขนาดประมาณ 200-500 คู่เบส ที่มาจากการหาลำดับ cDNA ที่สุ่มมาจาก cDNA library โดยใช้ไพรเมอร์ จากพาหะ ในการหาลำดับ cDNA ทำให้ได้ข้อมูลทางปลาย 5' หรือปลาย 3' ของ cDNA เป็นส่วนใหญ่ ซึ่งเรียกว่า 5'-EST และ 3'-EST ตามลำดับ EST นี้สามารถนำมาใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) ในการทำแผนที่ยีน (gene map) โดยการนำมาออกแบบไพรเมอร์ (primer) เพื่อใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยวิธี PCR หรือใช้เป็นไพรเมอร์ในการทำไฮบริไดเซชัน (DNA hybridization) เทคนิค EST เริ่มขึ้นเป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1991 โดยอาศัยหลักการทำ cDNA library จาก mRNA และนำมาศึกษาลำดับเบสเปรียบเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูล EST database (dbEST) ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) เทคนิคนี้เหมาะสำหรับการศึกษายีนใหม่ๆในสิ่งมีชีวิต เพื่อเข้าใจกลไกการแสดงออกของยีนต่างๆของเชื้อที่มีฤทธิ์หรือมีความสามารถสูงในการทำลายหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้ออื่นๆ

เทคนิค EST ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน (สุรินทร์, 2539; ชินและประสิทธิ์, 2544; บุญช่วย, 2544; Liu and Yang, 2004a) ดังต่อไปนี้

1) cDNA library

เป็นการสังเคราะห์ดีเอ็นเอคู่สม (complementary DNA หรือ cDNA) จาก mRNA เป็นกระบวนการที่ต้องการความละเอียดรอบคอบ และต้องระมัดระวังมาก เนื่องจาก mRNA มีช่วงอายุสั้น และจะถูกย่อยสลายได้ ถ้ามีการปนเปื้อนของเอนไซม์ RNase RNA ทั้งหมดที่แยกได้จากเนื้อเยื่อหรือเซลล์ของสิ่งมีชีวิตกว่า 90 เปอร์เซ็นต์เป็น rRNA และ tRNA ผลผลิตของ mRNA จะมีอยู่น้อย ดังนั้นเมื่อนำมาสังเคราะห์ cDNA ผลผลิตของ cDNA จะยิ่งต่ำลงไป จึงมีการนำเอาเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอมาใช้ในการสร้าง cDNA library โดย cDNA ถูกสังเคราะห์โดยใช้ cDNA synthesis kit และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านก10
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำมาเชื่อมกับเวกเตอร์ (vector) โดยใช้ plasmid แต่เนื่องจากยีนทุกยีนในสิ่งมีชีวิตไม่ได้มีการแสดงออกในทุกๆเซลล์ ดังนั้น cDNA library จึงเป็นแหล่งรวมของยีนที่มีการแสดงออกในส่วนนั้นเท่านั้น

2) การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide sequencing)

การวิเคราะห์ลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอเป็นสิ่งสำคัญอย่างหนึ่งสำหรับงานอณูชีววิทยา โดยเฉพาะกับดีเอ็นเอสายใหม่ที่เพิ่งทราบลำดับเบส การวิเคราะห์ลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอจะทำให้ทราบถึงบริเวณที่มีรหัสสำหรับการสร้างโปรตีน(coding region) บริเวณที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของยีน โดยการเตรียมเทมเพลต (DNA Template) สำหรับปฏิกิริยาการจัดลำดับโดยเทคนิค alkaline lysis ประกอบกับ thermal cycle และเครื่องวิเคราะห์ (sequencer) เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งการวิเคราะห์ลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอ โดยเปรียบเทียบลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอใหม่กับลำดับเบสของสายดีเอ็นเออื่น จะทำให้ทราบถึงบริเวณที่เป็น homologous sequence ซึ่งเป็น sequence ที่มีความคล้ายคลึงกัน

3) การจัดการข้อมูลชีวสารสนเทศ(bioinformatics)

เป็นการใช้โปรแกรมซอฟต์แวร์ เช่น โปรแกรม Blast (Basic Local Alignment Search Tool) ในการเปรียบเทียบข้อมูลการเรียงตัวของสารหนึ่งกับข้อมูลการเรียงตัวของสารอื่นๆที่มีลักษณะคล้ายคลึงกัน

การใช้ประโยชน์จาก EST เช่น การตรวจหายีนใหม่ๆ (novel gene identification) การหาค่าตำแหน่งโคลน (positional cloning) รวมถึงการทำ genetic และ physical mapping, molecular marker และการพัฒนา micro-array เป็นต้น ซึ่งเทคนิค EST เป็นวิธีที่ง่าย มีประสิทธิภาพ ราคาไม่แพง แต่ค่อนข้างใช้เวลาในการ identify ยีนตัวใหม่ๆ ซึ่งถ้ามีข้อมูล EST ในฐานข้อมูลเป็นจำนวนมากขึ้น ประกอบกับมีโปรแกรมซอฟต์แวร์ที่แม่นยำมากขึ้น จะช่วยให้การค้นพบยีนตัวใหม่ๆเป็นไปได้ง่ายขึ้น เป็นการเชื่อมช่องว่างระหว่าง structural genome และ functional genome

Liu และYang (2004b) ได้ทำการศึกษายีนต่างๆของเชื้อรา *T. hazianum* ซึ่งมีการแสดงออกทำหน้าที่ในการควบคุมเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคพืช โดยอาศัยวิธี Expressed Sequence Tag (EST) ซึ่งทำให้ทราบรายละเอียดของยีนต่างๆมากขึ้น และมีการค้นพบลำดับของยีนใหม่จำนวน 673 ชนิด โดยการค้นพบเหล่านี้จะทำให้ทราบรายละเอียดของการถอดรหัสของยีนต่างๆไปเป็นโปรตีนได้ดียิ่งขึ้น

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อรา

- จานเพาะเชื้อ
- หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- ตู้ควบคุมอุณหภูมิ
- หม้อน้ำความดันไอหน้า
- อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA, Martin's medium (peptone dextrose rose-bengal agar)
- เข็มเขี่ยเชื้อ
- ตะเกียงแอลกอฮอล์
- กล้องจุลทรรศน์

3.1.2 การสกัดดีเอ็นเอ (โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูปของ Qiagen)

- หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
- เครื่องปั่นเหวี่ยง
- สารละลายบัฟเฟอร์ AP1
- สารละลายบัฟเฟอร์ AP2
- สารละลายบัฟเฟอร์ AP3/E
- สารละลายบัฟเฟอร์ AW
- สารละลายบัฟเฟอร์ AE
- 25 mM EDTA
- สารละลาย RNase
- น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว
- ไนโตรเจนเหลว
- โกร่ง

3.1.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

- น้ำกลั่นที่ปราศจากไอออน
- 10X PCR Buffer
- 50 mM MgCl₂
- 20 pM/μl ITS1 (5' TCGGTAGGTGAACCTGCGG 3')

- 20 pM/μl ITS 4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3')
- 1.25 mM dNTPs
- 5 U/μl *Tag* DNA polymerase
- หลอดทดลองขนาด 0.2 และ 1.5 มิลลิลิตร
- เครื่อง DNA thermal cycle

3.1.4 การทำเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

- สารละลาย TBE Buffer
- เครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส
- ดีเอ็นเอมาตรฐาน (Marker)
- สีย้อม
- Ethidium bromide
- Agarose gel

3.1.5 การวัดปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

- สารละลาย TE Buffer
- cuvette
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง

3.1.6 การทำความเข้าใจหลายโดยเทคนิค PCR-RFLP

- น้ำกลั่นที่ปราศจากไอออน
- สารละลาย 10X RE Buffer
- สารละลาย Bovine Serum Albumin
- ดีเอ็นเอเป้าหมายที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR
- เอนไซม์ตัดจำเพาะ (*Hind*III, *Hae*III, *Sma*I และ *Bam*HI)

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 เชื้อรา *Trichoderma* sp.

ใช้เชื้อรา *Trichoderma* sp. ที่คัดเลือกได้จากแหล่งดินธรรมชาติ เปรียบเทียบกับเชื้อรา *Trichoderma* สายพันธุ์ TISTR 3167, TISTR 3329 และ TISTR 3553 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย กรุงเทพฯ และเชื้อทางการค้า MK

3.2.2 การแยกเชื้อรา *Trichoderma* spp. จากดินธรรมชาติ

เก็บตัวอย่างดินจากดินธรรมชาติมาแยกเชื้อรา โดยดัดแปลงวิธีมาจากวิธีของ Dhingra and Sinclair (1987) โดยชั่งดินที่เก็บจากธรรมชาติ 25 กรัม ใส่ลงใน Erlenmeyer flask ที่มีน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 250 มิลลิลิตร จากนั้นเขย่านาน 30 นาที ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที แล้วทำการเจือจาง 10^{-3} - 10^{-4} เท่า นำสารแขวนลอยดินที่เจือจางได้จำนวน 0.1 มิลลิลิตร ไปหยดลงบน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ซ้ำ การค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหาร Martin's medium (peptone dextrose rose-bengal agar) (Johnson and Curl, 1972) แล้วเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหาร หลังจากนั้นบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3-7 วัน เมื่อเชื้อราเจริญเป็นโคโลนี คัดเลือกโคโลนีของเชื้อราที่เจริญรวดเร็ว ซึ่งมีลักษณะของโคโลนีเป็นสีขาว เขียวอมเหลือง ถึงเขียวเข้ม และมีบริเวณที่สร้างสปอร์ (conidial area) เป็นวงแหวน (ring-like zone) นำมาตรวจการสร้างสปอร์ conidia หรือ phialospore บน phialide ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ หลังจากนั้นจึงย้ายเชื้อราที่มีลักษณะดังกล่าวลงบนอาหาร PDA ในหลอดอาหารเอียงไว้ศึกษาต่อไป

3.2.3 การศึกษาสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่แยกได้จากดินธรรมชาติ

เตรียม mycelial disc ขนาด 8 มิลลิเมตร ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. นำไปเลี้ยงบนอาหาร PDA และ 2% malt extract agar (ภาคผนวก ก.) (Rifai, 1969) บ่มเชื้อในที่มืดที่อุณหภูมิห้องนาน 2 วัน ซึ่งเป็นระยะที่เชื้อเริ่มมีการสร้าง phialide และเป็นระยะที่สามารถตรวจการเจริญตัวของ conidiophore และ phialide ได้ง่าย โดยตรวจสอบจากเชื้อที่เจริญบนอาหาร Malt Extract Agar ซึ่งมีการสร้าง conidiophore และ phialide และเส้นใยที่หนาแน่นกว่าบนอาหาร 2% Malt Extract Agar นำมาตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยวิธีการย้อมสี lactophenol-acid fuchsin วัดขนาดด้วย ocular micrometer และบันทึกลักษณะรูปร่างและการเจริญตัว จากนั้นบ่มเชื้อต่อในที่ที่มีแสงสว่างส่องถึงหรือภายใต้หลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ เพื่อให้เชื้อสร้าง phialospore จนเชื้ออายุ 2-4 สัปดาห์ ซึ่งเป็นระยะที่ chlamydospore และ phialospore ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. มีความแก่ เหมาะสมที่ใช้ศึกษาขนาดและรูปร่าง จึงนำเชื้อที่เจริญบนอาหาร 2% Malt Extract Agar ซึ่งมีการกระจายตัวของ chlamydospore และ phialospore ไม่หนาแน่นเกินไปมาตรวจลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยวิธีการย้อมสี lactophenol-acid fuchsin และ lactophenol (Dhingra and Sinclair, 1987) วัดขนาดบันทึกลักษณะรูปร่าง สี และตำแหน่งบนเส้นใย ตรวจการสร้างเม็ดสีจากเชื้อที่เจริญบนอาหาร PDA จากนั้นศึกษาการเจริญบนอาหาร Malt Extract Agar ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส โดยวัดขนาดโคโลนี หลังเลี้ยงเชื่อนาน 4 วัน นำผลที่ได้มาประกอบการพิจารณาและบ่งชี้ว่าเป็นเชื้อ *Trichoderma* spp. เปรียบเทียบกับเอกสารของ Rifai (1969) และของ Bissett (1984, 1991a, 1991b, 1991c และ 1992)

3.2.4 การเตรียมตัวอย่างก่อนการสกัดดีเอ็นเอ

เก็บเกี่ยวเส้นใยเชื้อรา *Trichoderma* sp. โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อที่เผาไฟจนร้อนแดง เขี่ยเส้นใยเชื้อราลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำละลาย EDTA ความเข้มข้น 25 มิลลิ-โมลาร์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เพื่อล้างเส้นใย นำไปเข้าเครื่อง vortex และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ตูตสารละลายส่วนใสทิ้ง หลังจากนั้นเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปเข้าเครื่อง vortex และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาทีอีกครั้ง ตูตสารละลายส่วนใสทิ้ง ถ่ายเส้นใยเชื้อราที่ได้ลงในโถง จากนั้นทำการเติมไนโตรเจนเหลวประมาณ 50 มิลลิลิตร พร้อมบดให้เส้นใยเชื้อรากลายเป็นผง

3.2.5 การสกัดดีเอ็นเอ

ทำการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป DNeasy Plant Mini Kit ของ Qiagen โดยนำผงเส้นใยเชื้อราใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ประมาณ 100 มิลลิกรัม เติมสารละลายบัฟเฟอร์ AP1 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร และสารละลาย RNase ปริมาตร 4 ไมโครลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยการเข้าเครื่อง vortex หลังจากนั้นนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที โดยทำการกลับหลอดไปมาเบาๆทุก 2-3 นาทีเพื่อให้สารผสมเป็นเนื้อเดียวกัน เติมสารละลายบัฟเฟอร์ AP2 ปริมาตร 130 ไมโครลิตร และนำไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายที่ได้ลงในคอลัมน์สีม่วง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที ดูดสารละลายส่วนในสีที่ใต้ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร และเติมสารละลายบัฟเฟอร์ AP3/E ปริมาตร 675 ไมโครลิตร ดูดสารละลายที่ผสมแล้วปริมาตร 650 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์สีขาวนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที (ทำซ้ำอีกครั้ง) จากนั้นย้ายคอลัมน์สีขาว ใส่ลงในหลอดขนาด 2 มิลลิลิตรที่มาพร้อมกับชุดสกัดดีเอ็นเอ เติมสารละลายบัฟเฟอร์ AW ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที แล้วจึงเติมสารละลายบัฟเฟอร์ AW ปริมาตร 500 ไมโครลิตรลงไปอีกครั้ง และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที ย้ายคอลัมน์ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายบัฟเฟอร์ AE ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ปั่นที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที นำคอลัมน์ออกจากหลอดทดลอง เก็บดีเอ็นเอที่สกัดได้ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.2.6 การตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง

นำสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทำการเจือจาง 100 เท่า โดยดูดสารละลายบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 495 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายดีเอ็นเอ ปริมาตร 5 ไมโครลิตร นำไปเข้าเครื่อง vortex เพื่อให้เป็นเนื้อเดียวกันวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสงเท่ากับ 260 และ 280 นาโนเมตร เพื่อคำนวณหาความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้ และหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

ค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอหาได้จาก

$$\text{ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)} = A \times 50 \text{ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)} \times B$$

โดย A = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตร
B = ค่าการเจือจาง (เท่า)

ความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ ดูได้จากอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 /280

ค่าที่ได้ควรอยู่ระหว่าง 1.65-2.00

3.2.7 การตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอโดยการทำเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

เตรียมเจลโดยชั่งอะกาโรสให้มีความเข้มข้นของเจลตามที่ต้องการ เช่น 1, 1.5 หรือ 2% โดยละลายในสารละลาย 1X TBE Buffer ในฟลาสก์ เขย่าให้เข้ากัน ปิดฝาอย่างหลวมๆ นำไปให้ความร้อนโดยใช้ไมโครเวฟประมาณ 2 นาที เพื่อให้อะกาโรสละลายเป็นสารละลายใส ปล่อยให้เย็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ใด ๆ การค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เย็น ที่อุณหภูมิประมาณ 45-50 องศาเซลเซียส แล้วเทลงในภาตใส่เจลที่เตรียมไว้ตามขนาดที่ต้องการ เจลควรหนาประมาณ 0.5-0.8 เซนติเมตร เสียบหัวลงไป ทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัว ประมาณ 15 นาที สังเกต สีของเจลจะขุ่น จากนั้นนำหัวออก นำวุ้นไปใส่ในอ่างที่ใช้สำหรับทำอิเล็กโทรโฟรีซิส เทสสารละลาย 1X TBE Buffer ลงไปให้ท่วมเจล ประมาณ 2-3 มิลลิเมตร

เตรียมดีเอ็นเอที่ต้องการลงในหลุมเจล โดยทำการหยดน้ำกลั่นและสี ลงบนแผ่นพาราฟิล์ม จุดดีเอ็นเอมาผสมกับน้ำกลั่นและสีที่อยู่บนพาราฟิล์ม ผสมให้เข้ากันแล้วหยอดลงในหลุมตามช่องที่กำหนดให้ครบ โดยใช้ความต่างศักย์ 50 โวลต์ ประมาณ 40-50 นาที นำเจลที่ได้ไปย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยสารละลาย Ethidium bromide และนำไปส่องดูด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต ตรวจสอบว่า สารละลายที่ได้มีดีเอ็นเอตามที่ต้องการหรือไม่ โดยเทียบจากแถบดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบขนาดของ ดีเอ็นเอ

3.2.8 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส บริเวณ ITS โดยใช้ไพรเมอร์ ITS 1 ซึ่งมีลำดับเบสดังนี้ คือ 5' TCGGTAGGTGAACCTGCGG 3' และไพรเมอร์ ITS 4 ซึ่งมีลำดับเบสดังนี้ คือ 5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3' (White และคณะ, 1990) มีขั้นตอนดังนี้

4) เติมสารเคมีต่างๆ ที่เป็นส่วนประกอบในการทำพีซีอาร์ ดังตารางที่ 3.1 ลงในหลอดทดลองขนาด 0.2 มิลลิลิตร

5) นำส่วนผสมพีซีอาร์ที่ได้เข้าเครื่อง DNA thermal cycle เพื่อการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ จำนวนรอบ 35 รอบโดยใช้สภาวะดังนี้

Initial Denaturation	อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส	นาน 5 นาที
Denaturation	อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	นาน 1.5 นาที
Annealing	อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส	นาน 2 นาที
Extension	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	นาน 3 นาที
Final Extension	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	นาน 5 นาที

6) นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มาตรวจสอบโดยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ใช้เจลที่มีความเข้มข้น 1.5 % และตรวจผลภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต

3.2.9 การตัดผลผลิตพีซีอาร์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (PCR-RFLP)

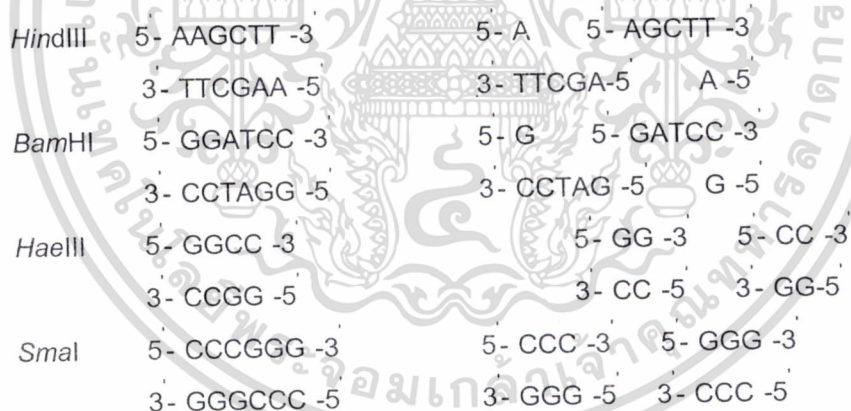
นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ซึ่งทราบปริมาณความเข้มข้น มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยเติมผลผลิตพีซีอาร์ 5 ไมโครลิตร สารละลาย 10X RE Buffer ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เติม Bovine Serum Albumin ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร เอนไซม์ตัดจำเพาะปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นที่ปราศจากไอออนปริมาตร 12.3 ไมโครลิตร เพื่อให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 20 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 0.2 มิลลิลิตร ผสมให้สารละลายผสมเป็นเนื้อเดียวกัน นำส่วนผสมทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิตามที่กำหนดของเอนไซม์แต่ละชนิด เป็นเวลาประมาณ 4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา นำหลอดทดลองไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาทีเพื่อทำการหยุดปฏิกิริยาการ ตัดด้วย

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ตารางที่ 3.1 แสดงสารเคมีที่เป็นส่วนประกอบในการทำพีซีอาร์

สารเคมี	ปริมาณ
DNA template (100 ng)	1 μ l
ITS 1 primer (20 pmol/ μ l)	1 μ l
ITS 4 primer (20 pmol/ μ l)	1 μ l
1.25 mM dNTP	4 μ l
10X PCR buffer	2.5 μ l
MgCl ₂ (50mM)	1.5 μ l
Tag DNA polymerase (5 U/ μ l)	0.5 μ l
DDW	13.5 μ l
Total	25 μ l

เอนไซม์ตัดจำเพาะ ตรวจสอบผลที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะโดยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่นำมาใช้ในการศึกษาคือ *Hind*III, *Hae*III, *Sma*I และ *Bam*HI โดยมีบริเวณจดจำและจุดตัด ดังนี้



3.2.10 การวิเคราะห์หายีนที่ด้านสาร benzimidazole โดยเทคนิค Expressed Sequence Tags (ESTs)

นำเชื้อรา *Trichoderma harzianum* มาเพาะเลี้ยงบน PDA เป็นเวลา 36 ชั่วโมง จากนั้นทำการแยก RNA ทั้งหมดออกจากเส้นใย นำมาวิเคราะห์หา EST sequence (Yang et al., 2005) ซึ่งการศึกษาโดยใช้เทคนิคนี้เป็นส่วนที่ศึกษาโดย Prof. Yang Qian จาก Department of Life Science and Bioengineering, Faculty of Science, Harbin Institute of Technology ประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1. การแยกเชื้อรา *Trichoderma* spp. จากดินธรรมชาติ

จากการแยกเชื้อรา *Trichoderma* spp. จากดินธรรมชาติ 6 แหล่ง รวมจำนวน 20 ตัวอย่าง สามารถแยกเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่นำมาใช้ในการทดลองนี้ได้ 11 ไอโซเลท (ตารางที่ 4.1) โดยเชื้อราที่แยกได้มีลักษณะการเจริญบนอาหาร Martin's medium ได้รวดเร็วกว่าเชื้อราชนิดอื่นๆ ส่วนใหญ่โคโลนีมีสีเขียวเข้ม บางไอโซเลท โคโลนีมีสีเขียวปนเหลืองและมีวงแหวนของบริเวณสร้างสปอร์มากกว่า 1 วงซ้อนๆกัน

ตารางที่ 4.1 แหล่งที่มาของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลทต่างๆที่แยกได้จากดินธรรมชาติ

ลำดับ	แยกได้จาก	แหล่งที่มา	รหัสของไอโซเลท
1.	รากต้นมันสำปะหลัง	ไร่มันสำปะหลังพื้นที่ระยะของ 90 อ.บ้านบัว จ.ชลบุรี	CHA-4
2.	ดินปลูก	ไร่มันสำปะหลังพื้นที่ระยะของ 90 อ.บ้านบัว จ.ชลบุรี	CHA
3.	รากต้นมันสำปะหลัง	ไร่มันสำปะหลังพื้นที่ระยะของ 90 อ.บ้านบัว จ.ชลบุรี	CHA-6
4.	ดินปลูก	แปลงปลูกข้าวโพดทดลอง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง	KMC 5
5.	ดินปลูก	แปลงปลูกสับปะรด อ.เขาสก จ.สุราษฎร์ธานี	KSR
6.	ดินปลูก	ไร่บัวสวรรค์ อ.ดอนเจดีย์ จ.สุพรรณบุรี	SCP 1
7.	ดินปลูก	ไร่บัวสวรรค์ อ.ดอนเจดีย์ จ.สุพรรณบุรี	SCP 2
8.	ดินปลูก	ไร่บัวสวรรค์ อ.ดอนเจดีย์ จ.สุพรรณบุรี	SCP 3
9.	ดินปลูก	ไร่บัวสวรรค์ อ.ดอนเจดีย์ จ.สุพรรณบุรี	SCP 4
10.	ดินปลูก	แปลงดินเกษตร สวนเงาะ อ.เขาสก จ. สุราษฎร์ธานี	SRS 1
11.	ดินปลูก	แปลงสับปะรด อ.เขาสก จ. สุราษฎร์ธานี	SRS 4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ใด ๆ การค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การศึกษาสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่แยกได้จากดินธรรมชาติ

จากการนำเชื้อรา *Trichoderma* spp. จำนวน 8 ไอโซเลทที่คัดเลือกได้จากดินธรรมชาติทั้งหมด 11 ตัวอย่างมาศึกษาสัณฐานวิทยา โดยศึกษาจากลักษณะของโคโลนี, การเจริญ, conidiophore, phialides, chlamydospore และ phialospore ได้ผลดังนี้

4.3.1 ไอโซเลท CHA 4 (รูปที่ 4.1) ลักษณะสำคัญของไอโซเลทนี้คือ มีการเจริญอย่างรวดเร็วในช่วงแรกของการเจริญเส้นใยจะมีสีขาวปกคลุมแผ่นทั่วผิวหน้าอาหาร โคโลนีมีสีเขียวเข้ม โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตรหลังจากบ่มเป็นเวลา 4 วันบนอาหาร malt extract agar conidiophore มีการแตกกิ่งก้าน สร้าง conidia บน phialide ที่ปลายสุดของ conidiophore มักจะมี phialide อันเดียว phialospore มีสีเขียวเข้มลักษณะเป็นวงกลม มีขนาดประมาณ 45.85 ไมโครเมตร chlamydospore มีผนังหนา ลักษณะรูปไข่ มีขนาดประมาณ 77.37 ไมโครเมตร

4.3.2 ไอโซเลท KMC 5 (รูปที่ 4.2) ลักษณะสำคัญของไอโซเลทนี้คือ มีการเจริญและสร้างสปอร์อย่างรวดเร็วโดยในการเจริญช่วงแรกเส้นใยจะมีสีขาว หลังจากนั้นจะมีการสร้างสปอร์อย่างรวดเร็ว เส้นใยจะแผ่ปกคลุมอย่างหนาแน่นทั่วผิวหน้าอาหาร โคโลนีมีสีเขียวเข้ม โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 9 เซนติเมตร หลังจากบ่มเป็นเวลา 4 วันบนอาหาร malt extract agar conidiophore มีการแตกกิ่งก้าน มีการสร้าง conidia บน phialide เรียก conidia นั้นว่า phialospore phialide มีการแตกตัวเป็นช่อ มีจำนวน 1-3 อัน แต่ phialide ที่ปลายสุดของ conidiophore มักจะมี phialide อันเดียว phialospore มีลักษณะกลม มีขนาดประมาณ 30.72 ไมโครเมตร chlamydospore มีผนังหนา ลักษณะกลม มีขนาดประมาณ 92.30 ไมโครเมตร

4.3.3 ไอโซเลท KSR (รูปที่ 4.3) ลักษณะสำคัญของไอโซเลทนี้คือ มีการเจริญและแผ่ปกคลุมของเส้นใยอย่างรวดเร็ว โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8-9 เซนติเมตร หลังจากบ่มเป็น 4 วันบนอาหาร malt extract agar conidiophore มีการแตกกิ่งก้านน้อย มีการสร้าง conidia บน phialide โดย conidia จะมีการเปลี่ยนแปลงกลายเป็น chlamydospore อย่างรวดเร็ว phialospore มีลักษณะกลม มีขนาดประมาณ 27.82 ไมโครเมตร chlamydospore มีผนังหนา ลักษณะกลมมีขนาดประมาณ 95.99 ไมโครเมตร

4.3.4 ไอโซเลท SCP 1 (รูปที่ 4.4) ลักษณะสำคัญของไอโซเลทนี้คือ โคโลนีมีสีขาวและเมื่อสร้าง phialospore จะมีเขียวปนขาว และเปลี่ยนเป็นสีเขียวในที่สุด มีการเจริญอย่างรวดเร็ว มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร หลังจากบ่มเป็นเวลา 4 วันบนอาหาร malt extract agar conidiophore มีลักษณะพอมยาว มีการแตกกิ่งก้านด้านข้างเล็กน้อย มีจำนวน phialide 1-3 ช่อ จะมี phialospore 2-3 สปอร์อยู่ที่ปลายของ phialide phialospore มีลักษณะกลม มีขนาดประมาณ 42.65 ไมโครเมตร chlamydospore มีขนาดใหญ่และผนังหนา ลักษณะรูปไข่ มีขนาดประมาณ 137.38 ไมโครเมตร

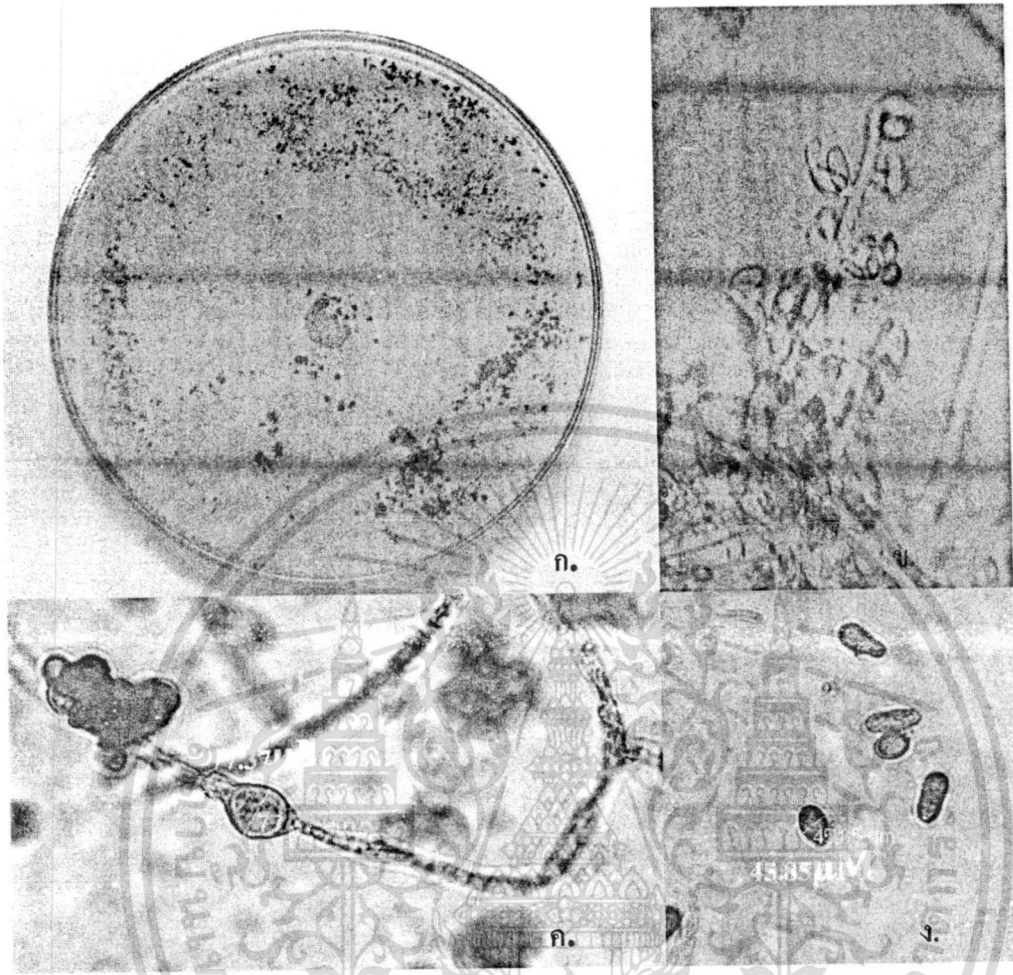
4.3.5 ไอโซเลท SCP 2 (รูปที่ 4.5) ลักษณะสำคัญของไอโซเลทนี้คือโคโลนีมีสีขาวและเมื่อสร้าง phialospore จะมีเขียวปนขาว และเปลี่ยนเป็นสีเขียวในที่สุด มีการเจริญอย่างรวดเร็ว มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร หลังจากบ่มเป็นเวลา 4 วันบนอาหาร malt extract agar พบการสร้างเม็ดสี

(สีเหลือง) บนอาหาร PDA conidiophore มีการแตกกิ่งก้าน สร้าง conidia บน phialide ที่ปลายสุดของ conidiophore มักจะมี phialide อันเดียว phialospore มีสีเขียวย้ำลักษณะรูปไข่ มีขนาดประมาณ 25.26 ไมโครเมตร chlamyospore มีผนังหนา ลักษณะรูปไข่ มีขนาดประมาณ 92.14 ไมโครเมตร

4.3.6 ไอโซเลท SCP 3 (รูปที่ 4.6) ลักษณะสำคัญของไอโซเลทนี้คือ โคลนีสีสีขาวและเมื่อสร้าง phialospore จะมีสีเขียวย้ำปนขาว และเปลี่ยนเป็นสีเขียวย้ำในที่สุด มีการเจริญอย่างรวดเร็ว มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร หลังจากบ่มเป็นเวลา 4 วันบนอาหาร malt extract agar พบการสร้างเม็ดสี (สีเหลือง) บนอาหาร PDA conidiophore มีลักษณะผอมยาวและโค้งงอ มีการแตกกิ่งก้านด้านข้างเล็กน้อย 1-2 กิ่ง phialospore มีสีเขียวย้ำลักษณะรูปไข่ มีขนาดประมาณ 26.43 ไมโครเมตร chlamyospore มีผนังหนา ลักษณะกลม มีขนาดประมาณ 91.64 ไมโครเมตร

4.3.7 ไอโซเลท SCP 4 (รูปที่ 4.7) ลักษณะสำคัญของไอโซเลทนี้คือ โคลนีสีสีขาวและเมื่อสร้าง phialospore จะมีสีเขียวย้ำปนขาว และเปลี่ยนเป็นสีเขียวย้ำในที่สุด มีการเจริญอย่างรวดเร็ว มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร หลังจากบ่มเป็นเวลา 4 วันบนอาหาร malt extract agar conidiophore มีการแตกกิ่งก้าน สร้าง conidia บน phialide ที่ปลายสุดของ conidiophore มักจะมี phialide อันเดียว phialospore มีสีเขียวย้ำลักษณะรูปไข่ มีขนาดประมาณ 30.41 ไมโครเมตร chlamyospore มีผนังหนา ลักษณะกลม มีขนาดประมาณ 86.23 ไมโครเมตร

4.3.8 ไอโซเลท SRS 4 (รูปที่ 4.8) ลักษณะสำคัญของไอโซเลทนี้คือ มีการเจริญและสร้างสปอร์อย่างรวดเร็ว โดยในการเจริญช่วงแรกเส้นใยจะมีสีขาว หลังจากนั้นจะมีการสร้างเม็ดสีอย่างรวดเร็ว เส้นใยจะแผ่ปกคลุมอย่างหนาแน่นทั่วผิวหน้าอาหาร โคลนีสีเขียวย้ำ โดยมีความหนาเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 9 เซนติเมตร หลังจากบ่มเป็นเวลา 4 วันบนอาหาร malt extract agar conidiophore มีการแตกกิ่งก้านเล็กน้อย มีการแตกกิ่งก้านของ phialide 1-2 กิ่ง มีการสร้าง conidia บน phialide ที่ปลายสุดของ conidiophore มักจะมี phialide อันเดียว phialospore มีสีเขียวย้ำลักษณะรูปไข่ มีขนาดประมาณ 33.03 ไมโครเมตร chlamyospore มีผนังหนา ลักษณะกลม มีขนาดประมาณ 79.87 ไมโครเมตร



รูปที่ 4.1 เชื้อ *Trichoderma* spp. ไอโซเลท CHA 4 ที่แยกได้จากรากต้นมันสำปะหลัง (อ.บ้านบัว

จ. ชลบุรี)

ก. โคโลนีของเชื้อเจริญบน malt extract agar อายุ 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง

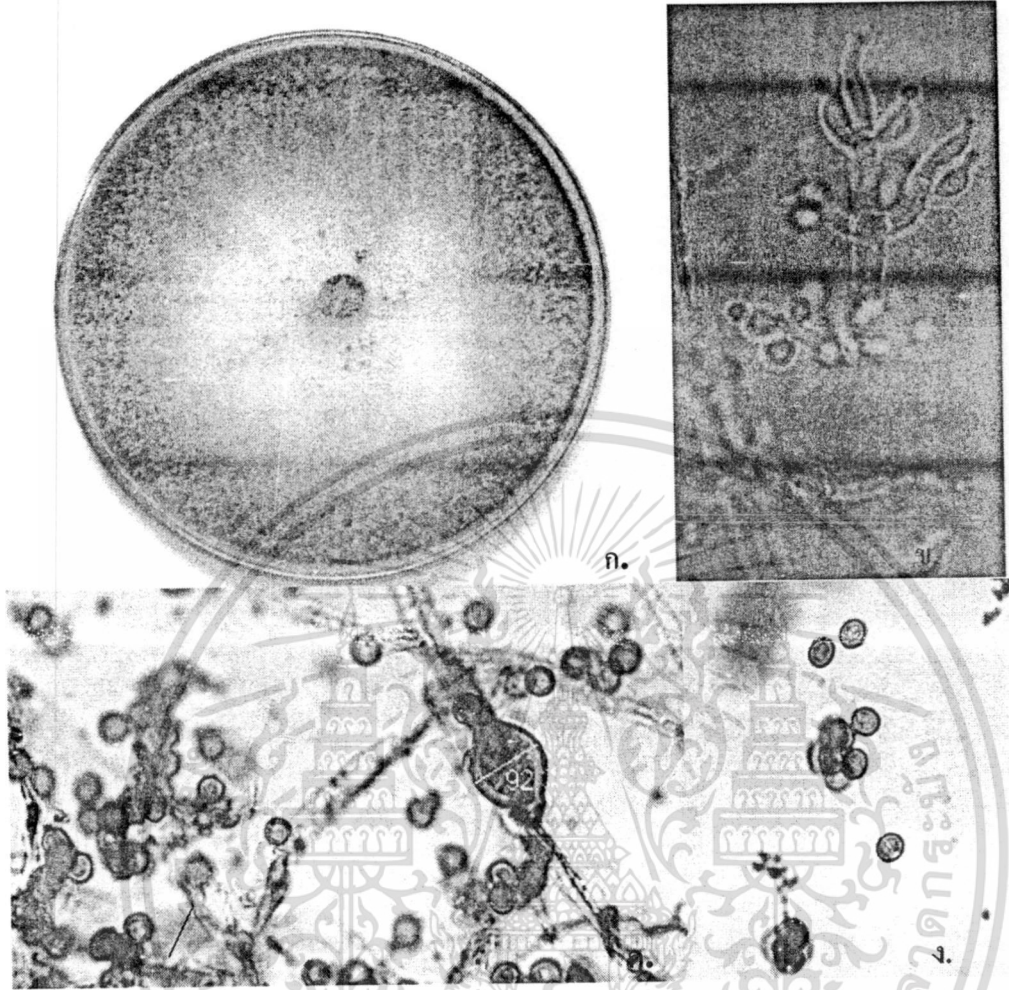
ข. conidiophores และ phialides¹

ค. chlamydo-spore¹

ง. phialo-spores¹

¹ กำลังขยาย 1000 เท่า

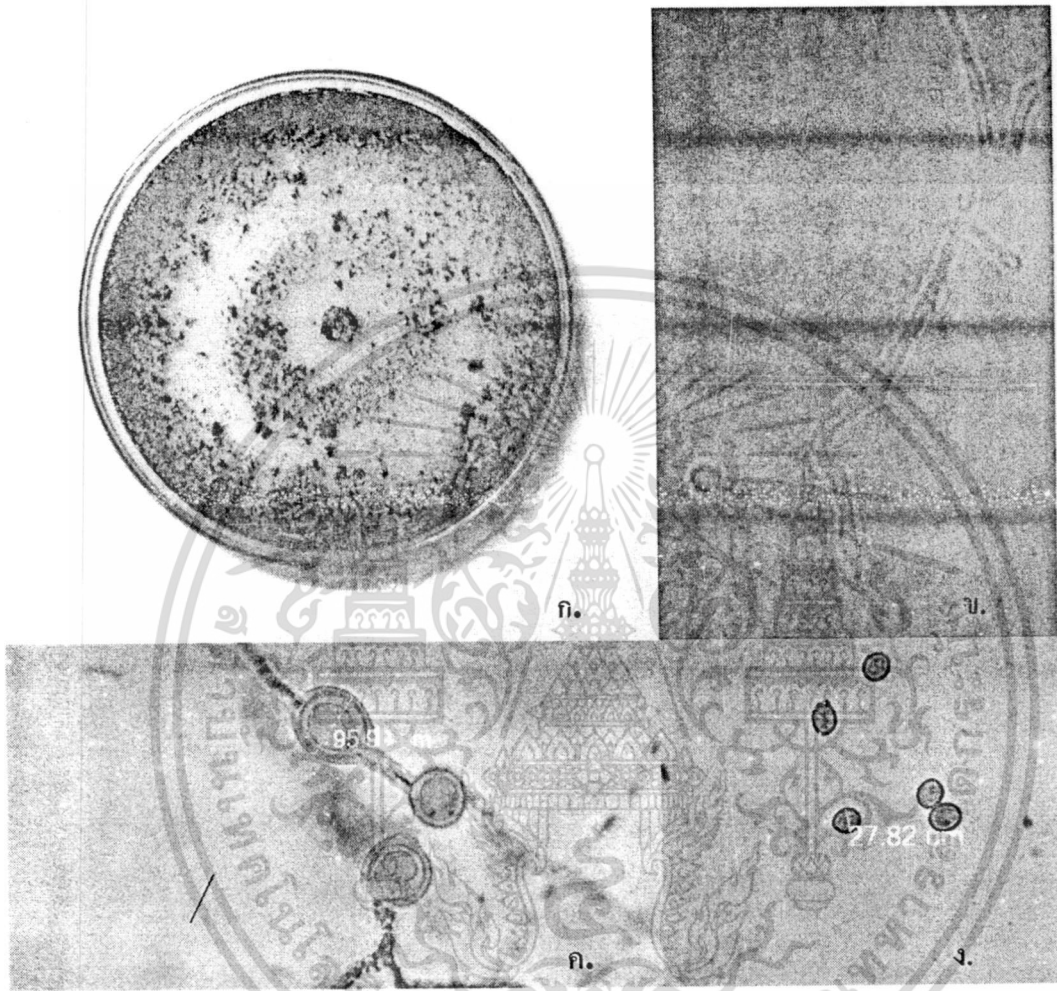
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ใด ๆ การค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 เชื้อ *Trichoderma* spp. ไอโซเลท KMC 5 ที่แยกได้จากดินปลูก (แปลงปลูกข้าวโพดทดลอง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง)

- ก. โคโลนีของเชื้อเจริญบน malt extract agar อายุ 7 วันที่อุณหภูมิห้อง
- ข. conidiophores และ phialides¹
- ค. chlamydospore¹
- ง. phialospores¹

¹ กำลังขยาย 1000 เท่า



รูปที่ 4.3 เชื้อ *Trichoderma* spp. ไอโซเลท KSR ที่แยกได้จากดินปลูก (แปลงปลูกสับปะรด

อ. เขาสก จ.สุราษฎร์ธานี)

ก. โคโลนีของเชื้อเจริญบน malt extract agar อายุ 7 วันที่อุณหภูมิห้อง

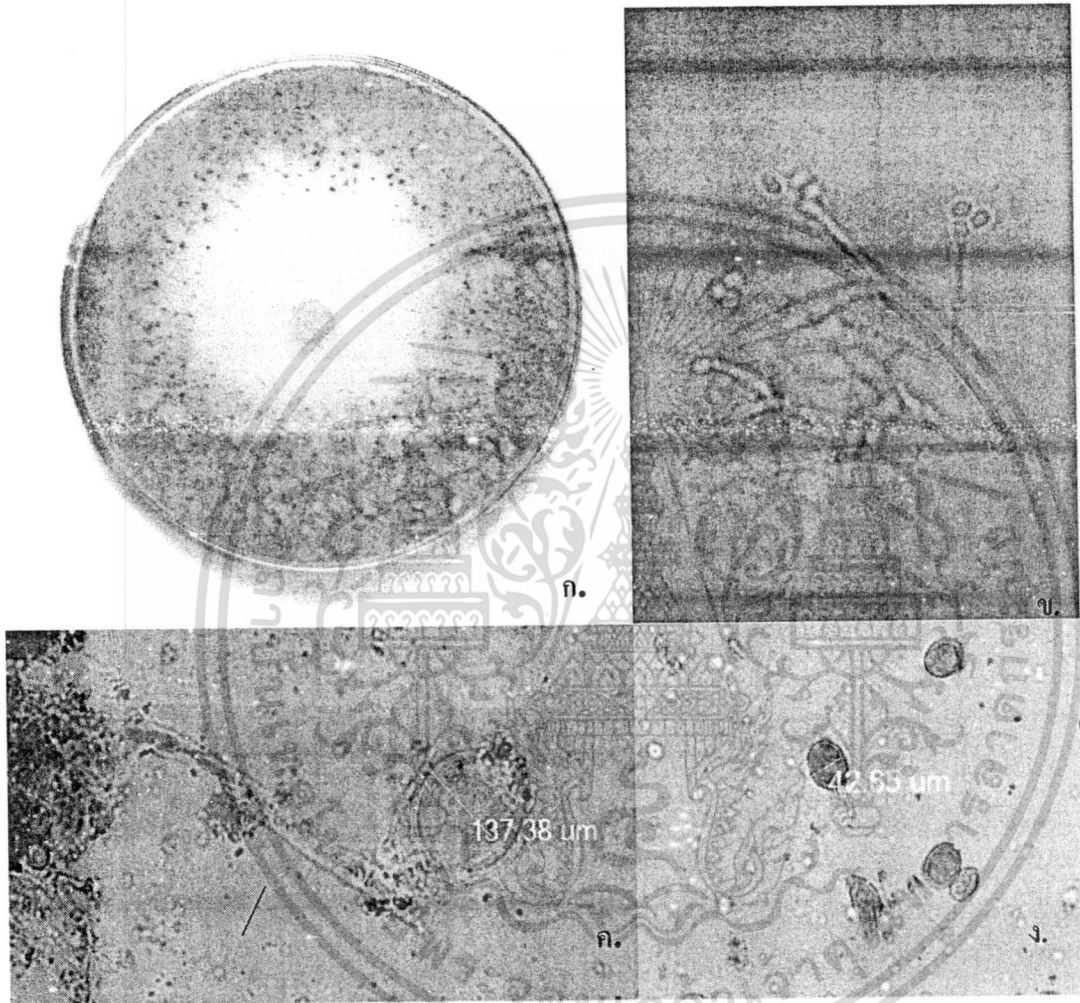
ข. conidiophores และ phialides¹

ค. chlamydospore¹

ง. phialospores¹

¹ กำลังขยาย 1000 เท่า

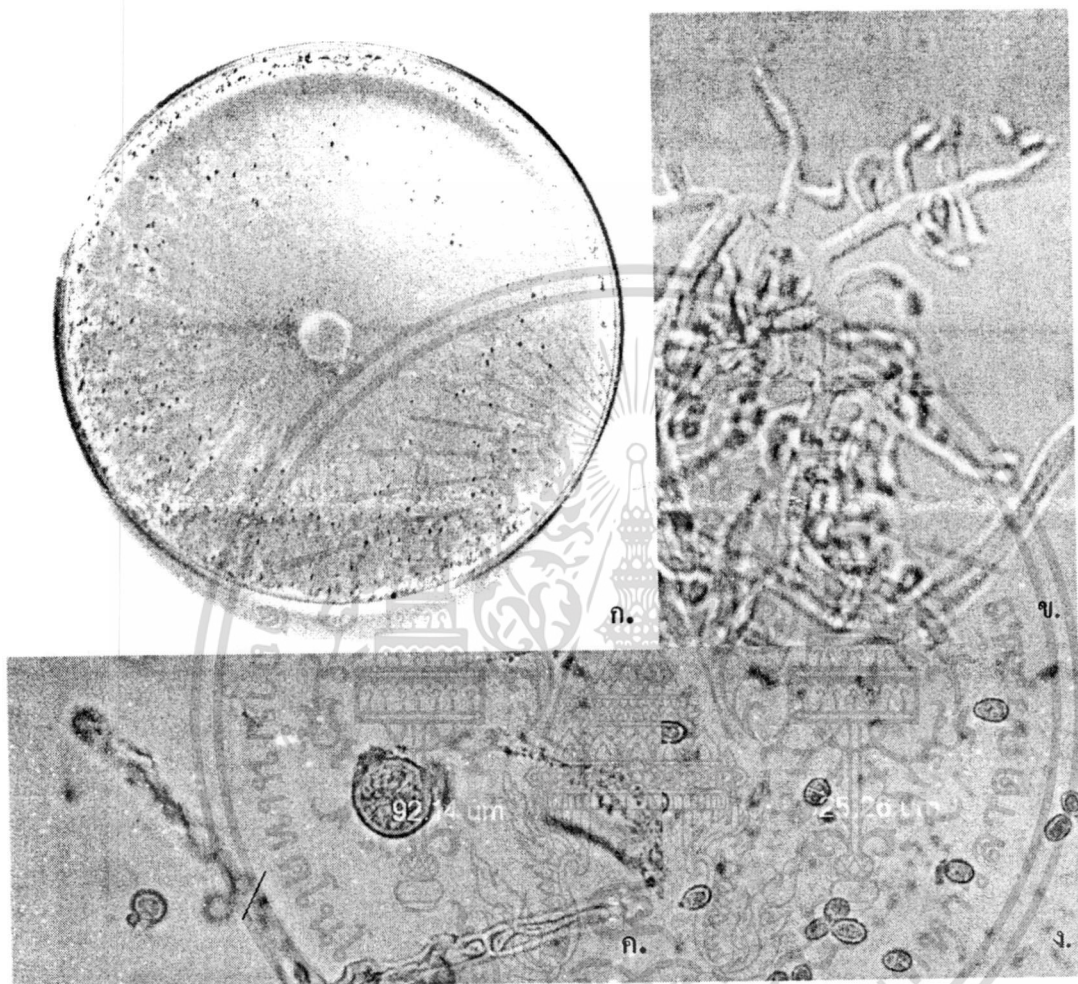
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์²³การค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 เชื้อ *Trichoderma* spp. ไอโซเลท SCP 1 ที่แยกได้จากดินปลูก (ไร่บัวสวรรค์ อ.ดอนเจดีย์

- จ. สุพรรณบุรี)
- ก. โคลนีสของเชื้อเจริญบน malt extract agar อายุ 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง
- ข. conidiophores และ phialides¹
- ค. chlamydospore¹
- ง. phialospores¹

¹ กำลังขยาย 1000 เท่า



รูปที่ 4.5 เชื้อ *Trichoderma* spp. ไอโซเลท SCP 2 ที่แยกได้จากดินปลูก (ไร่บัวสวรรค์ อ.ดอนเจดีย์

จ. สุพรรณบุรี)

ก. โคลนินของเชื้อเจริญบน malt extract agar อายุ 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง

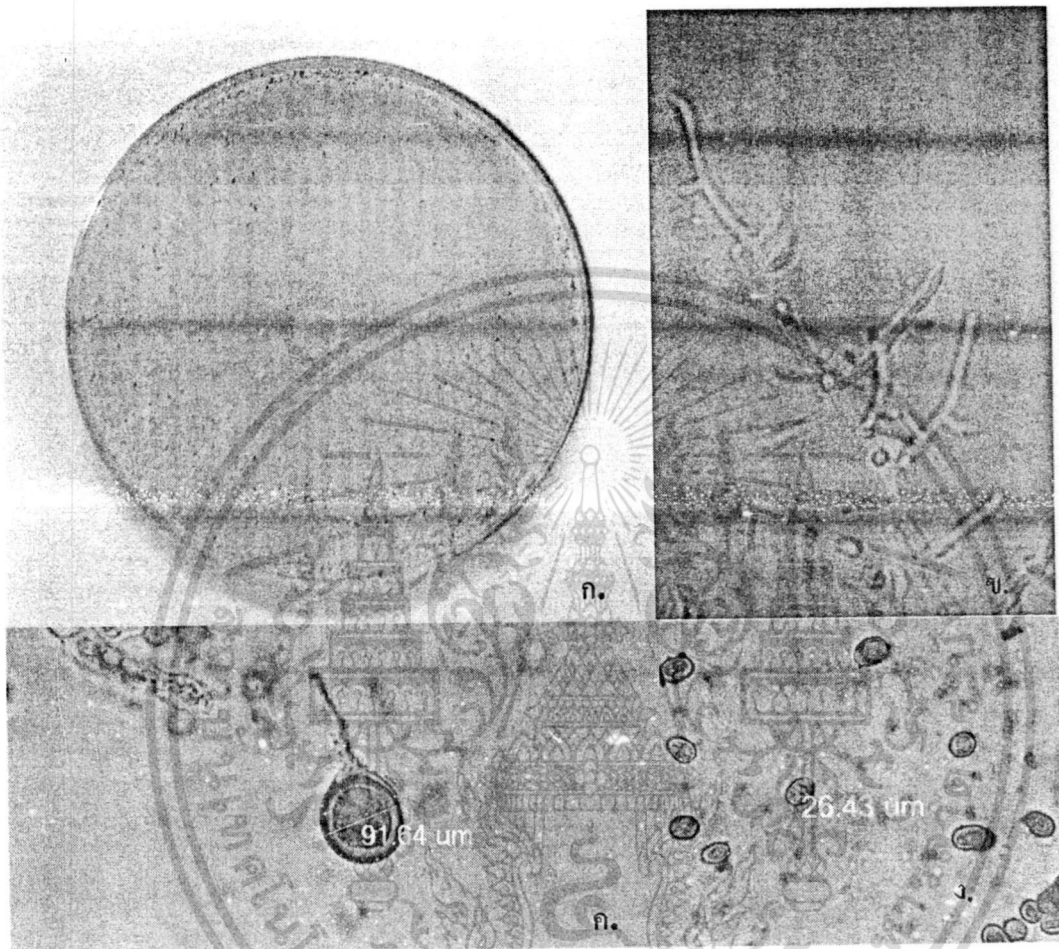
ข. conidiophores และ phialides¹

ค. chlamydospore¹

ง. phialospores¹

¹ กำลังขยาย 1000 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์²⁵ การค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 เชื้อ *Trichoderma* spp. ไอโซเลท SCP 3 ที่แยกได้จากดินปลูก (ไร่บัวสวรรค์ อ.ดอนเจดีย์

จ. สุพรรณบุรี)

ก. โคโลนีของเชื้อเจริญบน malt extract agar อายุ 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง

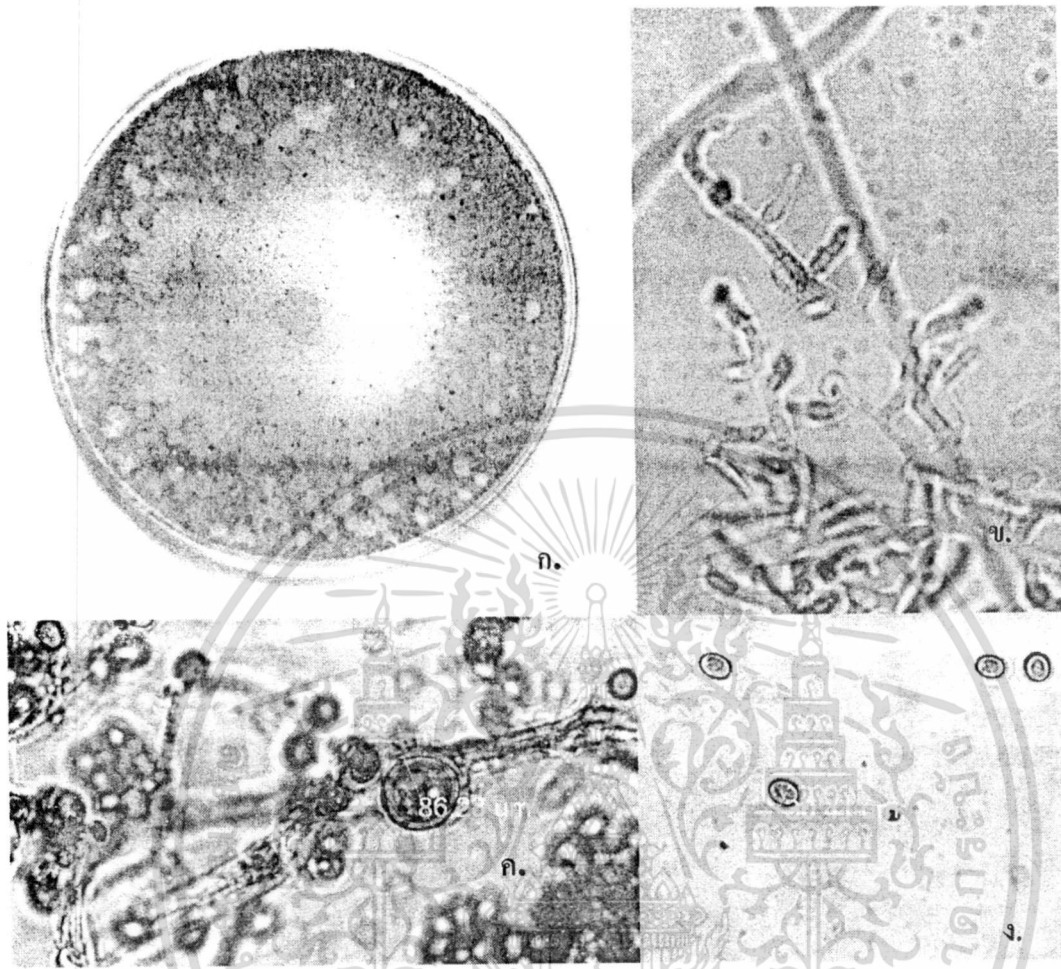
ข. conidiophores และ phialides¹

ค. chlamydospore¹

ง. phialospores¹

¹ กำลังขยาย 1000 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์²⁶ การค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.7 เชื้อ *Trichoderma* spp. ไอโซเลท SCP 4 ที่แยกได้จากดินปลวก (ไร่บัวสวรรค์

อ. จอนเจดีย์ จ. สุพรรณบุรี)

ก. โคโลนีของเชื้อเจริญบน malt extract agar อายุ 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง

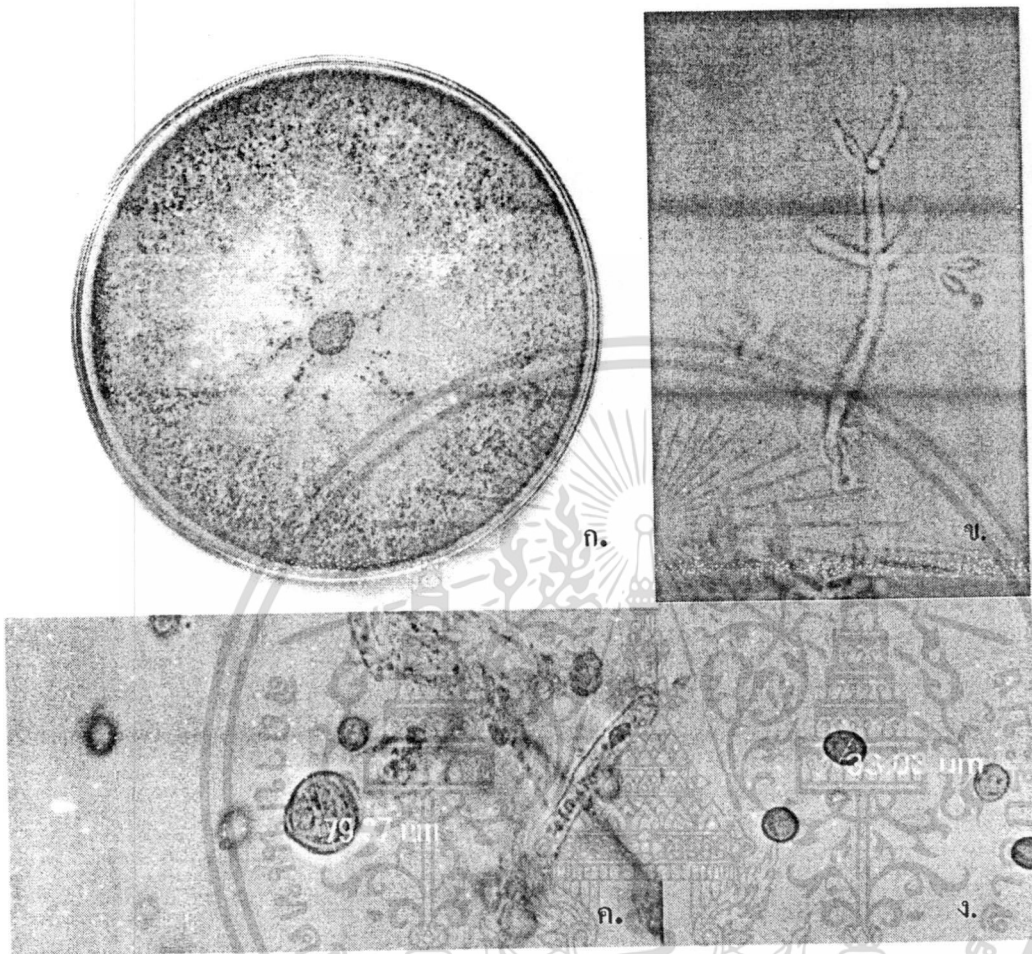
ข. conidiophores และ phialides¹

ค. chlamydospore¹

ง. phialospores¹

¹ กำลังขยาย 1000 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์²⁷ การค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.8 เชื้อ *Trichoderma* spp. ไอโซเลท SRS 4 ที่แยกได้จากดินปลวก (แปลงสปีปะรด อ.เขาสก

จ. สุราษฎร์ธานี)

ก. โคโลนีของเชื้อเจริญบน malt extract agar อายุ 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง

ข. conidiophores และ phialides¹

ค. chlamydospore¹

ง. phialospores¹

¹ กำลังขยาย 1000 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ใด ๆ การค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 การสกัดดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอจากเชื้อรา *Trichoderma* sp. ทั้ง 15 สายพันธุ์ (ตารางที่ 4.2) ที่ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 - 3 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แล้วนำเส้นใยมาทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป DNeasy Plant Mini Kit ของ Qiagen และทำการตรวจสอบด้วยวิธีการดูกลิ่นแสงและวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส สามารถสกัดดีเอ็นเอได้ทุกตัวอย่าง

ตารางที่ 4.2 แสดงแหล่งที่มาของเชื้อ *Trichoderma* sp. จำนวน 15 ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง

รหัส	แหล่งที่มา
TISTR 3167	เชื้อบริสุทธิ์จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย
TISTR 3329	เชื้อบริสุทธิ์จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย
TISTR 3553	เชื้อบริสุทธิ์จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย
KMC	แปลงข้าวโพด คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
MK	เชื้อทางการค้า
KSR	แปลงปลูกสับปะรด อ. เขาสก จ. สุราษฎร์ธานี
CHA	ไร่มันสำปะหลัง พันธุ์ระยอง 90 อ.บ้านบัว จ. ชลบุรี
CHA 4	ไร่มันสำปะหลัง พันธุ์ระยอง 90 อ.บ้านบัว จ. ชลบุรี
CHA 6	ไร่มันสำปะหลัง พันธุ์ระยอง 90 อ.บ้านบัว จ. ชลบุรี
SRS 1	แปลงข้าวโพด จังหวัดสุราษฎร์ธานี
SRS 4	แปลงข้าวโพด จังหวัดสุราษฎร์ธานี
SCP 1	ไร่บัวสวรรค์ อ.ดอนเจดีย์ จ. สุพรรณบุรี
SCP 2	ไร่บัวสวรรค์ อ.ดอนเจดีย์ จ. สุพรรณบุรี
SCP 3	ไร่บัวสวรรค์ อ.ดอนเจดีย์ จ. สุพรรณบุรี
SCP 4	ไร่บัวสวรรค์ อ.ดอนเจดีย์ จ. สุพรรณบุรี

4.4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

จากการทดลองเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส โดยใช้ดีเอ็นเอของเชื้อราทั้ง 15 ตัวอย่างเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ และใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 ภายใต้สภาวะอุณหภูมิตั้งข้อ 3.2.8 เมื่อทำการตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของเชื้อราทุกตัวอย่างได้ โดยให้ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 580 - 610 bp โดยเชื้อรา TISTR 3167, TISTR 3329, TISTR 3553, KMC 5, MK, KSR, SRS 1,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

SRS 4, SCP 1 และ SCP 4 มีขนาดที่เท่าๆกันประมาณ 580 bp และเชื้อรา CHA, CHA 4, CHA 6, SCP 2 และ SCP 3 มีขนาดที่เท่าๆกันประมาณ 610 bp ดังผลที่แสดงในรูปที่ 4.9 ซึ่งการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ Hermosa และคณะ (2000) ที่ศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมเพื่อจัดจำแนกเชื้อรา *Trichoderma* sp. ที่ใช้ในการควบคุมโรคพืช เมื่อทำการตรวจสอบ rDNA บริเวณ ITS พบว่าชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จะมีขนาดประมาณ 560 - 600 bp

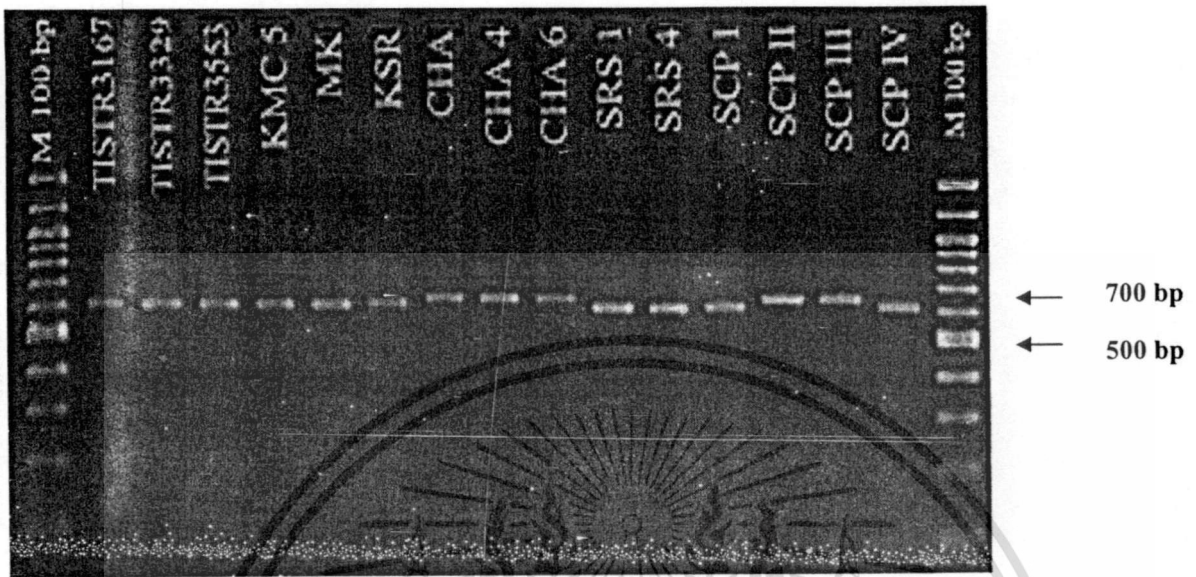
จากผลการทดลองจากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสของตัวอย่างทั้ง 15 ตัวอย่าง สามารถแบ่งตัวอย่างเชื้อออกเป็น 2 กลุ่มตามขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ คือ กลุ่มที่ 1 ชิ้นดีเอ็นเอมีขนาด 580 bp ประกอบด้วยเชื้อรา TISTR 3167, TISTR 3329, TISTR 3553, KMC 5, MK, KSR, SRS 1, SRS 4, SCP 1 และ SCP 4 กลุ่มที่ 2 ชิ้นดีเอ็นเอมีขนาด 610 bp ประกอบด้วยเชื้อรา CHA, CHA 4, CHA 6, SCP 2 และ SCP 3 จะเห็นได้ว่าเชื้อราที่มาจากแหล่งเดียวกันจะมีขนาดชิ้นของดีเอ็นเออยู่ในกลุ่มเดียวกัน ดังเช่น เชื้อราในกลุ่ม TISTR และ CHA ไม่ว่าจะอยู่ในกลุ่ม TISTR ทั้ง TISTR 3167, TISTR 3329 และ TISTR 3553 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย หรือในกลุ่ม CHA ทั้ง CHA, CHA 4 และ CHA 6 ที่แยกได้จากไร่มันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 90 อ.บ้านบัว จ. ชลบุรี แต่สำหรับเชื้อราในกลุ่ม SCP ที่แยกได้จากไร่บัวสวรรค์ อ.ดอนเจดีย์ จ.สุพรรณบุรี จะแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ SCP 1 และ SCP 4 จัดอยู่ในกลุ่มที่มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอเป็น 580 bp และ SCP 2 และ SCP 3 จัดอยู่ในกลุ่มที่มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอเป็น 610 bp

4.5 การตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (PCR-RFLP)

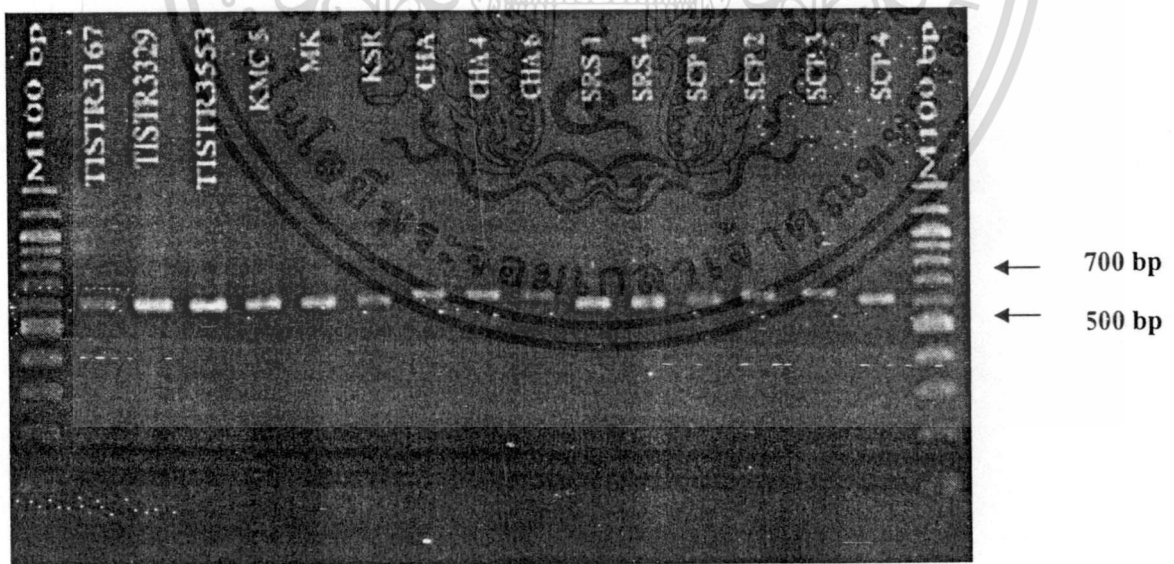
จากการนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสของตัวอย่างเชื้อทั้ง 15 ตัวอย่าง มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 4 ชนิด คือ *HindIII*, *HaeIII*, *SmaI* และ *BamHI* ซึ่งมีตำแหน่งจดจำในการตัดแตกต่างกัน ปรากฏผลดังแสดงในรูปที่ 4.10 - 4.13

4.6.1 การตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII*

จากการนำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* แล้วนำมาศึกษาขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้โดยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่าขนาดของชิ้นดีเอ็นเอไม่มีการเปลี่ยนแปลง ดังแสดงในรูปที่ 4.10 เป็นผลเนื่องมาจากบริเวณ ITS ไม่มีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ *HindIII* จึงไม่เกิดการตัด ผลการทดลองที่ได้ตรงกับรายงานของ Castle และคณะ (1997) ที่จำแนกสายพันธุ์เชื้อรา *Trichoderma* sp. ที่พบในฟาร์มเห็ดของอเมริกาเหนือ ซึ่งรายงานว่าเมื่อตัดชิ้นดีเอ็นเอบริเวณ ITS ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* จะไม่เกิดการตัด ดังนั้นจึงสามารถแบ่งตัวอย่างเชื้อราออกได้เป็น 2 กลุ่มเช่นเดิมตามขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส



รูปที่ 4.9 แสดงขนาดของดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสของตัวอย่างเชื้อทั้ง 15 ชนิด โดยมีดีเอ็นเอขนาด 100 bp เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน

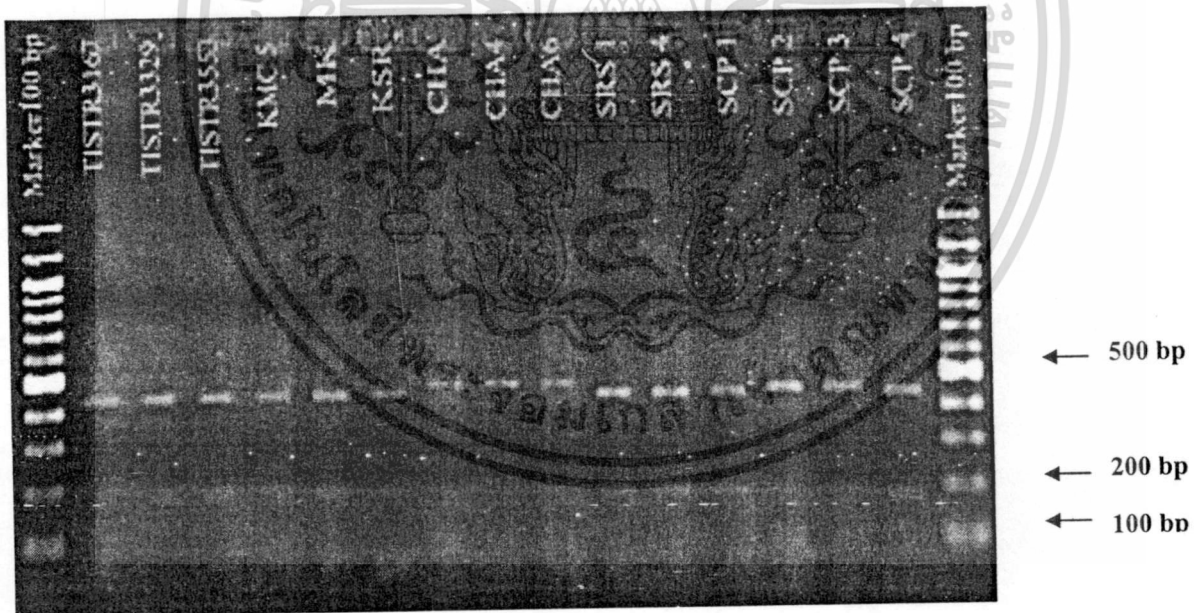


รูปที่ 4.10 แสดงขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* โดยมีดีเอ็นเอขนาด 100 bp เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์³¹ในการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6.2 การตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III

จากการทดลองนำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III เมื่อทำการตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้โดยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ปรากฏผลดังแสดงในรูปที่ 4.11 ซึ่งเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III สามารถตัดชิ้นดีเอ็นเอบริเวณ ITS ได้ 1 ตำแหน่ง เมื่อตรวจสอบจำนวนและขนาดชิ้นดีเอ็นเอจะได้ 2 ขนาด คือ กลุ่มที่ 1 ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 410 bp และ 170 bp และกลุ่มที่ 2 ซึ่งมีชิ้นดีเอ็นเอขนาด 480 bp และ 130 bp และเมื่อทำการวิเคราะห์เพื่อจัดกลุ่มยังสามารถแบ่งตัวอย่างออกเป็น 2 กลุ่ม เช่นเดียวกับการแบ่งจากขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส โดยกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยเชื้อรา TISTR 3167, TISTR 3329, TISTR 3553, KMC 5, MK, KSR, SRS 1, SRS 4, SCP 1 และ SCP 4 และกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยเชื้อรา CHA, CHA 4, CHA 6, SCP 2 และ SCP 3 ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับรายงานของ Ranganath และคณะ (2002) ที่ทำการศึกษาการจำแนกเชื้อรา *Trichoderma* sp. ในประเทศอินเดีย ที่พบว่าเมื่อตัดชิ้นดีเอ็นเอบริเวณ ITS ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III จะได้ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรม

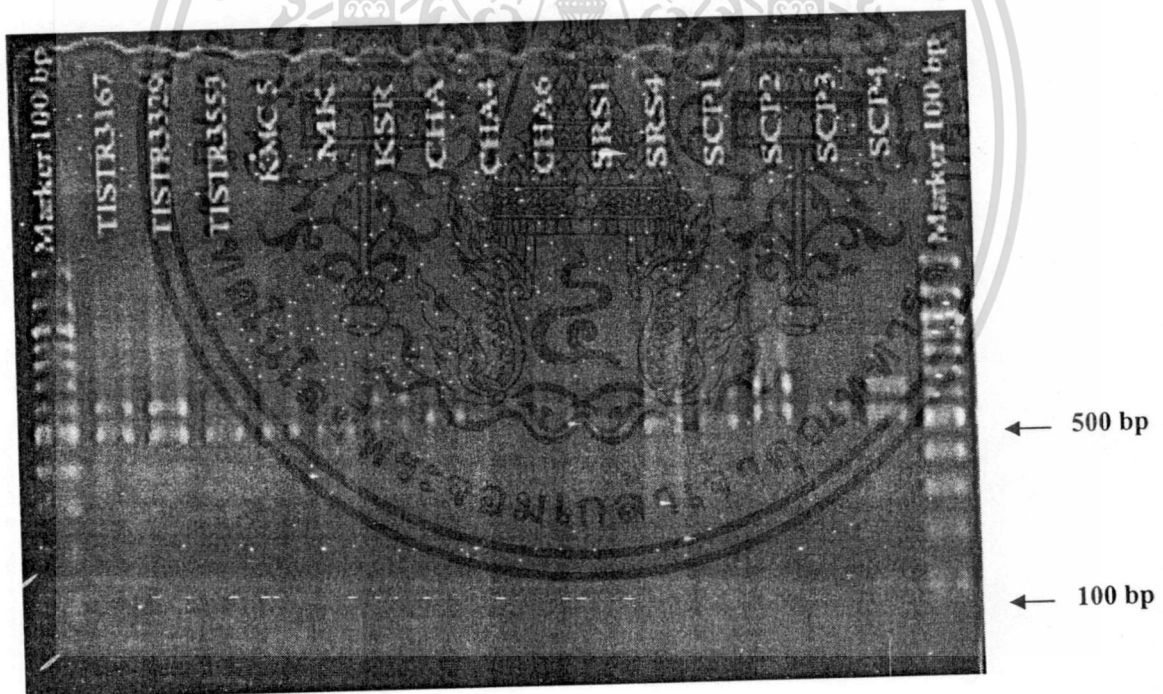


รูปที่ 4.11 แสดงขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III โดยมีดีเอ็นเอขนาด 100 bp เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์³² การค้า. ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6.3 การตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sma*I

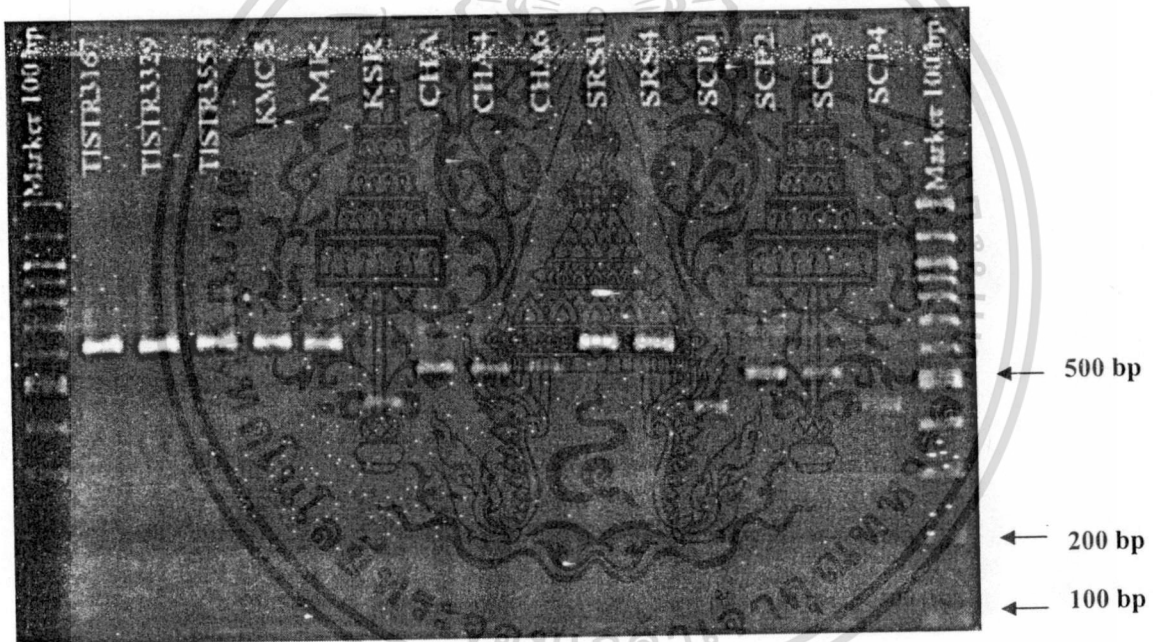
จากการทดลองนำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสมาดัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sma*I เมื่อทำการตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ โดยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่าเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sma*I สามารถตัดชิ้นดีเอ็นเอบริเวณ ITS ได้ 1 ตำแหน่ง ผลจากการตัดให้ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่แบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 มีชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 500 bp และ 80 bp ประกอบด้วยเชื้อรา TISTR 3167, TISTR 3329, TISTR 3553, KMC 5, MK, KSR, SRS 1, SRS 4, SCP 1 และ SCP 4 กลุ่มที่ 2 มีชิ้นดีเอ็นเอขนาด 510 bp และ 100 bp ประกอบด้วยเชื้อรา CHA, CHA6, SCP 2 และ SCP 3 และกลุ่มที่ 3 ซึ่งมีชิ้นดีเอ็นเอขนาด 480 bp กับ 130 bp คือเชื้อรา CHA 4 ผลแสดงดังรูปที่ 4.12 โดยพบว่าผลที่ได้แตกต่างจากการทดลองของ Castle และคณะ (1997) ที่ได้ทำการจำแนกสายพันธุ์เชื้อรา *Trichoderma* sp. ที่พบในฟาร์มเห็ดของอเมริกาเหนือ ซึ่งรายงานว่าเมื่อตัดชิ้นดีเอ็นเอบริเวณ ITS ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sma*I จะได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาด 550 bp กับ 125 bp และเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI จะได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาด 350 bp จำนวนสองชิ้น



รูปที่ 4.12 แสดงขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sma*I โดยมีดีเอ็นเอขนาด 100 bp เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน

4.6.4 การตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI

จากการทดลองนำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสมัดตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI เมื่อทำการตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ โดยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่าเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI มีตำแหน่งจดจำในการตัดซึ่งสามารถตัดชิ้นดีเอ็นเอบริเวณ ITS ได้ 1 ตำแหน่ง ผลจากการตัดให้ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่แบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ไม่เกิดการตัด ประกอบด้วยเชื้อรา TISTR 3167, TISTR 3329, TISTR 3553, KMC 5, MK, SRS 1 และ SRS 4 กลุ่มที่ 2 มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 500 bp และ 110 bp ประกอบด้วยเชื้อรา CHA, CHA 4, CHA 6, SCP 2 และ SCP 3 และกลุ่มที่ 3 มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 410 bp กับ 170 bp ประกอบด้วยเชื้อรา KSR, SCP 1 และ SCP 4 ผลแสดงดังรูปที่ 4.13



รูปที่ 4.13 แสดงขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI โดยมีดีเอ็นเอขนาด 100 bp เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน

จากการทดลองจากการทดลองนำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ BamHI ผลที่ได้สอดคล้องกับการทดลองของ Castle และคณะ (1997) ที่ได้ทำการจำแนกสายพันธุ์เชื้อรา *Trichoderma* sp. ที่พบในฟาร์มเห็ดของอเมริกาเหนือ ซึ่งพบว่าเมื่อตัดชิ้นดีเอ็นเอบริเวณ ITS ซึ่งมีขนาดประมาณ 700 bp ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ BamHI จะให้ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ชิ้นดีเอ็นเอบริเวณ ITS ไม่เกิดการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ BamHI ซึ่งจะเป็นเชื้อราในกลุ่ม *T. harzianum*, *T. crassum*, *T. hamatum* หรือ *T. spirale* กลุ่มที่ 2 เกิดการตัดแล้วให้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 560 bp และ 140 bp ซึ่งจะเป็นเชื้อรา *T. koningii* หรือ *T. atroviride* และกลุ่มที่ 3 เมื่อเกิดการตัดแล้วให้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 480 bp และ 220 bp ซึ่งจะเป็นเชื้อรา *T. citrinoviride* หรือ *T. longibrachiatum*

จากการจำแนกเชื้อรา *Trichoderma* sp. สายพันธุ์ต่างๆ จำนวน 15 ตัวอย่างออกจากกันด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ universal primer ITS1 และ ITS4 สามารถจำแนกตัวอย่างเชื้อราออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ตามขนาดชิ้นดีเอ็นเอ คือขนาดประมาณ 580 และ 610 bp แต่เมื่อศึกษาต่อด้วยเทคนิค PCR-RFLP โดยตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII*, *HaeIII*, *SmaI* และ *BamHI* พบว่าสามารถแยกเชื้อตัวอย่างออกได้เป็น 4 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอประมาณ 580 bp ไม่มีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ *HindIII* และ *BamHI* และเมื่อใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *HaeIII* และ *SmaI* สามารถตัดชิ้นดีเอ็นเอบริเวณ ITS ได้ 1 ตำแหน่ง โดยชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดด้วย *HaeIII* มีขนาดประมาณ 410 และ 170 bp และตัดด้วย *SmaI* มีชิ้นดีเอ็นเอประมาณ 500 และ 80 bp โดยเชื้อราในกลุ่มนี้ได้แก่ เชื้อ TISTR 3176, TISTR 3329, TISTR 3553, KMC 5, MK, SRS 1 และ SRS 4

กลุ่มที่ 2 มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอประมาณ 580 bp ไม่มีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ *HindIII* และเมื่อใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *HaeIII*, *SmaI* และ *BamHI* สามารถตัดชิ้นดีเอ็นเอบริเวณ ITS ได้ 1 ตำแหน่ง โดยชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดด้วย *HaeIII* มีขนาดประมาณ 410 และ 170 bp และตัดด้วย *SmaI* มีชิ้นดีเอ็นเอประมาณ 500 และ 80 bp เช่นเดียวกับกลุ่มที่ 1 แต่เมื่อตัดด้วย *BamHI* ได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาด 410 bp กับ 170 bp โดยเชื้อราในกลุ่มนี้ได้แก่ เชื้อ KSR, SCP 1 และ SCP 4

กลุ่มที่ 3 มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอประมาณ 610 bp ไม่มีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ *HindIII* และเมื่อใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *HaeIII*, *SmaI* และ *BamHI* สามารถตัดชิ้นดีเอ็นเอบริเวณ ITS ได้ 1 ตำแหน่ง โดยชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดด้วย *HaeIII* มีขนาดประมาณ 480 bp และ 130 bp และตัดด้วย *SmaI* มีชิ้นดีเอ็นเอประมาณ 510 และ 100 bp และตัดด้วย *BamHI* มีชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 500 bp และ 110 bp โดยเชื้อราในกลุ่มนี้ได้แก่ เชื้อ CHA, CHA 6, SCP 2 และ SCP 3

กลุ่มที่ 4 มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอประมาณ 610 bp ไม่มีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ *HindIII* และเมื่อใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *HaeIII*, *SmaI* และ *BamHI* สามารถตัดชิ้นดีเอ็นเอบริเวณ ITS ได้ 1 ตำแหน่ง โดยชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดด้วย *HaeIII* มีขนาดประมาณ มีขนาดประมาณ 480 bp และ 130 bp และ

ตัดด้วย BamHI มีชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 500 bp และ 110 bp เช่นเดียวกับในกลุ่มที่ 3 แต่เมื่อตัดด้วย SmaI จะได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 480 bp กับ 130 bp โดยเชื้อราในกลุ่มนี้ได้แก่ เชื้อ CHA 4

จากการศึกษาด้วยเทคนิคการหาลำดับเบส (Sequencing) ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสของเชื้อจำนวน 14 ตัวอย่าง นำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลที่มีอยู่แล้วของ GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) พบว่าเชื้อราในกลุ่มที่ 1 ทุกตัวอย่าง ได้แก่ TISTR 3329, TISTR 3553, SRS 1, KMC 5, MK และ SRS 4 เป็นเชื้อรา *Trichoderma asperellum* (TISTR 3176 ไม่ได้ทำการหาลำดับเบส) เชื้อราในกลุ่มที่ 2 พบว่าตัวอย่างเชื้อ SCP 1 และ SCP 4 ไม่สามารถระบุสายพันธุ์ได้แต่ยังคงเป็น *Trichoderma* sp. และ KSR เป็น *Trichoderma erinaceum* สำหรับเชื้อราในกลุ่มที่ 3 แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่ม 1 คือ SCP 2 และ SCP 3 เป็น *Trichoderma longibrachiatum* กลุ่ม 2 คือ CHA และ CHA 6 เป็น *Trichoderma ghanennse* สำหรับเชื้อราในกลุ่มที่ 4 คือ CHA 4 อยู่ในกลุ่มเดียวกับ CHA และ CHA 6 คือ เป็น *Trichoderma ghanennse*

4.6 การศึกษาอินโนมของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* โดยเทคนิค EST

cDNA library ของเชื้อรา *T. harzianum* ซึ่งถูกสร้างขึ้นจากเส้นใยของเชื้อรา และนำมาหาลำดับ EST ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.3 จากจำนวนยีนที่พบทั้งหมด พบว่ามียีนที่คล้ายคลึงกับ *Neurospora crassa* และ *Aspergillus nidulans* สำหรับ contigs ที่มีจำนวน EST มากที่สุดได้แสดงในตารางที่ 4.4 จากการวิเคราะห์ลำดับ EST ในเส้นใยของ *T. harzianum* พบว่ายีน 55 ตัวจากยีนทั้งหมด 3298 ยีน มีคุณสมบัติเกี่ยวข้องกับการควบคุมโรคพืช และการแสดงออกของยีนเหล่านี้สามารถจัดแบ่งหน้าที่ได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่เกี่ยวข้องกับส่วนประกอบของเซลล์ กลุ่มที่มีหน้าที่ระดับโมเลกุล (molecular function) และกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการชีววิทยา (biological process) โดยจำนวนโคลน (clone) ส่วนใหญ่ (38.5%) เกี่ยวข้องกับกระบวนการชีววิทยา เช่น กระบวนการทางสรีรวิทยา กระบวนการพัฒนา และกระบวนการระดับเซลล์ เป็นต้น 25.9% เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีนเพื่อเป็นส่วนประกอบของเซลล์ เพื่อการสร้างเส้นใยของเชื้อรา และอีก 35.6% จะเกี่ยวข้องกับหน้าที่ระดับโมเลกุล เช่น การสร้างโปรตีนที่เป็นสารพิษ การสร้างโปรตีนเพื่อระบบภูมิคุ้มกันเซลล์ และ antioxidant activity เป็นต้น นอกจากนี้จากการศึกษายังพบว่าการวิเคราะห์ลำดับ EST มีความสำคัญต่อ functional gene โดยเฉพาะยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมโรคและมีความสำคัญต่อการพัฒนาเป็น fungicide ตัวใหม่ในอนาคต

ตารางที่ 4.3 การวิเคราะห์ลำดับ EST (EST sequence analysis) ของ *Trichoderma harzianum*

ESTs submitted to GenBank	3298
Total reading length	1748 kb
Average length per EST	446 bp
G +C content	53.16%
Homology to nr database	2174
Known ESTs	451
Unknown ESTs	673
Unigene number	1740
Contig number	463
Singlet number	1277
ESTs/contig	4.37
Known unigenes	964

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ใด ๆ การค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 known high redundancy gene

Contig no.	Redundancy	Putative function
Contig447	85	Cell wall protein QID3 precursor
Contig452	75	Hypothetical oxidoreductase
Contig451 ^a	58	Woronin body major protein
Contig448	58	DNA damage-responsive protein
Contig450	47	Norsolorinic acid reductase
Contig445	25	Elongation factor 1-alpha
Contig444	23	Retinol dehydrogenase 11
Contig442	20	ADP, ATP carrier protein
Contig439	17	Acyl-CoA desaturase 1
Contig462	17	Mucin 2 precursor
Contig437	16	Thiazole biosynthetic enzyme
Contig433	13	Superoxide dismutase
Contig431	12	Eukaryotic translation initiation
Contig429	11	Peptidyl-prolyl cis isomerase
Contig430	11	IPC-B hydroxylase
Contig423	10	3-Ketoacyl-acyl carrier protein reductase
Contig426 ^b	10	Woronin body major protein
Contig428	10	Retinol dehydrogenase

หมายเหตุ ^{a,b} หมายถึง contig 451 และ contig426 ที่แตกต่างจากบริเวณของ Woronin body major protein เพียงเล็กน้อย ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า contig เหล่านี้เป็นยีนชนิดเดียวกัน

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่คัดเลือกได้จากดินธรรมชาติทั้งหมด 8 ไอโซเลท ได้แก่ CHA 4, KMC 5, KSR, SCP 1, SCP 2, SCP 3, SCP 4, และ SRS 4 พบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยา มีความสอดคล้องกับลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่ระบุไว้ในเอกสารการจำแนกเชื้อรา *Trichoderma* spp. ของ Rifai (1969) และจากการศึกษาทำการจำแนกเชื้อรา *Trichoderma* sp. สายพันธุ์ต่างๆ ออกจากกัน ด้วยเทคนิค PCR - RFLP โดยทำการศึกษาเชื้อจำนวน 15 ตัวอย่าง เมื่อทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยา ลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR) โดยใช้ Universal primer ITS1 และ ITS4 พบชิ้นดีเอ็นเอมีขนาดประมาณ 580-610 bp และทำให้สามารถจำแนกตัวอย่างเชื้อออกเป็น 2 กลุ่มตามขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ ซึ่งผลที่ได้ยังไม่สามารถจำแนกเชื้อออกจากกันได้อย่างชัดเจน จึงทำการศึกษาต่อด้วยเทคนิค PCR -RFLP โดยตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII*, *HaeIII*, *SmaI* และ *BamHI* ผลที่ได้พบว่าสามารถแยกเชื้อ ตัวอย่างออกได้เป็น 4 กลุ่ม คือกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยเชื้อ TISTR 3176, TISTR 3329, TISTR 3553, KMC 5, MK, SRS 1 และ SRS 4 กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยเชื้อ KSR, SCP 1 และ SCP 4 กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยเชื้อ CHA, CHA 6, SCP 2 และ SCP 3 และกลุ่มที่ 4 คือเชื้อ CHA 4 และเมื่อศึกษาด้วยเทคนิคการหาลำดับเบส (Sequencing) ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสของเชื้อจำนวน 14 ตัวอย่าง สามารถแบ่งเชื้อออกได้เป็น 4 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ *Trichoderma asperellum* ซึ่งส่วนใหญ่คือตัวอย่างในกลุ่มที่ 1 คือ TISTR 3329, TISTR 3553, SRS 1, KMC 5, MK และ SRS 4 สายพันธุ์ *Trichoderma erinaceum* มีเพียง 1 ตัวอย่าง คือ KSR สายพันธุ์ *Trichoderma ghanense* คือ ตัวอย่างชนิด CHA, CHA 4 และ CHA 6 และสายพันธุ์ *Trichoderma longibrachiatum* คือตัวอย่าง SCP 2 และ SCP 3 โดยตัวอย่างเชื้อ SCP 1 และ SCP 4 ยังไม่สามารถระบุสายพันธุ์ได้แต่ยังเป็น *Trichoderma* sp. สำหรับการศึกษายีนในจีโนมของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* โดยเทคนิค EST พบว่ายีน 55 ตัวของเชื้อรามีคุณสมบัติเกี่ยวข้องกับการควบคุมโรคพืช

จากผลการทดลองที่ได้ จะพบว่ามีเชื้อรา *Trichoderma* หลายชนิดที่พบในแหล่งดินธรรมชาติ ซึ่งอาจนำมาใช้ประโยชน์ในการควบคุมโรคพืชได้ ซึ่งต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม นอกจากนี้จากการศึกษาหายีนใหม่ๆที่ได้จากเชื้อรา *Trichoderma harzianum* จะช่วยให้เข้าใจถึงกลไกการควบคุมโรคพืชได้ดียิ่งขึ้น และสามารถนำข้อมูลที่ได้มาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์เชื้อราให้มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืชได้ดียิ่งขึ้น รวมถึงสามารถทนในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น ในแหล่งดินที่มีการใช้สารเคมี benzimidazole หรือทนต่อสภาพแวดล้อมต่างๆ ได้ดียิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

- ดุษณี ธนะบริพัฒน์ ญัฐยาน์ เปี้ยแดงและ Yang Qian. 2548. การใช้เชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการควบคุมการเจริญและการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *Aspergillus parasiticus* ในผลิตผลทางการเกษตร เอกสารประกอบการประชุมรายงานความก้าวหน้าโครงการวิจัยบูรณาการ การใช้รังสีและไบโอเทคโนโลยีปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเกษตรอินทรีย์ หน้า 96-100 สำนักงานปรมาณูเพื่อสันติ กรุงเทพฯ
- จินตนา อิงคินันท์. 2543. การจำแนกชนิดเชื้อรา *Trichoderma* spp. โดยอาศัยลักษณะสัณฐานวิทยาและลายพิมพ์ดีเอ็นเอและการทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเน่าระดับดินของคะเน้าที่เกิดจากเชื้อรา *Pythium aphanidermatum*. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สาขาวิชาโรคพืช ภาควิชาโรคพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ
- จิระเดช แจ่มสว่าง. 2538 ก. การควบคุมโรคพืชที่เกิดจากเชื้อราด้วยเชื้อราไตรโคเดอร์มา: ตอนที่ 2 หลักการและบทบาท. วารสารเคหการเกษตร 19(10): 159-165.
- จิระเดช แจ่มสว่าง. 2538 ข. การผลิตและการประยุกต์ใช้เชื้อราไตรโคเดอร์มาควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืช ใน เชื้อจุลินทรีย์ควบคุมศัตรูพืช หน้า 151-159 รวบรวมโดย สมคิด ดิสภาพร สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ
- จิระเดช แจ่มสว่าง และวรรณวิไล อินทหนู. 2542. การใช้เชื้อราไตรโคเดอร์มาควบคุมโรคพืช.โครงการเกษตรกู่ชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. เอกสารเผยแพร่ทางวิชาการ.
- จิระเดช แจ่มสว่าง และวรรณวิไล อินทหนู. 2545. การผลิตเชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดสดด้วยเทคนิคอย่างง่ายเพื่อใช้ควบคุมโรคเน่าระดับดินที่เกิดจากเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* หน้า 114-122. รายงานการประชุมวิชาการครั้งที่ 40 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 4-7 กุมภาพันธ์ 2545 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ
- จิระเดช แจ่มสว่าง, วรรณวิไล อินทหนูและญัฐยาน์ เปี้ยแดง 2545. การใช้รังสีเพิ่มประสิทธิภาพของเชื้อราไตรโคเดอร์มาในการควบคุมโรคพืช เอกสารประกอบการประชุมรายงานความก้าวหน้าโครงการวิจัยบูรณาการการใช้รังสีและไบโอเทคโนโลยีปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเกษตรอินทรีย์ หน้า 32-39 สำนักงานปรมาณูเพื่อสันติ กรุงเทพฯ
- ชิวเน ชำมรงค์ธรรมและประสิทธิ์ ผลิตผลการพิมพ์. 2544. การวิเคราะห์ลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอชีวสารสนเทศศาสตร์ หน้า 57-70 สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ กรุงเทพฯ

- รัชชัย เปรมศรี. 2543. การศึกษาสาเหตุโรคโคนต้นเห่าและรากเห่าของต้นไผ่เขียนและการควบคุมโดยชีววิธีด้วยเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่คัดเลือกจากดินปลูก. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ
- นิภาพร บุญศักดิ์ดาพร. 2538. การคัดเลือกเชื้อ *Trichoderma* spp. ไอโซเลตที่ต้านทานต่อสารเคมีเพื่อควบคุมโรคโคนเห่าของมะเขือเทศซึ่งเกิดจากเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* sacc. โดยวิธีประสมประสาน วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- บุญช่วย ศรีธรรมศักดิ์. 2544. การนำข้อมูลจากฐานข้อมูลชีวสารสนเทศ ชีวสารสนเทศศาสตร์ หน้า 19-22 สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ กรุงเทพฯ
- พิสิฐภัฏ ประพันธ์วัฒนา. 2546. พีซีอาร์: ความคิดระดับรางวัลโนเบลที่อุบัติขึ้นที่ความเร็ว 46.58 ไมล์ต่อชั่วโมง วารสารวิทยาศาสตร์ 57(2): 8-82.
- สิทธิรักษ์ รอยตระกูล. 2544. การใช้บริการค้นหาและวิเคราะห์ข้อมูลด้านอณูชีววิทยานบนเครือข่ายอินเทอร์เน็ต ชีวสารสนเทศศาสตร์ หน้า 71-106 สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ กรุงเทพฯ
- สุนันท์ ปิยะโชคณากุล. 2545. พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น. พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร.
- อรินทิพย์ ธรรมชัยพิเนต. 2546. ชีวสารสนเทศ(Bioinformatics). วารสารวิทยาศาสตร์ 57(2): 125-127.
- Bissett, J. 1984. A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section *Longibarchiatum* sect.nov. Can. J. Bot. 62 : 924-931.
- Bissett, J. 1991a. A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. Can. J. Bot.69: 2357-2372.
- Bissett, J. 1991b. A revision of the genus *Trichoderma*. III. Section *Pachybasium*. Can . J . Bot. 69: 2373-2417.
- Bissett, J. 1991c. A r evision of the genus *Trichoderma*. IV. Additional notes on section *Longibarchiatum*. Can . J . Bot. 69 : 2418-2420.
- Bissett, J. 1992. *Trichoderma atroviride*. Can . J . Bot. 70 : 639-641.
- Calistru, C, McLean, M. and Berjak, P. 1997. In vitro studies on the potential for biological control of *Aspergillus flavus* and *Fusarium moniliforme* by *Trichoderma* species. 2. A study of the production of extracellular metabolites by *Trichoderma* species. Mycopathol. 137: 115-124.
- Carlie, M.T., Watkinson, S.C. and Gooday, G. W. 2001. The Fungi. 2nd ed. Academic Press, San Diego.
- Castle A., Speranzini D., Rghei N., Alm G., Rinker D. and Bissett J. 1997. Morphological

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์⁴¹ การค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- and molecular identification of *Trichoderma* isolates on north American mushroom farms. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 133-137.
- Chet, I. and Inbar, J. 1994. Biological control of fungus pathogens. *Appl. Biochem Biotechnol.* 48 (1): 37-43.
- Corley, D.G., Miller-Wideman, M. and Durley, R. C. 1994. Isolation and structure of harzianum A: a new trichothecene from *Trichoderma harzianum*. *J. Nat. Products* 57: 422-425.
- Dhingra, O. D. and Sinclair, J. B. 1987. *Basic Plant Pathology Method.* 4th ed. CRC Press, New York.
- Domsch, K.H., Gams, W. and Anderson, T. H. 1980. *Compendium of Soil Fungi.* Vol.1 Academic Press, London.
- Elad, Y. 2000. Biological control of foliar pathogens by means of *Trichoderma harzianum* and potential modes of action. *Crop Prot.* 19: 709-714.
- El-Katatny, M.H., Gudeji, M. K. and Robra, K-H. 2001. Characterization of a chitinase and an endo- β - 1,3 – glucanase from *Trichoderma harzianum* Rifai T24 involved in control of the phytopathogen *Sclerotium rolfsii*. *Appl. Microbiol. Biotech.* 56: 137-143.
- Gallo A., Mule G., Favilla M. and Altomare C. 2004. Isolation and characterisation of a trichodiene synthase homologous gene in *Trichoderma harzianum*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 65: 11–20.
- Hermosa, M.R., Grondona, I., Iturriaga, E.A., Diaz-Minguez, J.M., Castro, C., Monte, E. and Garcia-Acha, I. 2000. Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1890-1898.
- Homer, D.W., Bell, D.K. and C.A. Jaworki. 1972. Efficacy of *Trichoderma harzianum* as a biocontrol for *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathol* 62: 442-447.
- Huang, C. and Yang, Q. 2005. Study on biocontrol mechanism and application of *Trichoderma* spp. In *Study on Plant Pest and Diseases Biological Control and Biotechnology*, pp. 243-255. Edited by Yang Qian and Yu Ziniu, Heilongjiang Science and Technology Press, Harbin, China.
- Ingold, C.T. and Hudson, H.J. 1993. *The Biology of Fungi.* Chapman & Hall, London.
- Jin, H. and Yang, Q. 2003. Construction of cDNA library of *Chaetomium globosum* and its EST sequencing. In *Bio-control and Biotechnology*, pp.31-37. Edited by Yang Qian, Heilongjiang Science and Technology Press, Harbin, China.

- Johnson, L.F. and Curl, E.A. 1972. Methods for Research on the Soil Borne Plant Pathogen. Burgess Publishing Company, Minnesota.
- Johnson, L.E., Bernard, E.C. and Qian, P. 1987. Isolation of *Trichoderma* spp. at low temperature from Tennessee and Alaska soil. Plant. Dis. 71: 137-140.
- Kubicek, C.P., Bissett, J., Druzhinina, I.S., Gradinger, C.K. and Szakacs, G. 2002. Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma*: a case study on South-East Asian isolates. Fung. Genet. Biol. 38: 310-319.
- Liu, R., Yang, Q., Thanaboripat, D. and Thansukon, P. 2004a. Screening of *Trichoderma* species for biological control activity on *Aspergillus flavus*. KMITL Sci. J. 4(1) 81-89.
- Liu, R., Yang, Q., Thanaboripat, D. and Thansukon, P. 2004b. Biocontrol of *Aspergillus flavus* and aflatoxin production. KMITL Sci. J.4(1) 238-250.
- Liu, P. and Yang, Q. 2004a. Expressed sequence tags (EST). KMITL Sci. J. 4(1):273-278.
- Liu, P. and Yang, Q. 2004b. Identification of genes with a biocontrol function in *Trichoderma harzianum* mycelium using the expressed sequence tag approach. Res. Micro. 156: 416-423.
- Martin, K.J. and Rygiewicz, P.T. 2005. Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. BMC Micro. 5:28.
- Moore-Landecker, E. 1996. Fundamental of the Fungi. 4th ed. Prentice Hall International Inc., London.
- Ranganath, H. R., Shyam, P.G. and Sheeba. 2002. PCR-fingerprinting of some *Trichoderma* isolates from two Indian type culture collections – a need for re-identification of these economically important fungi. Scien. Corr. 83: 372-373.
- Rifai, M.A. 1969. A Revision of the Genus *Trichoderma*. Mycol. Paper No 116. Commonwealth Mycological Institute, Kew.
- Samuels, G.J. 1996. *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. Mycol. Res. 100: 923-935.
- Singh, J. and Faull, J. L. 1988. "Antagonism and biological control." 167-177. In Biocontrol of Plant Diseases. Volume 2. Edited by K. G. Mukerji and K. L. Garg. CRC Press, Florida
- Thanaboripat, D. 2002. Importance of aflatoxin. KMITL Sci. J. 2(1):38-45.
- Tian, L. and Wang, W. 2000. Control of *Trichoderma* against *Botrytis cinerea* of strawberries in greenhouse. Plant Prot. 16(3): 294-298.

- Tong, Y., Ji, Z. and Xu, J. 2003. Research program on biological control of gray mold. Chinese J. Biol. Control 19(3):113-115.
- Whipps, J.M. and Lumsden, R.D. 2001. Commercial use of fungi as plant disease biological control agents: status and prospect. In Fungi as Biocontrol Agents. Progress, Problems and Potential, pp. 9-22. Edited by T.M. Butt, C. Jackson and N. Magan. CABI Publishing, Oxon.
- White T.J., Bruns T., Lee S., and Taylor, J. W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, pp. 315-322. Edited by M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White. Academic Press, Inc., New York.
- Wuczowski M., Druzhinina I.S., Gherbawy Y., Klug B., Prillinger H. and Kubicek C.P. 2002. Species pattern and genetic diversity of *Trichoderma* in a mid-European, primeval floodplain-forest. Micro. Res. 158: 125-133.
- Yang, Q., Li, M. and Soyong, K. 2003. Methods of transforming resistance gene to benzimidazole fungicides into trichoderma harzianum and Chaetomium globosum. In Bio-control and Biotechnology, pp.5-8. Edited by Yang Qian, Heilongjiang Science and Technology Press, Harbin, China.
- Yang, Q., Liu, P. and Jin, H. 2005. Study on expressed sequence tags (ESTs) of plant disease bio-control microorganisms. In Study on Plant Pest and Diseases Biological Control and Bio-technology, pp. 1-12. Edited by Yang Qian and Yu Ziniu, Heilongjiang Science and Technology Press, Harbin, China.
- Zhang C., Druzhinina, I.S., Kubicek, C.P. and Xu, T. 2005. *Trichoderma* biodiversity in China: Evidence for a North to South distribution of species in East Asia. FEMS Micro. Lett. 251: 251-257.
- Zhao, L. and Zhang, H. 1998. *Trichoderma* and seed biotreatment. J. Microbiol. 18(3): 50-57.

ภาคผนวก ก.

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

MEA: Malt Extract Agar

Malt extract (Powdered)	20 g
Peptone, bacteriological	1 g
Glucose	20 g
Agar	20 g
Distilled water	1,000 ml
Final pH 5.0 -5.5	

2 % MA: 2% Malt Extract Agar

Oxoid malt extract	20 g
Agar	20 g
Distilled water	1,000 ml

Martin's Medium: Peptone –Dextrose –Rose Bengal agar

Agar	15 g
KH ₂ PO ₄	1 g
Mg ₄ .7H ₂ O	0.5 g
Peptone	5 g
Dextrose	10 g
Rose Bengal (1 % in alcohol)	3.3 ml
Distilled water	1,000 ml
Streptomycin	1 g

หมายเหตุ: ใส่ Streptomycin หลังจากหนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ขณะอาหารมีอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

PDA: Potato Dextrose Agar

Potato	200 g
Dextrose or Glucose	20 g

Agar	15 g
Distilled water	1,000 ml

WA 1%: Water agar

Agar	10 g
Distilled water	1,000 ml



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์⁴⁶ การค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การเตรียมสีย้อม

สีย้อม lactophenol (Dhingra and Sinclair, 1987)

เตรียมสีย้อม lactophenol โดยมีส่วนผสมดังนี้

Glycerine	40 กรัม
Lactic acid	20 กรัม
Phenol	20 กรัม
Distilled water	20 กรัม

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายเข้าด้วยกัน จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง

สีย้อม lactophenol – acid fuchsin (Dhingra and Sinclair, 1987)

เตรียมสีย้อม lactophenol – acid fuchsin โดยมีส่วนผสมดังนี้

Glycerin	40 กรัม
Lactic acid	20 กรัม
Phenol	20 กรัม
Distilled water	20 กรัม

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายเข้าด้วยกัน จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง แล้วเติม 1-5 มิลลิลิตรของ 1 เปอร์เซ็นต์ของ acid fuchsin ที่ละลายในน้ำ หรือจนได้สีที่เข้มตามต้องการ และตามด้วย 0-20 มิลลิลิตรของ glacial acetic acid

ภาคผนวก ค

Key to species aggregates of *Trichoderma* (Rifai, 1969)

- A. Conidiophores long and thick, often with sterile hyphal elongation; side branches mostly short but thick, bearing crowded, short and plump phialides; colonies whitish-green to green, generally with compact tufts of conidiophores
- B. Sterile hyphal elongation absent; phialospores globose, hyaline *T. piluliferum*
- Bb. Sterile hyphal elongation present or modified or rarely absent; phialospores not globose; hyaline or green coloured
- C. Phialospores hyaline, small *T. polysporum*
- Cc. Phialospores green, small to large *T. hamatum*
- Aa. Conidiophores and their side branches long and slender, without sterile hyphal elongation; phialides not crowded, rather slender; colonies yellowish, bright, dull to dark green, floccose or with compact conidiospore tufts
- D. Phialospores smooth-walled
- E. Conidiophores with complicated dendroid branching system; phialides quite regularly disposed and almost *Verticillium*-like
- F. Phialospores ellipsoidal or oblong, often appearing angular *T. koningii*
- Ff. Phialospores obovoid, with truncate base; reverse of colonies often discoloured *T. aureoviride*
- Fff. Phialospores globose or subglobose or short obovoid, with length and breadth ratio of less than 1.25 *T. harzianum*
- Ee. Conidiophores with simpler branching systems; phialides irregularly disposed, often arising singly and almost *Cephalosporium*-like

- G. Phialospores large, up to 7 μ long, mostly elliptic ellipsoidal ;
 phialides usually only slightly attenuate at the base.....*T. longibrachiatum*
- Gg. Phialospores smaller, 2.8-4.8 μ long, mostly oblong
 ellipsoidal ; phialides often distinctly attenuate at
 the base ; branching system of conidiophore
 more complicated.....*T. pseudokoningii*
- Dd. Phialospores rough-walled..... *T. viride*



ภาคผนวก ง.

**Key to species of *Trichoderma* section *Longibrachiatum*
(Bissett, 1984)**

- 1a. Conidiophores with side branches relatively long and several times rebranched ; branches often curved or sinuous ; conidia spinulose, roughened or pitted, or if smooth walled then globose and greater than 3.5 μm diam. cf. *T. viride* aggr. sensu Rifai (1969)
- 1b. Conidiophores with side branches short and rarely rebranched ; conidia smooth walled and ellipsoidal to cylindrical.....2
- 2a Phialides arising predominately in false whorls ; intercalary phialides not produced cf. *T. koningii* aggr. sensu Rifai (1969)
- 2b Phialides frequently arising singly , particularly toward the apex of the conidiophore and its branches ; intercalary phialides produced by most strains.....3
- 3a Conidiophore bearing side branched that are commonly rebranched once or twice ; phialides distinctly constricted at the base ; conidia mostly smaller than 4.0 x 2.5 μm4
- 3b Conidiophores very sparingly branched ; phialides nearly cylindrical and hardly or not at all constricted at the base ; conidia mostly larger than 4.0 x 2.5 μm5
- 4a Colonies with conidial areas widely effused and not forming pustules ; conidiation mostly in bluish-green shades and not darkening appreciably in age ; conidia nearly cylindrical and frequently larger than 3.5 x 2.0 μm*T. citrinoviride*
- 4b Colonies with conidial areas widely effused and not forming pustules ; conidiation mostly in bluish-green shades and not darkening appreciably in age ; conidia nearly cylindrical and frequently larger than 3.5 x 2.0 μm*T. koningii*
- 5a Conidia more or less obovoid, variable in size but usually shorter than 5.0 μm*T. longibrachiatum*
- 5b Conidia ellipsoidal, mostly longer than 5.0 μm *T. atroviride*

ภาคผนวก จ.

Key to the section *Trichoderma* (Bissett, 1991a)

- 1a. Conidiatio effuse; conidiophores with few or no lateral branches ; phialides borne in simple terminal verticils, cylindrical to lageniform..... section *Hypocreanum*
- 1b. Conidiatio effuse or fasciculate to postulate ; conidiophores with frequent lateral branches ; phialides mostly lageniform to ampulliform.....2
- 2a. Conidiophore main axes long with short secondary branches, not extensively rebranching ; branches and phialides frequently arising singly section *longibrachiatum*
- 2b. Conidiophores repeatedly rebranching ; branches and phialides paired or verticillate.....3
- 3a. Phialides ampulliform to broadly lageniform, mostly in verticils of 2 or 3 ; conidia with conspicuous, sinuste, winglike or bullate ornamentation.....section *Saturnisporum*
- 3b. Phialides lageniform to subulate, or if ampulliform , then in verticils of up to 7 ; conidia smooth or verrucose.....4
- 4a. Conidiophores and branches relatively broad (main axis to 10 μm wide) ; phialides in verticils of 2-7, ampulliform to lageniform.....section *Pachybasium*
- 4b. Conidiophores and branches narrow and flexuous (main axis to 6 μm wide) ; phialides mostly in verticils of 2 or 3 , lageniform to subulate section *Trichoderma*

ภาคผนวก จ.

Dichotomous key to species in *Trichoderma* section

Pachybasium (Bissett, 1991b)

1. Conidiation entirely effuse, or conidiophores arranged in loosely organized flat pustules or small irregular fascicles ; conidiophores sparingly branched with principal branches most often arising singly or paired2
1. Conidiophores organized in compact, hemispherical to cushion-shaped pustules on MA ; conidiophores usually highly branched with branches 2-4 verticillate.....7
2. Conidiophores arranged in fascicles up to 2 mm in diameter.....3
2. Conidiophores effuse, or loosely arranged in flat pustules.....4
3. Colonies less than 4 cm in diameter after 4 days at 20 °c ; aerial hyphae more than 1.5 µm in diameter ; chlamydospores infrequent *Trichoderma anam. H. gelatinosa* (6)
4. Conidia subglobose to obovoid, smaller than 3.5 x 2.5 µm..... *T. hazianum* (8)
4. Conidia broad ellipsoidal, smaller than 3.5 x 2.5 µm.....5
5. Conidia pale brown..... *T. flavafuscum* (5)
5. Conidia dark green.....6
6. Conidiophores aggregated into flat pustules on MA, usually with sterile apical elongations *T. crassum* (1)
6. Conidiophores entirely effuse, or conidiophores lacking sterile apical elongations *T. virens* (20)
7. Conidiation white to buff.....8
7. Conidiation eventually green to gray9

8. Conidiophore with spiral, sterile apical elongation ; conidia ellipsoidal
.....*T. polysporum* (13)
8. Conidiophores lacking sterile apical elongation ; conidia subglobose..... *T. piluliferum* (12)
9. Conidiophores with conspicuously roughened, spiral, sterile apical elongation ; conidiation
bright greenish yellow or rosy-buff..... *T. croceum*(2)
9. Conidiophores lacking sterile elongation or elongation not roughened ; conidiation in various
green or gray shades..... 10
10. Conidiophores arranged in pustules up to 2 mm in diameter, glaucous to grayish ; and
conidiophore main axis 4.5-7 μm wide over the fertile part
..... *Trichoderma anam. H. semiorbis* (15)
10. Conidiophores pustules larger, usually in definite green shades ; or conidiophore main axis
not exceeding 5.5 μm wide over the fertile part..... 11
11. Conidia consistently less than 3.5 μm long and 2.5 μm wide12
11. Conidia mostly longer and (or) wider.....14
12. Conidia subglobose to broadly obovoid..... *T. harzianum* (8)
12. Conidia ellipsoidal.....13
13. Conidiogenous area bright green to yellow-green, conidiophore main axis branched and
fertile to apex..... *T. minutisporum* (10)
13. Conidiogenous area grey-green, conidiophore main axis with conspicuous spiral sterile apical
elongation.....*T. tomentosum* (19)
14. Colony reverse conspicuously pigmented yellow to reddish brown shades ; conidiophores
main axis very stout, 4-5.6 μm wide at base of sterile elongation.....15
14. Colony reverse colourless to pale dull yellow ; conidiophore main axis usually 3.5-5 μm
wide at base of sterile elongation.....16

15. Conidiophore main axis relatively straight throughout, the upper part unbranched and nonfertile to near to the apex, that is terminated by a single phialide or more often by 2-3 short fertile branches.....*T. fertile* (4)
15. Conidiophore main axis with a spiral, sterile apical elongation , never with fertile branches near the apex.....*T. spirale* (16)
16. Conidia frequently longer than 4.5 μm , often shorter than 3.5 μm17
16. Conidia rarely longer than 4.5 μm , often shorter than 3.5 μm 18
17. Conidiophore main axis with undulate to spiral sterile elongation that is highly branched and anastomosing to within 100 μm of the acute apex.....*T. longipilis* (9)
17. Conidiophore main axis with a straight to flexuous sterile elongation that is sparingly branched with a bluntly rounded apex.....*T. oblongisporum*(11)
18. Conidiophore main axis with straight to flexuous sterile elongation.....19
18. Conidiophore main axis with undulate to coiled or circinate, sterile elongation.....20
19. Conidiogenous pustules bluish green, appearing spiny owing to presence of stiff, javelin-like sterile conidiophore apices.....*T. strigosum* (18)
19. Conidiogenous pustules bluish dull green, appearing hairy owing to presence of very long, straight or flexuous sterile conidiophore apices*T. strictipilis* (17)
20. Conidiogenous pustules bluish green, appearing velvety owing to presence of strongly undulate or hamate, sterile conidiophore apices.....*T. harmatum* (7)
20. Conidiogenous pustules bluish green, surface appearing downy owing to presence of branched, undulate, thin, sterile conidiophore apices.....*T. pubescens* (14)
20. Conidiogenous pustules bluish green, appearing woolly owing to presence of coarse, spiral, conidiophore apices.....*T. spirale*