รายงานโครงการวิจัย

การใช้ประโยชน์จากเอ็นไซม์ของเชื้อจุลินทรีย์เพื่อควบคุมศัตรูพืช

Beneficial of Enzyme from Microorganism for Pest Control

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัย
มัลลิกา แก้ววิเศษ
Mallika Kaewwises

กรมวิชาการเกษตร

ปี พ.ศ. 2565

รายงานโครงการวิจัย

การใช้ประโยชน์จากเอ็นไซม์ของเชื้อจุลินทรีย์เพื่อควบคุมศัตรูพืช

Beneficial of Enzyme from Microorganism for Pest Control

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัย
มัลลิกา แก้ววิเศษ
Mallika Kaewwises

กรมวิชาการเกษตร

ปี พ.ศ. 2565

คำปรารภ

การใช้ประโยชน์จากเอ็นไซม์ของเชื้อจุลินทรีย์เพื่อควบคุมศัตรูพืช ได้มีการศึกษาการผลิตเอ็นไซม์จากเชื้อจุลินทรีย์เพื่อมาใช้ในการกำจัดศัตรูพืชที่มีความปลอดภัยต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อมทดแทนการใช้สารเคมี สินค้าเกษตรปลอดภัย มีคุณภาพ มีตลาดรองรับ สร้างความมั่นคงให้ผู้ผลิต สร้างคุณภาพชีวิตให้ผู้บริโภค ลดมลพิษให้ชุมชน ให้ได้ต้นแบบชีวผลิตภัณฑ์ที่มีศักยภาพในการควบคุมศัตรูพืช

เมื่อสิ้นสุดงานวิจัยนี้ กรมวิชาการเกษตร มีเทคโนโลยี การผลิตเอ็นไซม์ไคติเนสในการควบคุมแมลง เอ็นไซม์ย่อยสลายอะไมเลส เพคติเนส เซลลูเลสจากเชื้อราไตรโครเดอร์มาในการควบคุมโรคพืช สามารถนำไปต่อยอดการผลิตเป็นรูปแบบผลิตภัณฑ์ที่มีความคงตัว สามารถพัฒนาการผลิตในระดับ large scale ซึ่งเป็นแนวทางในการขยายผลสู่การประยุกต์ใช้ประโยชน์ในภาคการเกษตรและอุตสาหกรรม เป็นทางเลือกในการทดแทนการใช้สารเคมี ซึ่งเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม ช่วยลดภาวะโลกร้อน ลดปัญหาการตกค้างของสารเคมีในผลผลิตเกษตร ตลอดจนส่งเสริมให้เกษตรกรมีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้น ส่งเสริมการพัฒนาระบบการเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรแบบยั่งยืน โดยการผลิตสารชีวภาพที่มีความปลอดภัยสูงให้เป็นทางเลือกของเกษตรกรเพื่อทดแทนการใช้สารเคมีเกษตรซึ่งเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตและสภาพแวดล้อม สามารถสร้างความเชื่อมั่นให้กับผู้บริโภคและยังช่วยฟื้นฟู บำรุง รักษาสิ่งแวดล้อมให้คงอยู่ในสภาพที่สมดุลตลอดไป

กรมวิชาการเกษตร

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	5
ผู้วิจัย	6

บทนำ..... 7
บทคัดย่อ..... 8
กิจกรรมที่ 1 เอ็นไซม์ควบคุมแมลง
การทดลองที่ 1.1 การใช้ประโยชน์จากเอ็นไซม์ไคติเนสเพื่อใช้ในการควบคุมหนอนกระทู้ผัก 10
การทดลองที่ 1.2 การทดสอบเอ็นไซม์ไคติเนสในภาคสนาม 31

กิจกรรมที่ 2 การผลิตเอ็นไซม์ย่อยสลายที่มีประโยชน์จากเชื้อราไตรโคเดอร์มาเพื่อใช้ในการควบคุมโรครากเน่าโคนเน่า
การทดลองที่ 2.1 การผลิตเอ็นไซม์ย่อยสลายที่มีประโยชน์จากเชื้อราไตรโคเดอร์มาเพื่อใช้ในการควบคุมโรคพืช 42
การทดลองที่ 2.2การผลิตเอ็นไซม์ย่อยสลายที่มีประโยชน์จากเชื้อรา *Trichoderma* spp. เพื่อใช้ในการควบคุมโรคพืช 59
การทดลองที่ 2.3 ..การทดสอบประสิทธิภาพของเอ็นไซม์ในการกระตุ้นความต้านทานเชื้อราสาเหตุโรคที่เกิดจาก Phytophthora ของพริก 68

บทสรุปและข้อเสนอแนะ..... 76
เอกสารอ้างอิง..... 77
ภาคผนวก 83

กรมวิชาการเกษตร

กิตติกรรมประกาศ

รายงานโครงการวิจัยการใช้ประโยชน์จากเอ็นไซม์ของเชื้อจุลินทรีย์เพื่อควบคุมศัตรูพืช ปีงบประมาณ 2562-2564 ฉบับนี้ สำเร็จได้ด้วยความร่วมมือจากบุคคลหลายท่าน ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) ที่สนับสนุนงบประมาณในการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณนางขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์ รักษาการผู้ทรงคุณวุฒิด้านอารักขาพืช ผู้อำนวยการแผนวิจัยการอนุรักษ์และใช้ประโยชน์จากความหลากหลายทางชีวภาพของพืชและจุลินทรีย์เพื่อเพิ่มมูลค่าและพัฒนานวัตกรรม ที่ให้คำปรึกษาข้อเสนอแนะโครงการ ตลอดจนการจัดทำรายงานฉบับนี้

ขอขอบคุณนักวิจัยทุกท่านที่ให้ความร่วมมือส่งผลการทดลองให้หัวหน้าโครงการวิจัย

ขอขอบคุณคุณอัจฉรา ซอวงศ์ นักวิชาการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ ที่ช่วยจัดพิมพ์เอกสาร

หวังอย่างยิ่งว่ารายงานฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ในการพัฒนางานวิจัยด้านการเกษตรของกรมวิชาการเกษตร และของประเทศต่อไป

กรมวิชาการเกษตร

คณะผู้วิจัย

มัลลิกา แก้ววิเศษ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
พยุงศักดิ์ รวยอารี สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ภรณี สว่างศรี สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
วรารัตน์ ศรีประพัฒน์ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
อิศเรศ เทียนทัด สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
ทัศนาพร ทัศคร สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
จีรภา ปัญญาศิริ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

กรมวิชาการเกษตร

บทนำ

ประเทศไทยมีทรัพยากรธรรมชาติที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตไม่ว่าจะเป็นพืช สัตว์ แม้กระทั่งสิ่งมีชีวิตเล็กๆ อย่างจุลินทรีย์ ปัจจุบันจึงมีการศึกษา คิดค้น และพัฒนาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เป็นประโยชน์กับมนุษย์ในด้านการแพทย์ อุตสาหกรรมอาหาร การเกษตร สิ่งแวดล้อม และพลังงานอย่างแพร่หลาย การนำเทคโนโลยีชีวภาพซึ่งเป็นเทคนิคขั้นสูงมาช่วยในการพัฒนากระบวนการผลิตสารสำคัญทางชีวภาพ เช่น การทำให้เกิดการกลายพันธุ์ การโคลนยีน การผลิตเอ็นไซม์ เพื่อนำสารสำคัญเหล่านั้นมาประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ใน

ด้านการเกษตร โดยเฉพาะการทำเกษตรอินทรีย์ และยังเป็นแนวทางในการหาสารทดแทนสารเคมีเกษตรเพื่อลดปัญหาสารพิษตกค้างในผลผลิตและสิ่งแวดล้อม

กรมวิชาการเกษตร มีการศึกษาจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์หลากหลายชนิดและสายพันธุ์ จุลินทรีย์บางชนิดสามารถนำไปใช้ได้โดยตรง หรือผ่านกระบวนการเพื่อให้ได้เป็นผลิตภัณฑ์ก่อนนำไปใช้ประโยชน์ จากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่า มีการศึกษาการใช้เอ็นไซม์เพื่อใช้ในการควบคุมศัตรูพืชทั้งแมลงและเชื้อราสาเหตุโรคพืช เช่น ไคติเนส เซลลูเลส อะไมเลส และกลูคาเนส อย่างไรก็ตามจุลินทรีย์และผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์เหล่านี้ ยังต้องมีการศึกษาและทดสอบโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพเพื่อให้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้จริง เช่น การปรับเปลี่ยนวัสดุที่ใช้เพื่อให้ลดต้นทุนในการผลิตหรือพัฒนาวิธีการเพื่อทำให้มีการผลิตได้มากขึ้น การพัฒนากระบวนการผลิตเอ็นไซม์และสารชีวภาพจากจุลินทรีย์ให้ได้ปริมาณมากเพียงพอต่อการนำไปใช้ในสภาพไร่นาได้ รวมทั้งมีเทคนิคหรือกระบวนการในการผลิตสารต่างๆที่เป็นประโยชน์ในทางการเกษตรให้มีศักยภาพ ทั้งในเชิงวิชาการและเชิงพาณิชย์เพื่อการนำสารเหล่านี้ไปใช้ประโยชน์อย่างเต็มประสิทธิภาพในอนาคต

กรมวิชาการเกษตร

บทคัดย่อ

เอ็นไซม์ไคติเนสเพื่อการควบคุมหนอนกระทู้ผัก (*Spodoptera litura*) ถูกผลิตจากเชื้อราเมตาไรเซียมและบิววาเลีย ในสภาพเขย่าเชื้อรา 3, 5 และ 7 วัน โดยใช้ไคติน ชนิด A และ ชนิด B ที่ความเข้มข้น 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ โดยเมื่อให้ไคติเนสกับหนอนกระทู้ผักพบว่าวิธีที่มีประสิทธิภาพดีคือเอ็นไซม์ที่ผลิตจากเชื้อเมตาไรเซียมที่เตรียมเชื้อโดยการเขย่า 3 วัน ขนาดและน้ำหนักเฉลี่ยของหนอนกระทู้ผักที่ได้รับไคติเนจะมีขนาดลำตัวที่เล็กกว่าและน้ำหนักน้อยกว่าหนอนกระทู้ผักชุดควบคุม เมื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์ต้นแบบและนำไปทดสอบประสิทธิภาพกับหนอนกระทู้ผัก พบว่าความเข้มข้นของเอ็นไซม์ที่ทดสอบทำให้หนอนตายไม่ถึง 50% ซึ่งอาจเกิดเนื่องจากการทดลองครั้งนี้มีข้อจำกัดในการผลิตเอ็นไซม์ นอกจากนี้เมื่อทำการทดสอบในภาคสนามในแปลงคะน้าโดยทดสอบเปรียบเทียบกับการใช้สารฆ่าแมลงทางการค้าคือ Emamectin และผลิตภัณฑ์ NPV พบว่าสารฆ่าแมลงมีประสิทธิภาพดีที่สุด รองลงมาเป็น NPV และไคติเนส ตามลำดับ การผลิตเอนไซม์เพื่อการย่อยสลายจำนวน 3

ชนิด ได้แก่ เซลลูเลส อะไมเลส และเพคติเนสจากเชื้อราไตรโคเดอร์มา ได้ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อการควบคุมโรคพืช ซึ่งไตรโคเดอร์มาไอโซเลต T14 นอกจากนี้การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความสามารถเชื้อราไตรโคเดอร์มาจำนวน 29 ไอโซเลตในการสร้างเอ็นไซม์ย่อยสลาย เซลลูเลส, อะไมเลส และเพคติเนส ในอาหารเหลว carboxy methyl cellulose (CMC), starch hydrolysed medium และ Czapek medium +1% เพคติน ตามลำดับ ต่อการยับยั้งเชื้อราไฟทอปธอราโดยวิธี Dual culture plate ในสภาพห้องปฏิบัติการ จากการทดลองพบว่าเชื้อราไตรโคเดอร์มาไอโซเลต TC14 สามารถสร้างเอ็นไซม์เซลลูเลสได้ในระดับสูงที่สุด จากนั้นจึงทำการคัดเลือกเชื้อราไตรโคเดอร์ม่าไอโซเลท TC14 มาใช้ในการผลิตเอ็นไซม์เซลลูเลสในระดับขวดเขย่า และผลิตผงเอ็นไซม์โดยวิธี freeze-dried เพื่อนำผงเอ็นไซม์ไปใช้ในการทดสอบการควบคุมโรคพืชต่อไป ผลการทดลองพบว่าเชื้อราไตรโคเดอร์มาที่คัดเลือกและแยกได้มีศักยภาพในการสร้างเอ็นไซม์ได้ทั้งสามชนิด เพียงแต่ระดับความสามารถในการสร้างเอ็นไซม์ย่อยสลายแตกต่างกันและมีศักยภาพในการผลิตเป็นเอ็นไซม์ได้ เมื่อทดสอบความสามารถในการควบคุมโรคบนใบพริกของเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อไตรโคเดอร์ม่า ไอโซเลท TC14 ที่ระดับความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร 3 กรัมต่อลิตร และ 5 กรัมต่อลิตร พบว่าเอ็นไซม์มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืช

กรมวิชาการเกษตร

Abstract

The chitinase enzymes for controlling of cutworm (*Spodoptera litura*) were produced from *Metarhizium* spp and *Beauvaria* sp. under shaking conditions for 3, 5 and 5 days by using 1% and 2 % of chitin A and B. After treating cutworm with chitinase, the results indicated the chitinase that produced from *Metarhizium* spp. under shaking conditions for 3 days was most effective method for controlling cutworm. The *average* body size and weight of the chitinase treated cutworms were significantly lower than in the *controls*. The chitinase enzyme product prototype was then developed and the results showed that cutworms died less than 50% which probably because the limited of produce capability. The effectiveness of chitinase compared with the commercial pesticide, Emamectin and NPV, for controlling of cutworm in kale plot showed that the most effective treatment for controlling cutworm were Emamectin, NPV and chitinase, respectively. The Trichoderma-producing degrading enzymes including cellulase, amylase and pectinase in controlling plant diseases were developed. Among all strains, the most effective in degradation of cellulose, amylose and pectin production was the TC14. Furthermore, this study also investigated cell-wall degrading enzyme activities, namely

cellulase, amylase in starch hydrolysed medium and pectinase in Czapek medium+1% pectin) in *Trichoderma* isolates for controlling activity of *Phytopththora* sp. causing root rot disease using dual culture method. The TC14 showed presence of highest amount of cellulase enzyme among other *Trichoderma* isolates studied in dual culture plate technique. Then, *Trichoderma* TC14 was used for powder-derived cellulase enzyme production by shake flask-cultured technique using Freeze-dried method. *Trichoderma*-producing cellulase shown in our experiment will further be used for plant disease control. The results indicated that Tc14 may be showed the ability in inhibiting of the pathogenic fungi and can be developed to further exploitation in plant disease control. In addition, the effectiveness of cellulase enzyme from *Trichoderma* spp. at concentration of 1, 3 and 5 gram per liter for controlling root-rot disease in chili was studied. The result show that cellulase was effective for controlling plant disease.

กรมวิชาการเกษตร

กิจกรรมที่ 1 เอ็นไซม์ควบคุมแมลง

การทดลองที่ 1.1 การใช้ประโยชน์จากเอ็นไซม์ไคติเนสเพื่อใช้ในการควบคุมหนอนกระทู้ผัก
Beneficial of chitinase for the control of cutworm

มัลลิกา แก้ววิเศษ อิศเรศ เทียนทัด
วรารัตน์ ศรีประพัฒน์ จีรภา ปัญญูศิริ

คำสำคัญ

ไคติเนส เมตาไรเซียม บิววาเลีย ไคติเนส หนอนกระทู้ผัก
chitinase, *Metarhizium sp*, *Beuvaria sp*., cutworm (*Spodoptera litura*)

บทคัดย่อ

การใช้ประโยชน์จากเอ็นไซม์ไคติเนสเพื่อใช้ในการควบคุมหนอนกระทู้ผัก (*Spodoptera litura*) ได้ทำการทดลองผลิตเอ็นไซม์ไคติเนสจากเชื้อราเมตาไรเซียม 2 ไอโซเลต และบิววาเลีย 1 ไอโซเลต โดยใช้ไคติน 2 ชนิด คือ ชนิด A และ ชนิด B ที่ความเข้มข้น 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ เวลาในการเขย่าเชื้อรา 3, 5 และ 7 วัน นำไคติเนสที่อยู่ในรูปของเหลวเข้าเครื่อง Freeze dryer วัดค่ากิจกรรมของเอ็นไซม์ แล้วนำไปทดสอบประสิทธิภาพของไคติเนสกับหนอนกระทู้ผัก โดยผสมไคติเนสในอาหารเทียมให้กับหนอนกระทู้ผักกิน เปรียบเทียบกับวิธีควบคุมโดยใช้น้ำกลั่นกับหนอนกระทู้ผัก เมื่อทำการวัดขนาดลำตัวและชั่งน้ำหนักของหนอนกระทู้ผักหลังจากทำการทดสอบแล้ว 1 สัปดาห์ พบว่าขนาดและน้ำหนักเฉลี่ยของหนอนกระทู้ผักจากวิธีควบคุมจะมีขนาดลำตัวที่ใหญ่กว่าและน้ำหนักมากกว่าหนอนกระทู้ผักที่ได้รับไคติเนส พบว่าหนอนที่ได้รับเอ็นไซม์ไคติเนสจะมีเปอร์เซ นต์การตายสูงกว่าวิธีควบคุม วิธีที่มีประสิทธิภาพดีคือเอ็นไซม์ที่ผลิตจากเชื้อเมตาไรเซียม ที่เตรียมเชื้อโดยการเขย่า

3 วัน โดยมีความเข้มข้นของไคติน 1 และ 2 % จะให้ค่าไม่ต่างกัน ดังนั้นในการเตรียมรูปแบบเอ็นไซม์จึงเลือกผลิตเอ็นไซม์จากเชื้อเมตาไรเซียม โดยใช้ความเข้มข้นของไคติน 1% แล้วผสมผงเอ็นไซม์กับสารปรุงแต่ง (additive) เพื่อให้เอ็นไซม์มีประสิทธิภาพในการคงตัว ได้แก่ Aluminium silicate และ Kaoline นำไปทดสอบประสิทธิภาพกับหนอนกระทู้ผักวัยสอง นำไปหาค่า LC50 ความเข้มข้นของเอ็นไซม์ไคติเนสที่ทำให้หนอนตาย 50% พบว่าความเข้มข้นของเอ็นไซม์ที่ทดสอบทำให้หนอนตายไม่ถึง 50% ทั้งนี้เนื่องจากการทดลองครั้งนี้มีข้อจำกัดในการผลิตเอ็นไซม์ ทำให้ไม่สามารถผลิตเอ็นไซม์จำนวนมากๆ ได้ จึงทำให้ไม่สามารถเพิ่มความเข้มข้นของเอ็นไซม์ได้

Abstact :

The useful of chitnase enzyme for cutworm (*Spodoptera litura*) was produced chitinase enzyme from Metarhizium spp 2 isolate and Beauvaria sp 1 isolate. There were 1 and 2 % of 2 chitin : A and B were added in PDB for checking 3, 5 and 5 days for produce chitnase enzyme. Then enzyme was brought in Freeze dryer and activity of enzyme was analyzed. Next enzyme was tested with 2 instar of cutworm. The data of size, weight and motility were statistic analyzed. The results showed that size and weight of cutworms that got enzyme were lower than cutworms from control method. The effective method was chitinse that produced from Metarhizium, added 1% of chitin and checked 3 days. For prepare form of enzyme, Aluminium silicate and Kaoline were added with chitinase. Then LC50 was conducted. The results showed that cutwoms died less that 50%. It probably there was limited of produce enzyme.

กรมวิชาการเกษตร

คำนำ

การศึกษาเอ็นไซน์ไคติเนสได้รับความสนใจมากเนื่องจากสามารถใช้ประโยชน์ได้กว้างขวาง เอนไซม์ไคติเนสสามารถย่อยไคติน ซึ่งเป็นส่วนประกอบของโครงสร้างแมลง โดยมากพบที่เปลือกหุ้ม (cuticle) และ peritrophic membrane ในลำไส้แมลง โดยปกติแมลงจะสร้างเอนไซม์ไคติเนสเพื่อใช้ในการลอกคราบ โดยจะสร้างในปริมาณที่พอดีกับความต้องการในขณะนั้น ดังนั้นหากแมลงได้รับเอนไซม์นี้ในปริมาณมากเกินความต้องการในช่วงที่ไม่ต้องการเอนไซม์ไคติเนสอาจมีผลต่อการเจริญของแมลงและอาจทำให้แมลงตายได้ จึงได้มีการศึกษาการสกัดเอนไซม์ไคติเนสจากจุลินทรีย์เพื่อที่จะนำมาใช้ในการควบคุมแมลงอีกทางหนึ่ง นอกเหนือจากการใช้เชื้อจุลินทรีย์โดยตรง ซึ่งอาจจะมีข้อจำกัดในการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในการนำไปใช้และการขยายต่อ

ไคติเนสเป็นเอนไซม์ที่ผลิตได้จากเชื้อรา ทั้งเชื้อราเขียว Metarhizium ราขาว Beavaria และราอื่นๆ รวมทั้งผลิตได้จากเชื้อแบคทีเรีย ไส้เดือนฝอย และไวรัสที่ทำให้เกิดโรคกับแมลง (Karthik, 2014) เอนไซม์นี้มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดศัตรูพืช เช่น แมลง ไส้เดือนฝอยและเชื้อรา (Sasai and Manocha, 1993) ในแมลงจะมีผลต่อขบวนการลอกคราบโดยกลไกการเข้าทำลายแมลงของเอนไซม์ไคติเนสเกิดขึ้นเมื่อแมลงกินชิ้นส่วนของพืชที่มีเอนไซม์ไคติเนสเข้าไปในทางเดินอาหาร เอนไซม์ทำลายเยื่อบุผนังทางเดินอาหาร เนื่องจากผนังทางเดินอาหารมีไคติเนสเป็นส่วนประกอบ (ทิพย์วดี, 2549) มีรายงานในการนำไคติเนสไปทดสอบกับแมลง

ศัตรูพืชหลายชนิด ซึ่งส่วนมากจะเป็นพวกหนอนชนิดต่างๆ พบว่าหนอนที่ได้รับไคติเนสจะไม่เจริญเติบโต ขนาดลำตัว น้ำหนักลดลง เช่นหนอนกระทู้ต่างๆ Spodoptera frugiperda, S. littoralis, S. exigua, หนอนเจาะสมอฝ้าย Heliothis virescens และหนอนกินใบยาสูบ Manduca sexta นอกจากนั้นยังมีผลกับเพลี้ยอ่อน (Myzus pericae) โดยลดการเจริญเติบโตและลดประชากรรุ่นลูกของเพลี้ยอ่อน (Kramer and Muthukrishnan, 1997) ในผีเสื้อข้าวสาร (Corcyra cephalonica) ได้มีการทดสอบเอนไซม์ไคติเนสที่สกัดได้จากเชื้อรา เช่น Trichoderma viridae Metharhizium anisopliae พบว่ามีผลในการยับยั้งการกินอาหารและยับยั้งการเจริญเติบโตของผีเสื้อข้าวสาร (Vijayakumar et al., 2017)ในการศึกษาประสิทธิภาพของเอนไซม์ไคติเนสต่อแมลง Wu et al. (2010) ได้ศึกษาการประเมินประสิทธิภาพของเอนไซม์ไคติเนสจากเชื้อ Metarhizium anisopliae ในรูปสารกำจัดแมลงกับหนอนใยผัก (Plutella xylostella) พบว่าหนอนจะลดการกินลง น้ำหนักตัวจะลดลง การเข้าดักแด้จะลดลง และเพิ่มอัตราการตายในช่วงหนอนและดักแด้ Binod et al. (2007) ศึกษาการประเมินประสิทธิภาพของเอนไซม์ไคติเนสจากเชื้อ Trichoderma harianum ต่อหนอนเจาะสมอฝ้าย (Helicoverpa armigera) พบว่าอัตราการกินของหนอนจะน้อยลง น้ำหนักตัวจะลดลง การเข้าดักแด้จะลดลง และเพิ่มอัตราการตายในช่วงหนอนและดักแด้

ในการผลิตเอนไซม์ไคติเนส จะมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องหลายอย่าง เช่น pH อุณหภูมิ ไคติน อายุของเชื้อ แล้วยังมีแหล่งคาร์บอนอื่นๆ เช่น glucosamine N-acetylglucosamine Chitobiose Chitooligosaccaride การสังเคราะห์ extracellular chitinase ใน Metarhizium จะมีกลไกชักนำที่ขึ้นกับ N-acetylglucosamine เชื้อ Metarhizium จะผลิตไคติเนส ช่วงที่เข้าทำลายผนังของแมลง ช่วงนั้นเอนไซม์จะมีผลผลิตของไคตินเป็นจำนวนมาก เชื้อราจะเจริญในช่วง pH กว้างๆ ตั้งแต่ 2.5-10.5 การผลิตเอนไซม์จะใช้เวลา 20-40 ชั่วโมง (Rustiguel et al., 2012) เนื่องจากเอนไซม์จะเสื่อมสภาพได้ง่าย ดังนั้นจึงมีการนำสารปรุงแต่งเข้ามาผสมกับเอ็นไซม์เพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์เอนไซม์ให้มีสภาพที่คงทนต่อสิ่งแวดล้อมต่างๆ ได้ดีขึ้น เหมาะที่จะนำไปใช้ในแปลงเกษตรกรได้

วิธีดำเนินการ :

อุปกรณ์

-ตู้ควบคุมระดับความเย็นที่ 4, และ -20 องศาเซลเซียส
- เครื่อง freeze dry
- เครื่อง centrifuge
- vortex mixer
- water bath
- หม้อนึ่งความดัน
- ไมโครปิเปต ขนาด 2 µl, 20 µl, 200 µl และ 1000 µl
- เครื่อง incubate shaker
- ตู้ laminar flow
- เครื่องกวนสาร
-. ตู้ไมโครเวฟ
- เครื่อง spectrophotometer
- เครื่องชั่งชนิดละเอียด

กรมวิชาการเกษตร

- ตู้อบ

วิธีการ

1. การศึกษาการผลิตเอ็นไซม์ไคติเนส

1.1 วางแผนการทดลองแบบ Factorial in CRD มี 2 ปัจจัย (3x4 +1 กรรมวิธีควบคุม (control)) 4 ซ้ำ

ปัจจัยที่ 1) เชื้อรา 3 ไอโซเลต ได้แก่ เมตาไรเซียม 2 ไอโซเลต บิววาเรีย 1 ไอโซเลต

ปัจจัยที่ 2) ไคตินที่จำหน่ายเป็นการค้า 2 ชนิด ไคติน A (sigma) เพราะเป็นชนิดที่เคยผ่านการทดสอบมาแล้ว และ ไคติน B (Hi media) แบ่งเป็น 4 ระดับ ดังนี้

ไคติน A 1%

ไคติน A 2%

ไคติน B 1%

ไคติน B 2%

มีทั้งหมด 13 กรรมวิธีดังนี้

1.เมตาไรเซียม (Birdo) + ไคติน A 1%

2.เมตาไรเซียม (Birdo) + ไคติน A 2%

3.เมตาไรเซียม (Birdo) + ไคติน B 1%

4.เมตาไรเซียม (Birdo) + ไคติน B 2%

5.เมตาไรเซียม (Biotech) + ไคติน A 1%

6.เมตาไรเซียม (Biotech) + ไคติน A 2%

7.เมตาไรเซียม (Biotech) + ไคติน B 1%

8.เมตาไรเซียม (Biotech) + ไคติน B 2%

9.บิวเวอร์เรีย (Biotech) + ไคติน A 1%

10.บิวเวอร์เรีย (Biotech) + ไคติน A 2%

11.บิวเวอร์เรีย (Biotech) + ไคติน B 1%

12.บิวเวอร์เรีย (Biotech) + ไคติน B 2%

13.น้ำกลั่น

1.2 การเตรียมเชื้อราที่สามารถผลิตเอ็นไซม์ไคติเนส

1.2.1 เตรียมเชื้อราทั้งหมด 3 ตัวอย่าง คือ 1) เชื้อเมตาไรเซียม (สทช- Birdo)
2) เชื้อเมตาไรเซียม (สวทช-Biotech) 3) เชื้อบิววาเรีย (สวทช- Biotech)

1.2.2 นำเชื้อรามาเพิ่มปริมาณในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

1.2.3 เลือกโคโลนีเดี่ยวมาขยายเพื่อให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์

1.2.4 นำเชื้อที่บริสุทธิ์มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ประมาณ 7 วัน จนสร้างสปอร์ เก็บสปอร์ของเชื้อราไว้ในน้ำกลั่น

1.2.5 นับสปอร์ของเชื้อรา ด้วย heamacytometer เตรียม stock ให้ได้ 10^7 สปอร์/มล.

1.2.6 ใส่สปอร์ของเชื้อราแต่ละไอโซเลต 10^7 สปอร์/ มล. ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB 10

กรมวิชาการเกษตร

มล. ใน Flask ขนาด 250 มล. แล้วเติม ไคติน ตามกรรมวิธี ที่ความเร็วรอบ 180 rpm อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

1.2.7 วัด activity ของเอ็นไซม์ไคติเนสแต่ละตัวอย่าง

1.3 การทดสอบประสิทธิภาพของไคติเนสกับหนอนผีเสื้อ

ทำการทดสอบประสิทธิภาพของไคติเนสทั้ง 12 สูตรโดยเปรียบเทียบกับวิธีควบคุมโดยใช้น้ำกลั่น ในช่วงการผลิตวันที่ 3, 5, 7 โดยนำมาทดสอบกับหนอนกระทู้ผัก โดยผสมไคติเนสในอาหารเทียมให้กับหนอนกระทู้ผักกิน ใช้หนอน 10 ตัวต่อซ้ำ บันทึกเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้ผักทุก 24 ชม.

2. การศึกษารูปแบบสารเอ็นไซม์ไคติเนสเพื่อใช้ประโยชน์ในการกำจัดหนอนกระทู้ผัก

2.1. วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 13 กรรมวิธี 4 ซ้ำ

1. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินA 0.1 กรัม + Aluminium silicate 0.05 g
2. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินA 0.1 กรัม + Aluminium silicate 0.1 g
3. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินA 0.1 กรัม + Kaoline 0.10 g
4. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินA 0.1 กรัม+ Kaoline 0.20 g
5. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินA 0.1 กรัม
6. เอ็นไซม์ไคติเนสจากไคตินAในรูปของเหลว
7. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินB 0.1 กรัม + Aluminium silicate 0.05 g
8. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินB 0.1 กรัม + Aluminium silicate 0.1 g
9. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินB 0.1 กรัม + Kaoline 0.10 g
10. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินB 0.1 กรัม+ Kaoline 0.20 g
11. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินB 0.1 กรัม
12. เอ็นไซม์ไคติเนสจากไคตินBในรูปของเหลว
13. น้ำกลั่น (วิธีควบคุม)

2.2 การเตรียมรูปแบบเอ็นไซม์

2.2.1 เลือกสูตรการผลิตไคติเนสที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดหนอนกระทู้ผักจากการทดลองในปีที่ผ่านมา พบว่าเอ็นไซม์ไคติเนสที่ผลิตจาก เมตาไรเซียม (1) ผสมกับไคติน A 1% และ เอ็นไซม์ไคติเนสที่ผลิตจากเมตาไรเซียม (1) ผสมกับไคติน B 1% จะมีประสิทธิภาพดีกว่าสูตรอื่นๆ จึงเลือกทั้งสองสูตรนี้มาทำการทดลองต่อไป

2.2.2 เตรียมเอ็นไซม์ในรูปของเหลว โดยเตรียมสารไคติเนส ตามกรรมวิธีใส่สปอร์ของเชื้อรา 10^7 สปอร์/ มล. ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB 100 มล. ใน Flask ขนาด 250 มล. แล้วเติม ไคติน เข้าเครื่องเขย่า ที่ความเร็วรอบ 180 rpm อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

2.2.3 เตรียมเอ็นไซม์ในรูปผง โดยทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง (freeze-drying)

2.2.4 ผสมผงเอ็นไซม์กับสารปรุงแต่ง (additive) Aluminium silicate และ Kaoline เพื่อให้เอ็นไซม์มีประสิทธิภาพในการคงตัว

2.2.5 ทำการทดสอบเอ็นไซม์รูปแบบต่างๆ กับหนอนกระทู้ผักวัยสอง

กรมวิชาการเกษตร

3. การหาค่า Lethal Concentration (LC 50) ของเอ็นไซม์ไคติเนส โดยเลือกรูปแบบที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดกับหนอนกระทู้ผัก

3.1 หาค่า LC 50 โดยทดสอบกับเอ็นไซม์ไคติเนสที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อให้ทราบค่าความเข้มข้นที่ทำให้หนอนกระทู้ผักตาย 50% โดยดูเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้ผัก

3.2 วิเคราะห์หาค่า LC 50 เพื่อหาค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมไปใช้ในการทดลองต่อไป

- เวลาและสถานที่

เวลา : ตุลาคม 2561 -กันยายน 2563

สถานที่ทำการทดลอง : สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การศึกษาการผลิตเอ็นไซม์ไคติเนส

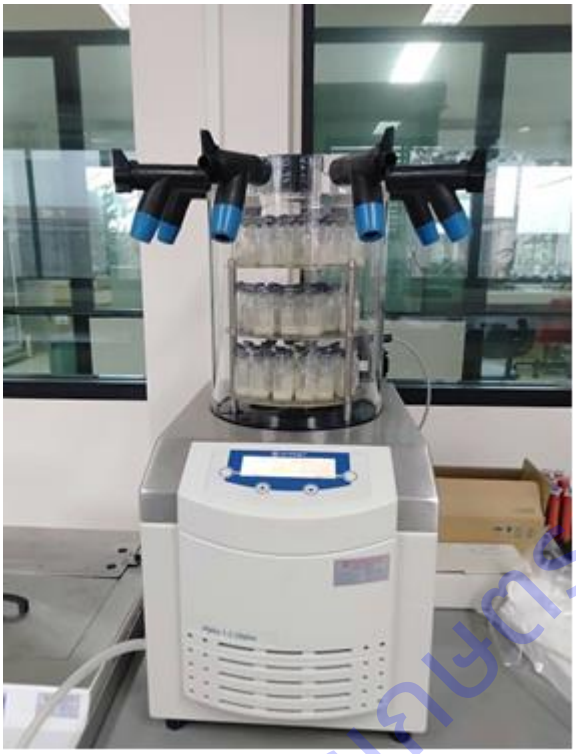
ทำการผลิตเอ็นไซม์ไคติเนสจากเชื้อราเมตาไรเซียม 2 ไอโซเลต และบิววาเลีย 1 ไอโซเลต โดยใช้ไคติน 2 ชนิด คือ ชนิด A และ ชนิด B ที่ความเข้มข้น 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ รวมกรรมวิธีที่ผลิตไคติเนส 12 กรรมวิธี นำไคติเนสที่อยู่ในรูปของเหลวเข้าเครื่อง Freeze dryer ทำให้แห้ง เพื่อที่จะนำไปใช้ทดสอบกับหนอนกระทู้ผัก

ภาพที่ 1 ไคติเนสที่เตรียมจากทั้ง 12 กรรมวิธี

1. เมตาไรเซียม (1) + ไคติน A 1%
2. เมตาไรเซียม (1) + ไคติน A 2%
3. เมตาไรเซียม (1) + ไคติน B 1%
4. เมตาไรเซียม (1) + ไคติน B 2%
5. เมตาไรเซียม (2) + ไคติน A 1%
6. เมตาไรเซียม (2) + ไคติน A 2%
7. เมตาไรเซียม (2) + ไคติน B 1%
8. เมตาไรเซียม (2) + ไคติน B 2%
9. บิวเวอร์เรีย (1) + ไคติน A 1%
10. บิวเวอร์เรีย (1) + ไคติน A 2%
11. บิวเวอร์เรีย (1) + ไคติน B 1%

กรมวิชาการเกษตร

12. บิวเวอร์เรีย (1) + ไคติน B 2%



ภาพที่ 2 การทำไคติเนสที่ผลิตจากกรรมวิธีต่างๆ ให้แห้งโดยนำเข้าเครื่อง freeze dry

ทำการทดสอบเบื้องต้นในเดือนมีนาคม โดยเตรียมไคติเนสที่เขย่าไว้ 3 วัน และชั่งน้ำหนักไคติเนสผสมกับน้ำกลั่นในอัตรา 0.01 กรัม /น้ำ 100 ul ผลการทดสอบประสิทธิภาพของไคติเนสทั้ง 12 สูตรโดยเปรียบเทียบกับวิธีควบคุมโดยใช้น้ำกลั่น เมื่อนำมาทดสอบกับหนอนกระทู้ผัก โดยผสมไคติเนสในอาหารเทียมให้กับหนอนกระทู้ผักกิน ใช้หนอน 10 ตัวต่อซ้ำ พบว่าขนาดลำตัวของหนอนที่ได้รับเอ็นไซม์ไคติเนส ขนาดลำตัวโดยเฉลี่ยจะเล็กกว่าหนอนที่ไม่ได้รับเอ็นไซม์ไคติเนส โดยหนอนจากวิธีควบคุมบางตัว มีความยาวลำตัว 3 เซนติเมตร น้ำหนัก 0.72 กรัม ส่วนหนอนที่ได้รับเอ็นไซม์ไคติเนสบางตัวมีความยาว 1 เซนติเมตร น้ำหนัก 0.027 กรัม (ภาพที่ 3)

กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 3 เปรียบเทียบขนาดหนอนกระทู้ผักที่ไม่ได้รับเอ็นไซม์ไคติเนส (ตัวบน) กับหนอนกระทู้ผักที่ได้รับเอ็นไซม์ไคติเนส-วิธีควบคุม (ตัวล่าง)

เมื่อทำการวัดขนาดลำตัวและชั่งน้ำหนักของหนอนกระทู้ผักหลังจากทำการทดสอบแล้ว 1 สัปดาห์ พบว่าขนาดและน้ำหนักเฉลี่ยของหนอนกระทู้ผักจากวิธีควบคุมจะมีขนาดลำตัวที่ใหญ่กว่าและน้ำหนักมากกว่าหนอนกระทู้ผักที่ได้รับไคติเนส ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงความยาวและน้ำหนักเฉลี่ยของหนอนกระทู้ผัก 20 ตัว ที่ได้รับเอ็นไซม์ไคติเนสไปแล้ว 1 สัปดาห์ ในเดือนมีนาคม 2562

กรรมวิธี	ความยาวเฉลี่ยหนอนกระทู้ผัก (เซนติเมตร)	น้ำหนักเฉลี่ยหนอนกระทู้ผัก (กรัม)
1.เมตาไรเซียม (1) + ไคติน A 1%	2.13	0.29
2.เมตาไรเซียม (1) + ไคติน A 2%	1.83	0.17
3.เมตาไรเซียม (1) + ไคติน B 1%	2.13	0.28
4.เมตาไรเซียม (1) + ไคติน B 2%	1.85	0.25
5.เมตาไรเซียม (2) + ไคติน A 1%	1.73	0.26
6.เมตาไรเซียม (2) + ไคติน A 2%	1.95	0.19
7.เมตาไรเซียม (2) + ไคติน B 1%	1.93	0.24
8.เมตาไรเซียม (2) + ไคติน B 2%	1.88	0.23
9.บิวเวอร์เรีย (1) + ไคติน A 1%	1.95	0.21
10.บิวเวอร์เรีย (1) + ไคติน A 2%	1.90	0.25
11.บิวเวอร์เรีย (1) + ไคติน B 1%	2.05	0.28
12.บิวเวอร์เรีย (1) + ไคติน B 2%	1.70	0.19
วิธีควบคุม	2.15	0.30

หลังจากให้หนอนกินอาหารที่มีเอ็นไซม์ปนอยู่ในอาหารเทียมแล้ว ทำการเช็คจำนวนหนอนที่ตายทุกวัน พบว่าหนอนจะตายมากหลังจากได้รับเชื้อ 10-15 วัน และหนอนบางตัวจะตายในระยะดักแด้ ไม่สามารถออกเป็นผีเสื้อได้ ซึ่งเปอร์เซ็นต์การตายสูงสุด 55 % เมื่อหนอนได้รับเอ็นไซม์ไคติเนสที่ผลิตจากเชื้อเมตาไรเซียม (1) กับ ไคติน A 2% ซึ่งค่าที่ได้ค่อยข้างแปรปรวน เนื่องจากไม่ได้มีการวัด activity ของเอ็นไซม์ไคติเนสก่อนที่จะทำการทดสอบกับหนอน เพราะอยู่ในช่วงที่กำลังรอชุดทดสอบ chitinase assay

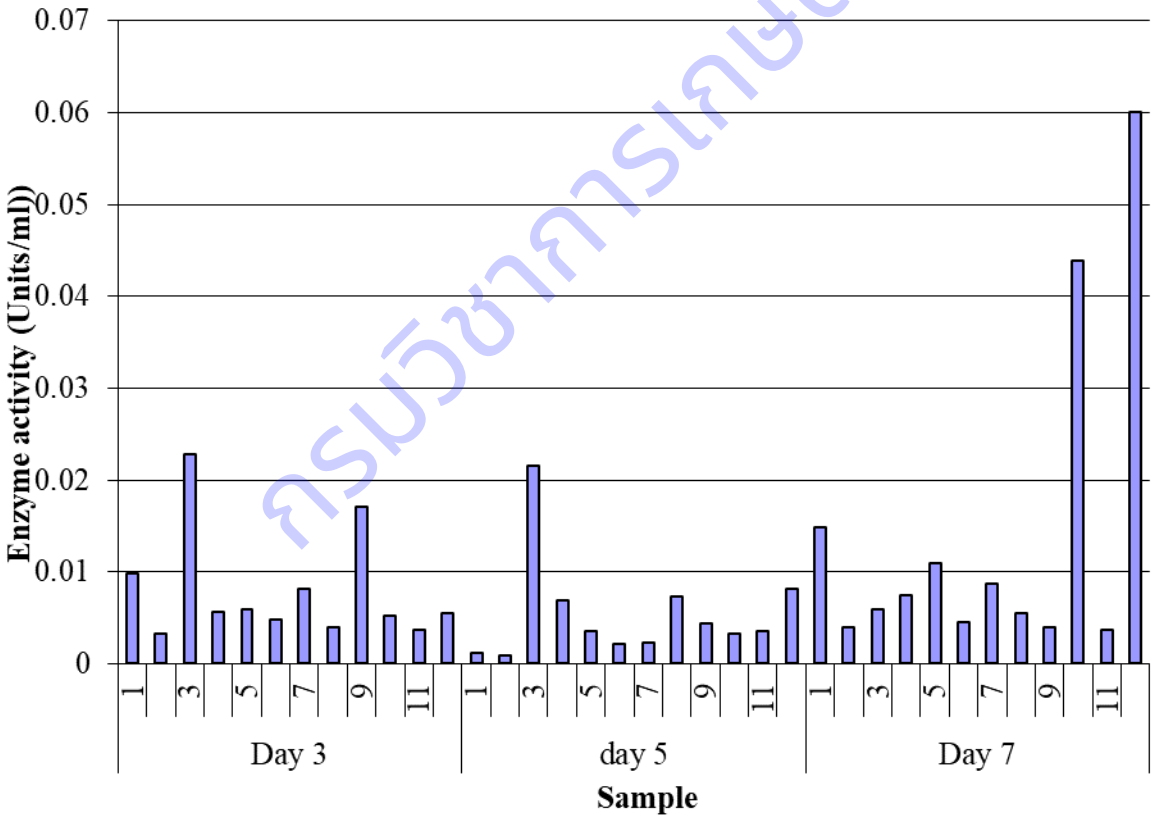
ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์หนอนกระทู้ผักที่ตายหลังจากได้รับเอ็นไซม์ไคติเนส จากการเตรียมไคติเนสที่มีการเขย่าเชื้อ 3 วัน ในเดือนมีนาคม 2562

กรรมวิธี	% การตายหนอนกระทู้ผัก
1.เมตาไรเซียม (1) + ไคติน A 1%	20
2.เมตาไรเซียม (1) + ไคติน A 2%	55
3.เมตาไรเซียม (1) + ไคติน B 1%	20

กรมวิชาการเกษตร

4.เมตาไรเซียม (1) + ไคติน B 2%	5
5.เมตาไรเซียม (2) + ไคติน A 1%	50
6.เมตาไรเซียม (2) + ไคติน A 2%	15
7.เมตาไรเซียม (2) + ไคติน B 1%	20
8.เมตาไรเซียม (2) + ไคติน B 2%	45
9.บิวเวอร์เรีย (1) + ไคติน A 1%	25
10.บิวเวอร์เรีย (1) + ไคติน A 2%	40
11.บิวเวอร์เรีย (1) + ไคติน B 1%	35
12.บิวเวอร์เรีย (1) + ไคติน B 2%	15
วิธีควบคุม	0

หลังจากผลการทดสอบเบื้องต้น ได้เตรียมไคติเนสโดยการเขย่าส่วนผสมแต่ละกรรมวิธี เป็นเวลา 3, 5 และ 7 วัน นำเอ็นไซม์ที่ได้ไปทำให้แห้ง โดยเข้าเครื่อง freeze dry แล้ววัดค่า activity ของเอ็นไซม์ ดังแสดงในกราฟที่ 1 จากนั้นทำการปรับค่า activity ทุกกรรมวิธีให้เป็น 0.01 unit/ ml



ภาพที่ 4 กราฟแสดงค่า enzyme activity ของเอ็นไซม์ไคติเนสแต่ละกรรมวิธี

จากนั้นได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพของเอ็นไซม์ไคติเนสกับหนอนกระทู้ผักวัย 2 ในเดือนมิถุนายน 2562 โดยวัดขนาดลำตัวและน้ำหนักหนอนกระทู้ผักหลังจากได้รับเอ็นไซม์ไคติเนส ดังแสดงไว้ในตารางที่ 3 และ 4 และได้บันทึกจำนวนหนอนกระทู้ผักที่ตายหลังจากได้รับเอ็นไซม์ไคติเนส คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้ตามตารางที่ 5

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 3 ขนาดเฉลี่ยขนาดของหนอนกระทู้ผักหลังจากได้รับเอ็นไซม์ไคติเนสแล้ว 1 สัปดาห์ เดือนมิถุนายน 2562

กรรมวิธี	ขนาดเฉลี่ยหนอนกระทู้ผัก (ซ.ม.)		
	เขย่าเชื้อ 3 วัน	เขย่าเชื้อ 5 วัน	เขย่าเชื้อ 7 วัน
1.เมตาไรเซียม (1) + ไคติน A 1%	2.70 abc	2.58 c	1.83 a
2.เมตาไรเซียม (1) + ไคติน A 2%	2.54 abc	2.44 bc	1.84 a
3.เมตาไรเซียม (1) + ไคติน B 1%	2.68 abc	2.33 abc	2.16 a
4.เมตาไรเซียม (1) + ไคติน B 2%	2.89 c	2.54 c	1.81 a
5.เมตาไรเซียม (2) + ไคติน A 1%	2.63 abc	1.99 ab	1.85 a
6.เมตาไรเซียม (2) + ไคติน A 2%	2.84 bc	1.88 a	2.01 a
7.เมตาไรเซียม (2) + ไคติน B 1%	2.53 abc	2.16 abc	2.19 a
8.เมตาไรเซียม (2) + ไคติน B 2%	2.63 abc	2.20 abc	2.25 ab
9.บิวเวอร์เรีย (1) + ไคติน A 1%	2.24 a	2.24 abc	1.94 a
10.บิวเวอร์เรีย (1) + ไคติน A 2%	2.53 abc	2.34 abc	2.25 ab
11.บิวเวอร์เรีย (1) + ไคติน B 1%	2.36 ab	2.24 abc	2.08 a
12.บิวเวอร์เรีย (1) + ไคติน B 2%	2.39 abc	2.04 ab	2.11 a
13. วิธีควบคุม	2.58 abc	2.60 c	2.60 b

ตารางที่ 4 น้ำหนักเฉลี่ยของหนอนกระทู้ผักหลังจากได้รับเอ็นไซม์ไคติเนสแล้ว 1 สัปดาห์ เดือนมิถุนายน 2562

กรรมวิธี	น้ำหนักเฉลี่ยหนอนกระทู้ผัก (กรัม)		
	เขย่าเชื้อ 3 วัน	เขย่าเชื้อ 5 วัน	เขย่าเชื้อ 7 วัน
1.เมตาไรเซียม (1) + ไคติน A 1%	0.40 a	0.33 b	0.20 a
2.เมตาไรเซียม (1) + ไคติน A 2%	0.33 a	0.29 ab	0.20 a
3.เมตาไรเซียม (1) + ไคติน B 1%	0.40 a	0.27 ab	0.26 ab
4.เมตาไรเซียม (1) + ไคติน B 2%	0.48 a	0.32 b	0.19 a
5.เมตาไรเซียม (2) + ไคติน A 1%	0.41 a	0.27 ab	0.23 a
6.เมตาไรเซียม (2) + ไคติน A 2%	0.45 a	0.20 a	0.23 a
7.เมตาไรเซียม (2) + ไคติน B 1%	0.36 a	0.23 ab	0.24 ab
8.เมตาไรเซียม (2) + ไคติน B 2%	0.40 a	0.27 ab	0.26 ab
9.บิวเวอร์เรีย (1) + ไคติน A 1%	0.30 a	0.26 ab	0.21 a
10.บิวเวอร์เรีย (1) + ไคติน A 2%	0.35 a	0.28 ab	0.26 ab
11.บิวเวอร์เรีย (1) + ไคติน B 1%	0.31 a	0.23 ab	0.24 ab
12.บิวเวอร์เรีย (1) + ไคติน B 2%	0.32 a	0.23 ab	0.26 ab
13. วิธีควบคุม	0.37 a	0.32 b	0.32 b

ตารางที่ 5 เปอร์เซ็นต์หนอนกระทู้ผักที่ตายหลังจากได้รับเอ็นไซม์ไคติเนส เดือนมิถุนายน 2562

กรมวิทยาศาสตร์

กรรมวิธี	% การตายหนอนกระทู้ผัก		
	เขย่าเชื้อ 3 วัน	เขย่าเชื้อ 5 วัน	เขย่าเชื้อ 7 วัน
1.เมตาไรเซียม (1) + ไคติน A 1%	35	60	47.5
2.เมตาไรเซียม (1) + ไคติน A 2%	62.5	50	57.5
3.เมตาไรเซียม (1) + ไคติน B 1%	52.5	55	75
4.เมตาไรเซียม (1) + ไคติน B 2%	47.5	50	57.5
5.เมตาไรเซียม (2) + ไคติน A 1%	57.5	35	55
6.เมตาไรเซียม (2) + ไคติน A 2%	42.5	40	60
7.เมตาไรเซียม (2) + ไคติน B 1%	52.5	52.5	62.5
8.เมตาไรเซียม (2) + ไคติน B 2%	42.5	50	55
9.บิวเวอร์เรีย (1) + ไคติน A 1%	50	35	65
10.บิวเวอร์เรีย (1) + ไคติน A 2%	67.5	52.5	45
11.บิวเวอร์เรีย (1) + ไคติน B 1%	40	55	35
12.บิวเวอร์เรีย (1) + ไคติน B 2%	52.5	55	55
13. วิธีควบคุม	32.5	32.5	32.5

ผลการทดลองในเดือนมิถุนายน 2562 พบว่าขนาดตัวและน้ำหนักของหนอนกระทู้ที่ได้รับเอ็นไซม์ที่ผลิตโดยการเขย่าเชื้อ 7 วันจะมีขนาดและน้ำหนักน้อยกว่า หนอนที่ได้รับเอ็นไซม์จากการเขย่าเชื้อ 3 และ 5 วัน และหนอนที่ได้รับเอ็นไซม์ส่วนใหญ่จะมีขนาดและน้ำหนักน้อยกว่าหนอนที่ไม่ได้รับเอ็นไซม์ ค่าเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้ในแต่ละวิธีการค่าจะค่อยข้างแปรปรวน รวมทั้งวิธีควบคุมที่หนอนไม่ได้รับเอ็นไซม์ไคติเนสมีเปอร์เซนต์การตายค่อนข้างสูง จึงไม่สามารถสรุปผลได้อย่างชัดเจน

ได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพของเอ็นไซม์ไคติเนสกับหนอนกระทู้ผักวัย 2 ซ้ำอีก ในเดือนสิงหาคม 2562 ได้ค่าเฉลี่ยขนาดเฉลี่ยขนาดของหนอนกระทู้ผักหลังจากได้รับเอ็นไซม์ไคติเนสแล้ว 1 สัปดาห์ตามตารางที่ 6 และค่าขนาดเฉลี่ยน้ำหนักของหนอนกระทู้ผักหลังจากได้รับเอ็นไซม์ไคติเนสแล้ว 1 สัปดาห์ตามตารางที่ 7 ได้ค่าเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้ตามตารางที่ 8

ตารางที่ 6 ขนาดเฉลี่ยขนาดของหนอนกระทู้ผักหลังจากได้รับเอ็นไซม์ไคติเนสแล้ว 1 สัปดาห์ เดือนสิงหาคม 2562

กรรมวิธี	ขนาดเฉลี่ยหนอนกระทู้ผัก (ซ.ม.)		
	เขย่าเชื้อ 3 วัน	เขย่าเชื้อ 5 วัน	เขย่าเชื้อ 7 วัน
1.เมตาไรเซียม (1) + ไคติน A 1%	1.96 a	2.15 ab	2.16 a
2.เมตาไรเซียม (1) + ไคติน A 2%	2.16 a	2.03 a	2.33 a
3.เมตาไรเซียม (1) + ไคติน B 1%	2.36 abc	2.33 ab	1.98 a
4.เมตาไรเซียม (1) + ไคติน B 2%	2.19 ab	2.40 abc	2.13 a
5.เมตาไรเซียม (2) + ไคติน A 1%	1.93 a	2.26 ab	2.26 a
6.เมตาไรเซียม (2) + ไคติน A 2%	1.91 a	2.20 ab	2.40 a
7.เมตาไรเซียม (2) + ไคติน B 1%	2.25 ab	2.58 bc	2.25 a

กรมวิชาการเกษตร

8.เมตาไรเซียม (2) + ไคติน B 2%	2.91 c	2.49 abc	2.31 a
9.บิวเวอร์เรีย (1) + ไคติน A 1%	2.44 abc	2.55 bc	2.36 a
10.บิวเวอร์เรีย (1) + ไคติน A 2%	2.06 a	2.40 abc	2.33 a
11.บิวเวอร์เรีย (1) + ไคติน B 1%	2.36 abc	2.56 bc	2.28 a
12.บิวเวอร์เรีย (1) + ไคติน B 2%	2.19 ab	2.25 ab	2.29 a
13. วิธีควบคุม	2.80 bc	2.80 c	2.80 a

ตารางที่ 7 น้ำหนักเฉลี่ยของหนอนกระทู้ผักหลังจากได้รับเอ็นไซม์ไคติเนสแล้ว 1 สัปดาห์ เดือนสิงหาคม 2562

กรรมวิธี	น้ำหนักเฉลี่ยหนอนกระทู้ผัก (กรัม)		
	เขย่าเชื้อ 3 วัน	เขย่าเชื้อ 5 วัน	เขย่าเชื้อ 7 วัน
1.เมตาไรเซียม (1) + ไคติน A 1%	0.15 a	0.20 ab	0.19 a
2.เมตาไรเซียม (1) + ไคติน A 2%	0.18 ab	0.17 a	0.30 ab
3.เมตาไรเซียม (1) + ไคติน B 1%	0.24 ab	0.25 abc	0.18 a
4.เมตาไรเซียม (1) + ไคติน B 2%	0.21 ab	0.29 abc	0.22 ab
5.เมตาไรเซียม (2) + ไคติน A 1%	0.15 a	0.24 abc	0.26 ab
6.เมตาไรเซียม (2) + ไคติน A 2%	0.14 a	0.23 abc	0.31 ab
7.เมตาไรเซียม (2) + ไคติน B 1%	0.22 ab	0.31 abc	0.24 ab
8.เมตาไรเซียม (2) + ไคติน B 2%	0.24 ab	0.32 abc	0.25 ab
9.บิวเวอร์เรีย (1) + ไคติน A 1%	0.29 bc	0.35 bc	0.32 ab
10.บิวเวอร์เรีย (1) + ไคติน A 2%	0.19 ab	0.28 abc	0.28 ab
11.บิวเวอร์เรีย (1) + ไคติน B 1%	0.26 b	0.36 bc	0.26 ab
12.บิวเวอร์เรีย (1) + ไคติน B 2%	0.23 ab	0.26 abc	0.25 ab
13. วิธีควบคุม	0.37 c	0.37 c	0.37 b

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 8 เปอร์เซ็นต์หนอนกระทู้ผักที่ตายหลังจากได้รับเอ็นไซม์ไคติเนส เดือนสิงหาคม 2562

กรรมวิธี	% การตายหนอนกระทู้ผัก		
	เขย่าเชื้อ 3 วัน	เขย่าเชื้อ 5 วัน	เขย่าเชื้อ 7 วัน
1.เมตาไรเซียม (1) + ไคติน A 1%	10	7.5	5
2.เมตาไรเซียม (1) + ไคติน A 2%	15	5	2.5

3.เมตาไรเซียม (1) + ไคติน B 1%	5	2.5	5
4.เมตาไรเซียม (1) + ไคติน B 2%	15	7.5	7.5
5.เมตาไรเซียม (2) + ไคติน A 1%	12.5	7.5	2.5
6.เมตาไรเซียม (2) + ไคติน A 2%	7.5	7.5	10
7.เมตาไรเซียม (2) + ไคติน B 1%	10	2.5	10
8.เมตาไรเซียม (2) + ไคติน B 2%	2.5	7.5	5
9.บิวเวอร์เรีย (1) + ไคติน A 1%	2.5	2.5	7.5
10.บิวเวอร์เรีย (1) + ไคติน A 2%	12.5	5	17.5
11.บิวเวอร์เรีย (1) + ไคติน B 1%	10	5	17.5
12.บิวเวอร์เรีย (1) + ไคติน B 2%	15	15	0
13. วิธีควบคุม	0	0	0

ผลการทดลองในเดือนสิงหาคม 2562 จากการวัดค่าขนาดและน้ำหนักของหนอนกระทู้ผักที่ได้รับเอ็นไซม์ไคติเนส จากตารางที่ 6 และ 7 จะให้ค่าไปในแนวเดียวกัน โดยวิธีที่ให้ประสิทธิภาพดีที่สุดคือการใช้เมตาไรเซียมผลิตเอ็นไซม์ไคติเนส โดยที่ไคติน A จะให้ประสิทธิภาพดีกว่าไคติน B และเขย่าเชื้อเพื่อผลิตเอ็นไซม์ไคติเนส 3 วัน จะมีประสิทธิภาพดีที่สุด ซึ่งหนอนที่ได้รับเอ็นไซม์ไคติเนสจะมีขนาดและน้ำหนักน้อยกว่าหนอนที่ไม่ได้รับเอ็นไซม์ไคติเนส อย่างไรก็ตามในตารางที่ 8 เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้ผัก จะไม่สูงนัก เปอร์เซ็นต์การตายสูงสุดเพียง 17.5% เท่านั้น ซึ่งหากต้องนำไปใช้ในแปลงเกษตรกร จำเป็นต้องเพิ่มปริมาณเอ็นไซม์ที่ใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนกระทู้ผัก

2. การศึกษารูปแบบสารเอ็นไซม์ไคติเนสเพื่อใช้ประโยชน์ในการกำจัดหนอนกระทู้ผัก

จากการวิเคราะห์ผลการผลิตเอ็นไซม์ไคติเนสในการทดลองที่ผ่านมา จากเชื้อราเมตาไรเซียม 2 ไอโซเลต และบิววาเลีย 1 ไอโซเลต โดยใช้ไคติน 2 ชนิด คือ ชนิด A และ ชนิด B ที่ความเข้มข้น 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ และเวลาในการผลิตเอ็นไซม์ไคติเนส 3, 5 และ 7 วัน พบว่าวิธีที่ให้ประสิทธิภาพดีที่สุดคือการใช้เมตาไรเซียมผลิตเอ็นไซม์ไคติเนส โดยที่ไคติน A จะให้ประสิทธิภาพดีกว่าไคติน B และเขย่าเชื้อเพื่อผลิตเอ็นไซม์ไคติเนส 3 วัน จะมีประสิทธิภาพดีที่สุด

การศึกษารูปแบบสารเอ็นไซม์ไคติเนสจึงเลือกที่ผลิตเอ็นไซม์ไคติเนสจากเชื้อราเมตาไรเซียมไอโซเลทที่ 1 ซึ่งเป็นไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพดีและเป็นเชื้อราที่ทางสำนักวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพได้เก็บรักษาไว้ ส่วนไคตินที่ทำการผลิตเอ็นไซม์ไคติเนสนั้น ได้เลือกไว้ทั้งสองชนิดเนื่องจากไคตินA มีประสิทธิภาพที่ดี แต่มีราคาแพง หากสามารถใช้ไคติน B แทนจะช่วยลดต้นทุนในการผลิตเอ็นไซม์ไคติเนสได้ และระยะเวลาในการผลิตใช้เวลาในการเขย่าเชื้อเพียง 3 วันเท่านั้น โดยใช้ความเข้มข้นของไคตินเพียง 1% เพื่อลดต้นทุนในการผลิต

เมื่อได้เอ็นไซม์ในรูปผง โดยทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง (freeze-drying) ผสมผงเอ็นไซม์กับสารปรุงแต่ง (additive) Aluminium silicate และ Kaoline เพื่อให้เอ็นไซม์มีประสิทธิภาพในการคงตัวเพื่อให้เอ็นไซม์มีประสิทธิภาพในการคงตัว และเพิ่มประสิทธิภาพในการจับใบเมื่อใช้ในการฉีดพ่นพืชผักในแปลงเกษตรกร แล้วทดสอบประสิทธิภาพของเอ็นไซม์ไคติเนสที่ผสมสารปรุงแต่ง กรรมวิธีต่างๆ ในเดือนมกราคม 2563 กับหนอนกระทู้ผัก วัย 2 โดยบันทึก ขนาด น้ำหนักหนอน จำนวนตัวที่ตาย หลังจากได้รับเอ็นไซม์ ในแต่ละวัน ผลการทดลองพบว่า สารปรุงแต่ง Aluminium silicate จะให้ประสิทธิภาพดีกว่า Kaoline ในกรรมวิธีที่ 2 เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินA 0.1 กรัม + Aluminium silicate 0.1 g จะพบการตายของหนอนกระทู้ผัก 60%

กรมวิชาการเกษตร

รองลงมาคือกรรมวิธีที่ 7 เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินB 0.1 กรัม + Aluminium silicate 0.05 g หนอนมีการตาย 57.50 % ดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้ผักจากกรรมวิธีต่างๆ ในเดือนมกราคม 2563

กรรมวิธี	**% การตายของหนอน**
1. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินA 0.1 กรัม + Aluminium silicate 0.05 g	47.50 ab
2.เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินA 0.1 กรัม + Aluminium silicate 0.1 g	60.00 a
3. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินA 0.1 กรัม + Kaoline 0.10 g	32.50 b
4. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินA 0.1 กรัม+ Kaoline 0.20 g	52.50 ab
5. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินA 0.1 กรัม	45.00 ab
6. เอ็นไซม์ไคติเนสจากไคตินAในรูปของเหลว	37.50 ab
7. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินB 0.1 กรัม + Aluminium silicate 0.05 g	57.50 a
8. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินB 0.1 กรัม + Aluminium silicate 0.1 g	47.50 ab
9. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินB 0.1 กรัม + Kaoline 0.10 g	32.50 b
10. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินB 0.1 กรัม+ Kaoline 0.20 g	40.00 ab
11. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินB 0.1 กรัม	32.50 b
12. เอ็นไซม์ไคติเนสจากไคตินBในรูปของเหลว	52.50 ab
13. น้ำกลั่น (วิธีควบคุม)	0 c

ทำการทดสอบประสิทธิภาพของเอ็นไซม์ไคติเนสซ้ำในหนอนไขผึ้ง เนื่องจากช่วงโควิดไม่มีการเพิ่มปริมาณหนอนกระทู้ผัก ทำให้หนอนกระทู้ผักไม่เพียงพอในการทดลอง จึงใช้หนอนไขผึ้งซึ่งเป็นหนอนผีเสื้อเหมือนกันทำการทดสอบแทน โดยใช้หนอนไขผึ้ง วัยที่ 2 โดยได้เพิ่มกรรมวิธีอีก 2 กรรมวิธี เพื่อดูผลของ Aluminium silicate และ Kaoline จากผลการทดลองหนอนไขผึ้งตายน้อยมาก ทำให้ไม่สามารถเปรียบเทียบประสิทธิภาพของแต่ละกรรมวิธีได้ ทั้งนี้อาจเนื่องจากหนอนไขผึ้งและหนอนกระทู้ผักอยู่คนละวงศ์ (Family) กัน จึงทำให้ผลที่ได้ต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนไขผึ้งจากกรรมวิธีต่างๆ ในเดือนมิถุนายน 2563

กรรมวิธี	% การตายหนอนผีเสื้อกินไขผึ้ง
1. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินA 0.1 กรัม + Aluminium silicate 0.05 g	0
2.เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินA 0.1 กรัม + Aluminium silicate 0.1 g	2.5
3. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินA 0.1 กรัม + Kaoline 0.10 g	0
4. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินA 0.1 กรัม+ Kaoline 0.20 g	2.5
5. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินA 0.1 กรัม	0
6. เอ็นไซม์ไคติเนสจากไคตินAในรูปของเหลว	2.5
7. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินB 0.1 กรัม + Aluminium silicate 0.05 g	0
8. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินB 0.1 กรัม + Aluminium silicate 0.1 g	0

กรมวิชาการเกษตร

9. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินB 0.1 กรัม + Kaoline 0.10 g	5
10. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินB 0.1 กรัม+ Kaoline 0.20 g	2.5
11. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินB 0.1 กรัม	2.5
12. เอ็นไซม์ไคติเนสจากไคตินBในรูปของเหลว	0
13. Aluminium silicate 0.1 g	2.5
14. Kaoline 0.10 g	0
15. น้ำกลั่น (วิธีควบคุม)	0

ได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพของเอ็นไซม์ไคติเนสซ้ำในหนอนกระทู้ผัก วัยที่ 2 โดยได้เพิ่มกรรมวิธีอีก 2 กรรมวิธี เพื่อดูผลของ Aluminium silicate และ Kaoline ต่อหนอนกระทู้ผัก ผลการทดลองพบว่าในกรรมวิธีที่มี Aluminium silicate และ Kaoline พบว่ามีหนอนตาย จึงน่าจะเป็นไปได้ที่สารทั้งสองมีฤทธิ์ที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพกับแมลงมากขึ้น

สถาบันวิชาการเกษตร

ตารางที่ 11 เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้ผักจากกรรมวิธีต่างๆ ในเดือนสิงหาคม **2563**

กรรมวิธี	**% การตายของหนอนกระทู้ผัก**
1. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินA 0.1 กรัม + Aluminium silicate 0.05 g	10
2.เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินA 0.1 กรัม + Aluminium silicate 0.1 g	2.50
3. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินA 0.1 กรัม + Kaoline 0.10 g	7.50
4. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินA 0.1 กรัม+ Kaoline 0.20 g	12.5
5. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินA 0.1 กรัม	2.50
6. เอ็นไซม์ไคติเนสจากไคตินAในรูปของเหลว	2.50
7. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินB 0.1 กรัม + Aluminium silicate 0.05 g	5
8. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินB 0.1 กรัม + Aluminium silicate 0.1 g	5
9. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินB 0.1 กรัม + Kaoline 0.10 g	5
10. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินB 0.1 กรัม+ Kaoline 0.20 g	5
11. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินB 0.1 กรัม	15
12. เอ็นไซม์ไคติเนสจากไคตินBในรูปของเหลว	12.50
13. Aluminium silicate 0.1 g	12.50
14. Kaoline 0.10 g	10
15. น้ำกลั่น (วิธีควบคุม)	2.50

3. การทดสอบหาค่า LC 50

การทดสอบหาค่า LC 50 เป็นการความเข้มข้นของเอ็นไซม์ไคติเนสที่ทำให้หนอนกระทู้ผักตาย 50 % เดือนกันยายน โดยใช้เอ็นไซม์ไคติเนสที่ได้จากไคติน A และ B ที่ความเข้มข้นต่างๆ และใช้เอ็นไซม์ไคติเนสที่ได้จากไคติน A ที่ความเข้มข้นต่างๆ ผสมกับ Aluminium silicate และ Kaoline ซึ่งกำลังดำเนินการทดลอง ค่าการตายของหนอนกระทู้ผักจึงเป็นผลการทดลองเพียงสัปดาห์แรกเท่านั้น

ตารางที่ 12 เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้ผักในเวลา 1 สัปดาห์ จากกรรมวิธีต่างๆ ในเดือนกันยายน 2563

กรรมวิธี	% การตายของหนอนกระทู้ผัก
1. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินA 0.1 กรัม	20
2. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินA 0.20 กรัม	10
3. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินA 0.30 กรัม	10
4. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินA 0.40 กรัม	22.5
5. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินA 0.50 กรัม	15
6. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินA 0.1 กรัม + Aluminium silicate 0.1 กรัม	7.5
7. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินA 0.2 กรัม + Aluminium silicate 0.1 กรัม	10
8. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินA 0.3 กรัม + Aluminium silicate 0.10 กรัม	20
9. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินA 0.4 กรัม + Aluminium silicate 0.10 กรัม	17.5
10. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินA 0.5 กรัม + Aluminium silicate 0.10 กรัม	25
11. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินA 0.1 กรัม + Kaoline 0.10 กรัม	15
12. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินA 0.2 กรัม + Kaoline 0.10 กรัม	5
13. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินA 0.3กรัม + Kaoline 0.10 กรัม	5
14. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินA 0.4 กรัม + Kaoline 0.10 กรัม	22.5
15. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินA 0.5 กรัม + Kaoline 0.10 กรัม	35
16. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินB 0.1 กรัม	10
17. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินB 0.2 กรัม	10
18. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินB 0.3 กรัม	12.5
19. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินB 0.4 กรัม	25
20. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินB 0.5 กรัม	30
21. Aluminium silicate 0.05 g	2.5
22. Kaoline 0.10 g	20
23. น้ำ	0

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเอ็นไซม์ไคติเนสที่ความเข้มข้นต่างๆ และเอ็นไซม์ไคติเนสที่ผสมสารปรุงแต่งที่อัตราส่วนต่างๆ บางวิธีการเมื่อเพิ่มปริมาณเอ็นไซม์จะมีผลทำให้การตายของหนอนเพิ่มขึ้น แต่ไม่เสมอไป และจากตารางจะพบว่าหนอนกระทู้ที่ทดสอบด้วย Kaoline เพียงอย่างเดียว สามารถทำให้มีเปอร์เซ็นต์การ

ตายสูงถึง 20% ทั้งนี้เนื่องจากเกาลีนมีคุณสมบัติเป็นสารฆ่าแมลงด้วย ทุกกรรมวิธีไม่ทำให้หนอนตายถึง 50% สูงสุดเพียง 25% ทั้งนี้อาจจะมาจากปริมาณเอ็นไซม์ไคติเนสที่มีไม่มากพอ เนื่องจากข้อจำกัดในการผลิตเอ็นไซม์จากเครื่อง freeze dry ในหน่วยงาน ที่เป็นเครื่องขนาดเล็ก จึงไม่สามารถผลิตเอ็นไซม์เป็นจำนวนมากๆได้

1. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ :

การใช้ประโยชน์จากเอ็นไซม์ไคติเนสเพื่อใช้ในการควบคุมหนอนกระทู้ผัก ได้ทำการผลิตเอ็นไซม์ไคติเนสจากเชื้อราเมตาไรเซียม โดยใช้ไคติน ชนิด A และ B ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนกระทู้ผักในการทดลองปีที่แล้ว เข้าเครื่องเขย่า ที่ความเร็วรอบ 180 rpm อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 3 วัน นำไคติเนสที่อยู่ในรูปของเหลวเข้าเครื่อง Freeze dryer ให้แห้ง แล้วผสมผงเอ็นไซม์กับสารปรุงแต่ง (additive) เพื่อให้เอ็นไซม์มีประสิทธิภาพในการคงตัว นำไปทดสอบประสิทธิภาพกับหนอนกระทู้ผักวัยสอง ผลการทดลองพบว่า สารปรุงแต่ง Aluminium silicate จะให้ประสิทธิภาพดีกว่า Kaoline ในกรรมวิธีที่ 2 เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินA 0.1 กรัม + Aluminium silicate 0.1 g จะพบการตายของหนอนกระทู้ผัก 60% รองลงมาคือกรรมวิธีที 7 เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินB 0.1 กรัม + Aluminium silicate 0.05 g หนอนมีการตาย 57.50 % ทำการทดสอบประสิทธิภาพของเอ็นไซม์ไคติเนสซ้ำในหนอนไขผึ้ง เนื่องจากไม่มีหนอนกระทู้ผักเพียงพอในการทดลองเพราะอยู่ในช่วงโควิด โดยใช้หนอนไขผึ้งวัยที่ 2 โดยได้เพิ่มกรรมวิธีอีก 2 กรรมวิธี เพื่อดูผลของ Aluminium silicate และ Kaoline ว่ามีผลต่อการตายของหนอนหรือไม่ พบว่าเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนไขผึ้งน้อยมาก ไม่มีความแตกต่างกับวิธีควบคุม ต่อมาเมื่อเข้าสู่ภาวะปกติจึงได้ทำการทดสอบกับหนอนกระทู้ผักซ้ำอีกครั้งพบว่า Aluminium silicate และ Kaoline มีผลทำให้หนอนกระทู้ผักตายได้ซึ่งจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดหนอนกระทู้ผักเมื่อนำไปผสมกับเอ็นไซม์ไคติเนส และได้มีการทดลองหาค่าความเข้มข้นของเอ็นไซม์ไคติเนสที่ทำให้หนอนกระทู้ผักตาย 50% ซึ่งอยู่ในระหว่างดำเนินการทดลอง

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเอ็นไซม์ไคติเนสที่ความเข้มข้นต่างๆ และเอ็นไซม์ไคติเนสที่ผสมสารปรุงแต่งที่อัตราส่วนต่างๆ บางวิธีการเมื่อเพิ่มปริมาณเอ็นไซม์จะมีผลทำให้การตายของหนอนเพิ่มขึ้น แต่ไม่เสมอไป และจากตารางจะพบว่าหนอนกระทู้ที่ทดสอบด้วย Kaoline เพียงอย่างเดียว สามารถทำให้มีเปอร์เซ็นต์การตายสูงถึง 20% ทั้งนี้เนื่องจากเกาลีนมีคุณสมบัติเป็นสารฆ่าแมลงด้วย ทุกกรรมวิธีไม่ทำให้หนอนตายถึง 50% สูงสุดเพียง 25% ทั้งนี้อาจจะมาจากปริมาณเอ็นไซม์ไคติเนสที่มีไม่มากพอ เนื่องจากข้อจำกัดในการผลิตเอ็นไซม์จากเครื่อง freeze dry ในหน่วยงาน ที่เป็นเครื่องขนาดเล็ก จึงไม่สามารถผลิตเอ็นไซม์เป็นจำนวนมากๆได้ ซึ่งในการทดลองต่อไปควรจะผลิตเอ็นไซม์จากเครื่อง freeze dry ขนาดใหญ่ ที่สามารถผลิตเอ็นไซม์จำนวนมากๆ ได้ภายในระยะเวลาสั้นๆ เพื่อที่สามารถนำไปเป็นต้นแบบเชิงพาณิชย์ได้

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. สามารถขยายผลทดสอบในแปลงทดลอง เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการแนะนำให้เกษตรกรใช้ในแปลงผัก
2. สามารถขยายผลในเชิงพาณิชย์ โดยพัฒนาการผลิตเอ็นไซม์เป็นจำนวนมากๆ ด้วยวิธีการที่เหมาะสม

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ คุณศรีจิตรา กลันทกานนท์ ว่าที่ ร.ต.ชนินทร์ นาคขำ คุณอัจฉรา ซอวงศ์ นักวิชาการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ ที่ช่วยในการทดลอง

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 1.2 การทดสอบเอ็นไซม์ไคติเนสในภาคสนาม

Field testing of chitinase enzyme

มัลลิกา แก้ววิเศษ อิศเรศ เทียนทัด

วรารัตน์ ศรีประพัฒน์ จีรภา ปัญญศิริ

คำสำคัญ

ไคติเนส เมตาไรเซียม บิววาเลีย ไคติเนส หนอนกระทู้ผัก

chitinase, *Metarhizium sp*, *Beuvaria sp*., cutworm (*Spodoptera litura*)

บทคัดย่อ

ทำการศึกษาประสิทธิภาพและความคงทนของเอ็นไซม์ไคติเนสในการเก็บรักษา โดยผลิตเอ็นไซม์ไคติเนสแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเปรียบเทียบกับในตู้เย็นที่ช่วงระยะเวลาต่างๆ พบว่าในช่วงระยะเวลา 6 เดือนเอ็นไซม์ไคติเนสยังมีประสิทธิภาพต่อหนอนกระทู้ผัก ส่วนการทดสอบเอ็นไซม์ไคติเนสในภาคสนามได้ทำการทดสอบเอ็นไซม์ไคติเนสในแปลงคะน้าโดยทดสอบเปรียบเทียบกับการใช้สารฆ่าแมลง Emamectin และผลิตภัณฑ์ NPV พบว่าสารฆ่าแมลงมีประสิทธิภาพดีที่สุด รองลงมาเป็น NPV และไคติเนส ซึ่งไคติเนสให้ผลไม่ต่างจาก NPV

The efficacy and persistence of chitinase storage were studied . The chitinase was produced and stored at room temperature compared to refrigerated for different periods of time. It was found that within 6 months, chitinase was still effective against cutworm. The chitinase was tested in the field. The chitinase was tested in kale plots by comparing it with Emamectin and the NPV. The result showed that the insecticide was the most effective. Then NPV and chitinase were the same effect.

กรมวิชาการเกษตร

คำนำ

ไคติเนส เป็นเอ็นไซม์ที่ผลิตได้จากเชื้อรา แบคทีเรีย ไส้เดือนฝอย และไวรัสที่ทำให้เกิดโรคกับแมลง (Muzzarelli, 1977) เอ็นไซม์นี้มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดศัตรูพืช เช่น แมลง ไส้เดือนฝอยและเชื้อรา (Carr and Klessig, 1989; Linthorst, 1991; Sasai and Manocha, 1993) ในแมลงจะมีผลต่อขบวนการลอกคราบโดยกลไกการเข้าทำลายแมลงของเอ็นไซม์ไคติเนสเกิดขึ้นเมื่อแมลงกินชิ้นส่วนของพืชที่มีเอ็นไซม์ไคติเนสเข้าไปในทางเดินอาหาร เอ็นไซม์ทำลายเยื่อบุผนังทางเดินอาหาร เนื่องจากผนังทางเดินอาหารมีไคติเนสเป็นส่วนประกอบ (ทิพย์วดี, 2549) ซึ่งแมลงที่มีรายงานการใช้เอ็นไซม์ไคติเนส ในการป้องกันกำจัดเป็นพวกหนอนกระทู้ เช่น *Spodoptera frugiperda*, *S. littoralis, S. exigua*, หนอนเจาะสมอฝ้าย *Heliothis virescens* และหนอนกินใบยาสูบ *Manduca sexta* นอกจากนั้นยังมีผลกับเพลี้ยอ่อน (*Myzus pericae*) โดยลดการเจริญเติบโตและลดประชากรรุ่นลูกของเพลี้ยอ่อน (Kramer and Muthukrishnan, 1997)

ในการศึกษาประสิทธิภาพของเอ็นไซม์ไคติเนสต่อแมลง Wu et al., (2010) ได้ศึกษาการประเมินประสิทธิภาพของเอ็นไซม์ไคติเนสจากเชื้อ *Metarhizium anisopliae* ในรูปสารกำจัดแมลงกับหนอนใยผัก (*Plutella xylostella*) พบว่าหนอนจะลดการกินลง น้ำหนักตัวจะลดลง การเข้าดักแด้จะลดลง และเพิ่มอัตราการตายในช่วงหนอนและดักแด้ Binod et al., (2007) ศึกษาการประเมินประสิทธิภาพของเอ็นไซม์ไคติเนสจากเชื้อ *Trichoderma harianum* ต่อหนอนเจาะสมอฝ้าย (*Helicoverpa armigera*) พบว่าอัตราการกินของหนอนจะน้อยลง น้ำหนักตัวจะลดลง การเข้าดักแด้จะลดลง และเพิ่มอัตราการตายในช่วงหนอนและดักแด้

จากการศึกษาไคติเนสในห้องปฏิบัติพบว่าเอ็นไซม์มีประสิทธิภาพต่อหนอนกระทู้ผัก จึงควรที่จะนำมาทดสอบในภาคสนามเพื่อที่จะเป็นแนวทางในการแนะนำเกษตรกรต่อไป ในปัจจุบันมีชีวภัณฑ์ในการกำจัดแมลงหลายชนิด มีการศึกษาการใช้เชื้อไวรัส SlNPV อัตราต่างๆ ในการกำจัดหนอนกระทู้ผักในแปลงหอมหัวใหญ่ (อิศ

เรสและคณะ, 2560) ซึ่งหากนำไคติเนสไปใช้ในแปลงเกษตรกรต่อไปก็ควรที่จะมีการศึกษาถึงอัตราการใช้ด้วยเช่นกัน

วิธีดำเนินการ

- แบบและวิธีการทดลอง แผนการทดลองแบบ CRD
- วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. การทดสอบความคงทนของเอ็นไซม์ไคติเนส

1.1 วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 6 กรรมวิธี 4 ซ้ำ โดยทำการเก็บรักษา 2 แบบ

แบบที่ 1 เก็บรักษาเอ็นไซม์ที่อุณหภูมิห้อง ที่ช่วงเวลาต่างกัน 4 ช่วง คือ 0, 1, 3, 6 เดือน

1. เอ็นไซม์เก็บที่อุณหภูมิห้อง 0 เดือน
2.เอ็นไซม์เก็บที่อุณหภูมิห้อง 1 เดือน
3.เอ็นไซม์เก็บที่อุณหภูมิห้อง 3 เดือน
4.เอ็นไซม์เก็บที่อุณหภูมิห้อง 6 เดือน

แบบที่ 2 เก็บรักษาเอ็นไซม์ในตู้เย็น อุณหภูมิ 4-10 องศาเซลเซียส ที่ช่วงเวลาต่างกัน 4 ช่วง คือ 0, 1, 3, 6 เดือน

1.เอ็นไซม์เก็บในตู้เย็น 0 เดือน
2.เอ็นไซม์เก็บในตู้เย็น 1 เดือน
3.เอ็นไซม์เก็บในตู้เย็น 3 เดือน
4.เอ็นไซม์เก็บในตู้เย็น 6 เดือน

1.2 เลือกเอ็นไซม์ไคติเนสรูปแบบที่สามารถกำจัดหนอนกระทู้ผักได้ดีที่สุดมา 1 รูปแบบจากการทดลองก่อนนี้

1.3 นำเอ็นไซม์ที่เก็บไว้ตามกรรมวิธีต่างๆ ไปทดสอบกับหนอนกระทู้ผัก โดยใช้หนอน 10 ตัวต่อซ้ำ ทำ 4 ซ้ำวิเคราะห์ผลโดยดูการเจริญเติบโต เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนจากเอ็นไซม์ที่เก็บรักษาในช่วงระยะเวลาต่างๆ

บันทึกข้อมูล

บันทึกเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้ผักทุก 24 ชม.

2. ทดสอบเอ็นไซม์ไคติเนสในแปลง

ทดสอบประสิทธิภาพของเอ็นไซม์ไคติเนสในกะบะปลูก ขนาด 0.6x2x0.3 เมตร ปลูกต้นคะน้า จำนวน 30 ต้น ปล่อยหนอนก่อนทดสอบไป 30 ตัวต่อแปลง ก่อนทำการฉีดพ่นไคติเนส

วางแผนการทดลองแบบ RCB มี 3 กรรมวิธี 4 ซ้ำ

1. ไคติเนส (250 กรัม/น้ำ 1 ลิตร)+ปล่อยหนอน
2.น้ำ+ปล่อยหนอน
3. ไม่ปล่อยหนอน

เปรียบเทียบประสิทธิภาพของไคติเนสกับสารตัวอื่น โดยวางแผนการทดลองแบบ RCB มี 5 กรรมวิธี 4 ซ้ำ ในแปลงปลูกคะน้า

1. เอ็นไซม์ไคติเนส (250 กรัม/น้ำ 1 ลิตร)
2. ไวรัสเอ็นพีวีของหนอนกระทู้ผัก (SlNPV) จากสำนักวิจัยพัฒนาอารักขาพืช (2 มล/น้ำ 1 ลิตร)

กรมวิชาการเกษตร

3.. สารกำจัดแมลง Emamectin benzoate (4 มล/น้ำ 1 ลิตร)

4. น้ำ

5. ควบคุม (ไม่ปล่อยหนอน)

2.2 สำรวจและบันทึกข้อมูลเปอร์เซ็นต์ความเสียหาย

2.3 ทำการฉีดพ่นตามกรรมวิธีต่างๆ ในแปลงคะน้า

2.4 เก็บผลผลิตของคะน้า

- เวลาและสถานที่ ตุลาคม 2563- ธันวาคม 2564
สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ จ. ปทุมธานี

ผลการทดลองและวิจารณ์

ทำการผลิตเอ็นไซม์โดยเข้าเครื่อง freeze dry ที่สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ แต่เนื่องจากข้อจำกัดที่เครื่องทำ freeze dry มีขนาดเล็กจึงทำให้ผลิตแต่ละครั้งได้ปริมาณที่น้อย จึงนำไปผลิตเอ็นไซม์จากเครื่อง VK freezedry ของบริษัทที่สามารถรองรับการผลิตได้เป็นสิบลิตรต่อครั้ง ซึ่งมีขั้นตอนการทำ freeze dry จากบริษัท ดังนี้

1. Freezing อุณหภูมิ -30°C เป็นเวลา 8 ชั่วโมง
2. Primary dry สลับเย็น -40°C ร้อน 50°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
3. Secondary dry สลับเย็น -40°C ร้อน 40°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง
4. ค่าบรรยากาศ 70 PA อุณหภูมิชิ้นงาน 40 °C ความชื้น 3%

จากนั้นนำมาวัด activity ซึ่งพบว่าเอ็นไซม์ที่เข้าเครื่อง freeze dry ของ สทช. จะมีค่า activity ที่สูงกว่าในการผลิตจากไคติน A แต่จาก ไคติน B ค่า activity จะต่ำกว่าของบริษัท (ตารางที่ 1) ซึ่งอาจจะเป็นเพราะกระบวนการทำให้แห้งของบริษัทมีการใช้ความร้อนที่อาจมีผลให้ประสิทธิภาพของเอ็นไซม์ลดลงไป

ตารางที่ 1 ค่า activity ของเอ็นไซม์ที่ผลิตด้วยกรรมวิธีต่างๆ หลังจากผลิตเอ็นไซม์ 0 เดือน

ที่	กรรมวิธี	ค่า activity (unit/ml)
1	เอ็นไซม์จากไคติน Aที่ทำแห้งจากบริษัท	0.60
2	เอ็นไซม์จากไคติน Aที่ทำแห้งจากสทช	2.10
3	เอ็นไซม์จากไคติน Bที่ทำแห้งจากบริษัท	0.75
4	เอ็นไซม์จากไคติน B ที่ทำแห้งจากสทช	0.17

กรมวิชาการเกษตร

เมื่อนำเอ็นไซม์ที่ได้จากกรรมวิธีต่างๆ มาทดสอบกับหนอนกระทู้ผัก พบว่าหนอนที่ได้รับเอ็นไซม์จะมีขนาดลำตัวและน้ำหนักน้อยกว่าหนอนที่ไม่ได้รับเอ็นไซม์ และจะมีเปอร์เซนต์การตายสูงกว่าวิธีควบคุมที่หนอนไม่ได้รับเอ็นไซม์ ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ขนาดเฉลี่ยขนาด น้ำหนักเฉลี่ย และเปอร์เซนต์การตายของหนอนกระทู้ผักหลังจากได้รับเอนไซม์ไคติเนส เดือนกุมภาพันธ์ 2564 (0 เดือน)

ที่	กรรมวิธี	ขนาดเฉลี่ย	น้ำหนักเฉลี่ย	เปอร์เซ็นต์การตาย
		(เซนติเมตร)	(กรัม)	(%)
1	A1. ไคติเนส (chitin A 1%) 1.5 g + Kaoline 0.50 g (ตู้เย็น) บริษัท	1.95 de	0.12 ef	5 bc
2	A2. ไคติเนส (chitin A 1%) 1.5 g + Kaoline 0.50 g (RT) บริษัท	1.97 cde	0.11 f	13 abc
3	A3. ไคติเนส (chitin A 1%) 0.50 g + Kaoline 0.50 g ตู้เย็น (lab)	2.28 ab	0.19 ab	10 bc
4	A4.ไคติเนส (chitin A 1%) 0.50 g + Kaoline 0.50 g (RT) (lab)	2.39 a	0.20 ab	13 abc
5	A5.ไคติเนส (chitin A 1%) 1.50 g ตู้เย็น	1.93 de	0.12 ed	3 bc
6	A6. ไคติเนส (chitin A 1%) 0.50 g ตู้เย็น	2.18 bc	0.16 bcde	0 c
7	B1. ไคติเนส (chitin B 1%) 1.5 g + Kaoline 0.50 g บริษัท ตู้เย็น	2.03 cde	0.14 edef	15 abc
8	B2. ไคติเนส (chitin B 1%) 1.5 g + Kaoline 0.50 g (RT) บริษัท	2.11 bcde	0.18 bc	5 bc
9	B3.ไคติเนส (chitin B 1%) 1.0 g + Kaoline 0.50 g ตู้เย็น	2.08 bcde	0.17 bc	15 abc
10	B4. ไคติเนส (chitin B 1%) 1.0 g + Kaoline 0.50 g (RT)	1.90 e	0.12 def	5 bc
11	B5. ไคติเนส (chitin B 1%) 1.50 g ตู้เย็น	1.90 e	0.11 f	10 bc
12	B6. ไคติเนส (chitin B 1%) +chitin B 1% 1.0 g ตู้เย็น	2.13 bcd	0.17 bc	25 abc
13	K Kaoline 0.50 g	2.40 a	0.22 a	5 bc
14	C control น้ำ	2.17 bc	0.16 bcd	0 c

เนื่องจากเอ็นไซม์ไคติเนสที่ผลิตได้จาก สทช มีปริมาณน้อย จึงไม่เพียงพอในการทดสอบในเดือนต่อไป ในเดือนมีนาคม 2565 หลังจากที่เก็บเอ็นไซม์ไว้ 1 เดือน จึงมีเพียงเอ็นไซม์ที่ผลิตจากบริษัทเท่านั้น ซึ่งจากการวัด activity หลังจากเวลาผ่านไป 1 เดือนพบว่าค่าจะลดลงจากเดิม โดยที่ค่า activity ของเอ็นไซม์ที่เก็บที่อุณหภูมิห้องจะมีค่าสูงกว่าเอ็นไซม์ที่เก็บไว้ในตู้เย็น แต่ค่าไม่แตกต่างกันมากนัก แต่เมื่อระยะเวลาผ่านไป 3 เดือน ค่า activity จะสูงขึ้นในทุกตัวอย่าง เมื่อเก็บไว้ 6 เดือน ค่า activity โดยเฉพาะเอ็นไซม์ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

กรมวิชาการเกษตร

จะสูงขึ้นมาก (ตารางที่ 3) เนื่องจากในการวัดค่า activity จะดูความเข้มของสีเป็นหลัก จึงอาจเป็นไปได้ว่าเมื่อเวลาผ่านไป เอ็นไซม์อาจจะมีสีที่เปลี่ยนไปซึ่งอาจจะมีผลมาจากแสงที่ทำปฏิกริยากับเอ็นไซม์ ถึงแม้จะเก็บเอ็นไซม์ไว้ในขวดสีชาแล้วก็ตาม ซึ่งอาจจะต้องเก็บเอ็นไซม์ภาชนะทึบที่ซึ่งไม่ถูกแสงเพื่อคงสภาพไว้ จากค่า activity ที่ได้จะพบว่าในการเก็บเอ็นไซม์ไว้ในตู้เย็น ค่าที่ได้จะแปรปรวนน้อยกว่าการเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง ดังนั้นจึงควรเก็บเอ็นไซม์ไว้ในภาชนะที่ไม่ถูกแสงและเก็บในที่เย็น

ตารางที่ 3 ค่า activity ของเอ็นไซม์ที่ผลิตด้วยกรรมวิธีต่างๆ หลังจากผลิตเอ็นไซม์ในแต่ละช่วง

ที่	กรรมวิธี	ค่า activity (unit/ml)			
		0 เดือน	1 เดือน	3 เดือน	6 เดือน
1	เอ็นไซม์จากไคติน Aที่ทำแห้งจากบริษัทที่อุณหภูมิห้อง	0.60	0.15	1.51	7.22
2	เอ็นไซม์จากไคติน Aที่ทำแห้งจากบริษัทในตู้เย็น	0.60	0.12	1.14	0.60
3	เอ็นไซม์จากไคติน Bที่ทำแห้งจากบริษัทที่อุณหภูมิห้อง	0.75	0.19	1.93	6.64
4	เอ็นไซม์จากไคติน B ที่ทำแห้งจากบริษัทในตู้เย็น	0.75	0.12	1.22	0.88

กรมวิชาการเกษตร

ในการทดสอบประสิทธิภาพของเอ็นไซม์หลังจากเก็บรักษาไว้ 1 เดือน (ตารางที่ 4) 3 เดือน (ตารางที่ 5) 6 เดือน (ตารางที่ 6) พบว่าเอ็นไซม์ยังคงมีประสิทธิภาพที่ทำให้หนอนตายได้ ดังนั้นการเก็บรักษาเอ็นไซม์ให้มีประสิทธิภาพสามารถเก็บรักษาไว้ได้อย่างน้อย 6 เดือน โดยที่การเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องหรือในตู้เย็นก็ให้ผลไม่ต่างกัน

ตารางที่ 4 ขนาดเฉลี่ยขนาด น้ำหนักเฉลี่ย และเปอร์เซนต์การตายของหนอนกระทู้ผักหลังจากได้รับเอนไซม์ไคติเนส เดือนมีนาคม 2564 (1 เดือน หลังผลิตเอ็นไซม์)

ที่	กรรมวิธี	ขนาดเฉลี่ย	น้ำหนักเฉลี่ย	เปอร์เซ็นต์การตาย
		(เซนติเมตร)	(กรัม)	(%)
1	A1. ไคติเนส (chitin A 1%) 1.50 g + Kaoline 0.50 g	0.88 a	0.012 a	38 a
2	A2. ไคติเนส (chitin A 1%) 1.50 g + Kaoline 0.50 g (RT)	0.87 a	0.011 a	40 a
3	A3. ไคติเนส (chitin A 1%) 1.50 g	0.82 a	0.008 a	30 a
4	A4.ไคติเนส (chitin A 1%) 1.50 g (RT)	0.83 a	0.009 a	32 a
5	B1. ไคติเนส (chitin B 1%) 1.50 g + Kaoline 0.50 g	0.93 a	0.014 a	35 a
6	B2. ไคติเนส (chitin B 1%) 1.50 g + Kaoline 0.50 g (RT) บริษัท	0.92 a	0.012 a	50 a
7	B3. ไคติเนส (chitin B 1%)1.50 g	0.86 a	0.011 a	32 a
8	B4. ไคติเนส (chitin B 1%) 1.50 g (RT)	0.87 a	0.010 a	43 a
9	K Kaoline 0.50 g	0.90 a	0.013 a	53 a
10	C control น้ำ	0.92 a	0.014 a	3 b

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 5 ขนาดเฉลี่ยขนาด น้ำหนักเฉลี่ย และเปอร์เซนต์การตายของหนอนกระทู้ผักหลังจากได้รับเอนไซม์ไคติเนส เดือนกรกฎาคม 2564 (3 เดือน หลังผลิตเอ็นไซม์)

ที่	กรรมวิธี	ขนาดเฉลี่ย	น้ำหนักเฉลี่ย	เปอร์เซ็นต์การตาย
		(เซนติเมตร)	(กรัม)	(%)
1	A1.ไคติเนส (chitin A 1%) 1.50 g + Kaoline 0.50 g	2.7 bcde	0.28 cd	20 abc
2	A2. ไคติเนส (chitin A 1%) 1.50 g + Kaoline 0.50 g (RT)	3.0 ab	0.31 bc	33 ab
3	A3. ไคติเนส (chitin A 1%) 1.50 g	2.9 bc	0.26 cd	25 ab
4	A4. ไคติเนส (chitin A 1%) 1.50 g (RT)	2.7 cde	0.23 cd	28 ab
5	B1. ไคติเนส (chitin B 1%) 1.50 g + Kaoline 0.50 g	2.6 de	0.21 cd	30 ab
6	B2. ไคติเนส (chitin B 1%) 1.50 g + Kaoline 0.50 g (RT) บริษัท	2.9 bcd	0.27 cd	25 ab
7	B3. ไคติเนส (chitin B 1%) 1.50 g	2.5 e	0.19 e	30 ab
8	B4. ไคติเนส (chitin B 1%) 1.50 g (RT)	2.8 bcd	0.23 cd	13 ab
9	K Kaoline 0.50 g	3.2 a	0.48 a	40 a
10	C control น้ำ	3.0 abc	0.37 b	0 c

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 6 ขนาดเฉลี่ยขนาด น้ำหนักเฉลี่ย และเปอร์เซนต์การตายของหนอนกระทู้ผักหลังจากได้รับเอนไซม์ไคติเนส เดือนพฤศจิกายน 2564 (6 เดือน หลังผลิตเอ็นไซม์)

ที่	กรรมวิธี	ขนาดเฉลี่ย	น้ำหนักเฉลี่ย	เปอร์เซ็นต์การตาย
		(เซนติเมตร)	(กรัม)	(%)

1	A1. ไคติเนส (chitin A 1%) 1.50 g + Kaoline 0.50 g	2.73 cd	0.31 cd	30 abcd
2	A2. ไคติเนส (chitin A 1%)1.50 g + Kaoline 0.50 g (RT)	2.50 de	0.25 de	43 bc
3	A3. ไคติเนส (chitin A 1%) 1.50 g	2.42 e	0.22 de	55 ab
4	A4.ไคติเนส (chitin A 1%) 1.50 g (RT)	2.36 e	0.18 e	85 a
5	B1. ไคติเนส (chitin B 1%) 1.50 g + Kaoline 0.50 g	2.99 bc	0.25 b	60 ab
6	B2.ไคติเนส (chitin B 1%) 1.50 g + Kaoline 0.50 g (RT) บริษัท	2.51 de	0.24 de	40 bcd
7	B3. ไคติเนส (chitin B 1%) 1.50 g	2.25 e	0.16 e	5 de
8	B4. ไคติเนส (chitin B 1%) 1.50 g (RT)	2.54 de	0.17 de	23 bcde
9	K Kaoline 0.50 g	2.91 bc	0.34 bc	13 cde
10	C control น้ำ	3.48 a	0.54 a	3 e

ในการทดสอบภาคสนาม ได้ทำการทดสอบเอ็นไซม์ไคติเนสกับคะน้าที่ปลูกในกะบะปลูกขนาด 0.6x2x0.3 เมตร จำนวน 30 ต้นต่อกะบะ โดยทำการทดสอบเบื้องต้นเพื่อดูประสิทธิภาพของเอ็นไซม์ไคติเนสต่อหนอนกระทู้ผักในแปลงคะน้า โดยปล่อยหนอนเข้าทำลายใบคะน้า จากนั้นทำการฉีดพ่นไคติเนส ผลการทดสอบพบว่าเอ็นไซม์ไคติเนสสามารถช่วยลดความเสียหายของคะน้าจากการทำลายของหนอนกระทู้ผักเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีที่ปล่อยหนอนโดยฉีดพ่นเพียงน้ำ พบว่าความเสียหายของคะน้าจากไคติเนสจะน้อยกว่า แต่อย่างไรก็ตามความเสียหายของคะน้ายังมากกว่าวิธีที่ไม่ปล่อยหนอน (ตารางที่ 7)

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 7 เปอร์เซนต์ความเสียหายของคะน้าจากการทำลายของหนอนกระทู้ผัก

กรรมวิธี	ความเสียหายของคะน้า (%)
1.ไคติเนส + ปล่อยหนอน	41 ab
2.น้ำ + ปล่อยหนอน	55 b
3. ควบคุม (ไม่ปล่อยหนอน)	11 a

เมื่อพบว่าไคติเนสมีประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนกระทู้ผัก จึงได้ทำการทดสอบเปรียบเทียบกับ SlNPV ที่ใช้ในการควบคุมหนอนกระทู้ผัก และสารฆ่าแมลง Emamectin benzoate ผลการทดสอบพบว่าสารฆ่าแมลงให้ประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนกระทู้ผักดีที่สุดโดยที่ให้ค่าไม่ต่างจากวิธีควบคุมที่ไม่ได้ปล่อยหนอน

ส่วนไคติเนสให้ผลไม่ต่างจากการใช้ผลิตภัณฑ์ NPV ในการควบคุมแมลง จากรายงานของอิศเรส (2560) ในการฉีดพ่น SlNPV เทียบกับ สารฆ่าแมลง Emamectin benzoate พบว่า SlNPV มีประสิทธิภาพดีเทียบเท่าการใช้สารฆ่าแมลง

ตารางที่ 8 เปอร์เซนต์ความเสียหายของคะน้าจากการทำลายของหนอนกระทู้ผัก

กรรมวิธี	ความเสียหายของคะน้า (%)
1. ไคติเนส	20 b
2. NPV	18 b
3. Emamectin benzoate	12 a
4. น้ำ	27 c
5. ควบคุม (ไม่ปล่อยหนอน)	7 a

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

เอ็นไซม์ไคติเนสสามารถเก็บไว้ได้อย่างน้อย 6 เดือน โดยที่ยังมีประสิทธิภาพต่อหนอนกระทู้ผัก และสามารถเก็บไว้ได้ในสภาพอุณหภูมิห้อง เมื่อนำมาใช้ในสภาพแปลงทดลองสามารถที่จะช่วยลดความเสียหายของคะน้าจากการทำลายของหนอนกระทู้ผักได้ และเมื่อทำการทดสอบเปรียบเทียบประสิทธิภาพกับสารฆ่าแมลง Emamectin พบว่าสารฆ่าแมลงมีประสิทธิภาพดีกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีควบคุมที่ไม่ปล่อยหนอนแล้วค่าความเสียหายจะไม่ต่างกันเลย แต่อย่างไรก็ตามไคติเนสที่ใช้ในแปลงจะใช้ความเข้มข้นสูงมาก และหากคิดต้นทุนการผลิตแล้วจะแพงมาก ไม่เหมาะกับการใช้ในสภาพแปลงผัก หากนำไปใช้จริง อาจจะเริ่มต้นไปใช้ในพืชที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจที่สูง เพื่อให้คุ้มกับค่าใช้จ่าย

กรมวิชาการเกษตร

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

3. สามารถขยายผลทดสอบในแปลงทดลอง เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการแนะนำให้เกษตรกรใช้ในแปลงผัก
4. สามารถขยายผลในเชิงพาณิชย์ โดยพัฒนาการผลิตเอ็นไซม์เป็นจำนวนมากๆ ด้วยวิธีการที่เหมาะสม

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ คุณศรีจิตรา กลันทกานนท์ ว่าที่ ร.ต.ชนินทร์ นาคขำ คุณอัจฉรา ซอวงศ์ นักวิชาการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ ที่ช่วยในการทดลอง

กิจกรรมที่ 2

การผลิตเอ็นไซม์ย่อยสลายที่มีประโยชน์จากเชื้อราไตรโคเดอร์มาเพื่อใช้ในการควบคุมโรคพืช

การทดลองที่ 2.1 การคัดเลือก และจำแนกชนิดของเอ็นไซม์จากเชื้อราไตรโคเดอร์มาที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรครากเน่าโคนเน่า

พยุงศักดิ์ รวยอารี ทัศนาพร ทัศคร
ภรณี สว่างศรี นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด

คำสำคัญ (Key words)
ไตรโคเดอร์มา
Trichoderma species

กรมวิชาการเกษตร

บทคัดย่อ

ทำการแยกและคัดเลือกเชื้อราไตรโคเดอร์มาสปีชีส์ (*Trichoderma* species) จากตัวอย่างดินและตัวอย่างเห็ด จ.กาญจนบุรี โดยวิธี soil dilution plate บนอาหาร PDA ได้ไตรโคเดอร์มาจำนวน 30 ไอโซเลต เพื่อศึกษาการสร้างเอ็นไซม์ย่อยสลายจำนวน 3 ชนิด ได้แก่ เซลลูเลส อะไมเลส และเพคติเนส จากการทดสอบความสามารถในการสร้างเอ็นไซม์บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ (selective medium) โดยวิธีการวัดการเจริญเติบโตเฉลี่ยของราไตรโคเดอร์มาบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะตามค่าเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของเส้นใย พบว่าราไตรโคเดอร์มาทุกไอโซเลต คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ สามารถสร้างเอ็นไซม์ย่อยสลายได้ทั้ง 3 ชนิด โดย ไตรโคเดอร์มาไอโซเลต T14 สามารถสร้างเอ็นไซม์เซลลูเลสได้ดีที่สุดบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะเกลือ CMC ไอโซเลต

T22 สามารถสร้างเอ็นไซม์อะไมเลสได้ดีที่สุดบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะผงวุ้นแป้ง และ ไตรโคเดอร์มาไอโซเลต TC1 สามารถสร้างเอ็นไซม์เพคติเนสได้ดีที่สุดบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ Czapek ด้วยเหตุนี้ เซลลูเลสเป็นเอ็นไซม์ย่อยสลายหลักที่ไตรโคเดอร์มาสามารถสร้างได้จากคุณสมบัติในการสร้างเอ็นไซม์ย่อยสลาย ผลที่ได้จากการศึกษา แสดงให้เห็นถึงศักยภาพในการสร้างเอ็นไซม์ย่อยสลายของราไตรโคเดอร์มาในประเทศไทย และสามารถนำไปใช้เป็นทางเลือกในการควบคุมโรคพืชสำคัญได้

Abstract

A main goal of this experiment is to study the *Trichoderma*-producing degrading enzymes in controlling plant diseases. For this, three degrading enzymes which are cellulase, amylase and pectinase are focused and represented the main *trichoderma*-producing enzymes for this study. First, thirty *Trichoderma* isolates were used and tested for their ability for producing three different degrading enzymes. Among strains, a hundred percent, exhibited higher cellulolytic, amylolytic and pectinolytic activity, respectively. Among all strains, the most effective in degradation of cellulose, amylose and pectin was observed in this study respectively. Accordingly, cellulase appears to be the main *trichoderma*-producing enzymes based on their abilities in producing degrading enzymes. Taken together, the enzymatic characteristics of the *trichoderma*-producing enzymes derived from Thai strains may lead to better alternative ways of controlling important plant diseases in the future.

กรมวิชาการเกษตร

บทนำ

ปัจจุบันการศึกษาเกี่ยวกับการนำเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ ต่อการนำมาใช้ในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี (biocontrol agents) มีวัตถุประสงค์เพื่อป้องกันโรคพืชที่สำคัญ โดยเฉพาะการใช้เชื้อราไตรโคเดอร์มา (*Trichoderma* spp.) ที่มีคุณสมบัติของเชื้อราที่จัดเป็นเชื้อปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืชและสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตให้แก่พืช นั้น พบว่ามีการศึกษาการนำมาใช้ประโยชน์ในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืช และทำลายเชื้อสาเหตุโรคพืชที่สำคัญมากมายอย่างต่อเนื่องเป็นเวลานานในประเทศไทย ซึ่งวิธีการนำเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไปใช้ควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี มีหลากหลายวิธี เช่น การคลุกเมล็ด การรองก้นหลุม การผสมกับวัสดุปลูก การหว่านลงดิน การให้ไปกับระบบน้ำ การทาแผลและการฉีดพ่น (จิระเดช และ วรรณวิไล, 2534) เป็นต้น

นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาถึงการครอบครองรากพืชของเชื้อรา *Trichoderma* spp. โดยการผสมเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในดินสำหรับปลูกข้าวโพด ถั่วลิสงและยาสูบ พบว่าพืชสร้างเอ็นไซม์เป็นปริมาณมาก จึงส่งผลให้พืชมีความต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคได้ (Engelberth et al., 2003) โดยการสร้างสารเคมีส่งสัญญาณ คือ

salicylic acid (SA) และ jasmonic acid (JA) สารทั้งสองจะถูกลำเลียงไปยังส่วนต่างๆ ของพืชและไปกระตุ้นการทำงานของ R gene (Wasternack et al., 2006) ซึ่งมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตัวเองของพืช เช่น PR genes ทำหน้าที่สังเคราะห์ PR-proteins (Pathogenesis Related Proteins) โดย PR-proteins ซึ่งมีหลายชนิดด้วยกัน เช่น CWDE (Cell Wall Degrading Enzymes) ที่ *Trichoderma* สร้างได้เอง เช่น chitinase , cellulase, xylanase, amylase, pectinase, glucanase (b-1,3 glucanase; b-1,4-glucanase), lipase, arabinase และ protease เป็นต้น โดยความสามารถที่เชื้อรา *Trichoderma* สามารถสร้างเอ็นไซม์ย่อยสลายต่างๆเหล่านี้ จะเกิดปฏิสัมพันธ์ (interact) ในเชิงปฏิปักษ์ (antagonist) และ การเป็นปรสิต (parasite) โดยเฉพาะกับเชื้อราสาเหตุโรคเท่านั้น (Vinale et al., 2008)

การสร้างเอ็นไซม์ย่อยสลายที่มีผลต่อเชื้อราสาเหตุโรคดังกล่าว PR-proteins ที่ ไตรโคเดอร์มา สร้างได้ยังมีคุณสมบัติกระตุ้นให้เกิดการสร้าง secondary compound เช่น nicotine สารจำพวก phenolic compounds และสาร proteinase-inhibitors ซึ่งเป็นสารต่อต้านแมลง (Heil and Bostock, 2002) ส่งผลให้พืชสามารถต่อต้านได้ทั้งเชื้อรา แบคทีเรีย ไวรัส ไส้เดือนฝอยและแมลง (Jones and Takemoto, 2004)

นอกจากคุณสมบัติในการกระตุ้นการสร้าง PR-protein ดังกล่าวข้างต้น เชื้อรา *Trichoderma* ยังส่งเสริมการเจริญเติบโตของรากพืชและช่วยให้พืชดูดซึมแร่ธาตุอาหารได้ดีขึ้น (Harman et al., 2004) เชื้อรา *Trichoderma* spp. เมื่อมีการเจริญบนบริเวณรากพืชจะกระตุ้นให้พืชมีการเจริญเติบโต และมีความต้านทานโรคที่ดีขึ้น และก่อให้เกิดกระบวนการกระตุ้นความต้านทานแบบทั่วต้น (induce systemic resistance, ISR) โดยทำให้ปริมาณของ jasmonic acid (JA) และ ethylene (ET) เพิ่มขึ้น และก่อให้เกิดการแสดงออกของยีน อย่างไรก็ตาม การศึกษากลไกต่างๆที่สำคัญ ที่ทำให้เชื้อรา *Trichoderma* spp. สามารถกระตุ้นให้พืชสร้างความต้านทานต่อเชื้อราสาเหตุโรคต่างๆ โดยการใช้เอ็นไซม์ชักนำให้พืชเกิดความต้านทานนั้นยังมีรายงานการศึกษาน้อย ถึงการใช้เอ็นไซม์ที่เชื้อรา *Trichoderma* spp. สามารถสร้างได้ และนำมาใช้ประโยชน์โดยนำมาใช้เป็นกลไกชักนำให้พืชเกิดความต้านทานต่อโรคโคนเน่ารากเน่า ที่เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora* spp. เช่น โรครากเน่าโคนเน่าทุเรียน ส้ม ยางพารา พริก มะเขือเทศ และมันสำปะหลัง เป็นต้น

การศึกษาการใช้เชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่แยกได้จากถุงวัสดุเพาะเห็ดและก้อนเชื้อเห็ดที่ปนเปื้อนจากฟาร์มเพาะเห็ดต่างๆ 9 จังหวัด ได้แก่ นครปฐม ราชบุรี เชียงราย ลพบุรี พังงา นครศรีธรรมราช สุราษฎร์ธานี อุดรธานี และสกลนคร สามารถแยกเชื้อรา *Tricoderma*. spp. จากก้อนเชื้อเห็ดได้ทั้งหมด 100 ไอโซเลต จากนั้นนำเชื้อราที่แยกได้ทั้งหมดมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Phomopsis asparagi* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Potato Dextrose Agar) PDA ซึ่งสามารถ คัดเลือกได้เชื้อรา *T.* spp. ที่มีประสิทธิภาพดี จำนวน 18 ไอโซเลต และได้ทำการจำแนกชนิดของเชื้อรา *T.* spp. พบว่า ทุกไอโซเลตที่คัดเลือกได้ คือ เชื้อรา *T. hazianum* จึงได้คัดเลือกเชื้อเพื่อทดสอบในสภาพโรงเรือนทดลอง จำนวน 5 ไอโซเลต ได้แก่ TS15, TS29, TS31, TS33 และ TS38 โดยการทดสอบได้มีการใช้เชื้อรา *T. hazianum* ร่วมกับก้อนเชื้อเห็ดหมัก ซึ่งจากการทดลองพบว่า เชื้อรา *T. hazianum* ไอโซเลต TS29 และ TS31 มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดโรคลำต้นไหม้ได้ดีในสภาพโรงเรือนทดลอง ที่หลังการทดลอง 10 วัน พบเปอร์เซ็นต์โรคลำต้นไหม้เท่ากับ 10.07 และ 15.72 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีปลูกเชื้อสาเหตุโรคเพียงอย่างเดียว ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์โรคลำต้นไหม้เท่ากับ 42.54 เปอร์เซ็นต์ (ทัศนาพร และคณะ, 2550)

อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่า มีการศึกษาเกี่ยวกับการใช้เอ็นไซม์เพื่อใช้ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชและกระตุ้นความต้านทานต่อโรคพืช เช่น ไคติเนส เซลลูเลส อะไมเลส และเพคติเนส เป็นต้น แต่การศึกษาการผลิตและการใช้เอ็นไซม์ย่อยสลายจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. มาใช้ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชรากเน่าโคนเน่ายังมีอยู่อย่างจำกัด ดังนั้น วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ เพื่อศึกษาและทดสอบการสร้าง

กรมวิชาการเกษตร

เอ็นไซม์ย่อยสลายของเชื้อรา *Trichoderma* spp. และนำไปใช้ในการทดสอบการผลิตเอ็นไซม์เพื่อใช้ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืช เพื่อลดหรือทดแทนการใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัดโรคพืชของเกษตรกร ซึ่งเป็นแนวทางที่ปลอดภัยและยั่งยืนต่อเกษตรกรและสภาพแวดล้อม

ระเบียบวิธีวิจัย

อุปกรณ์

- อุปกรณ์มาตรฐานในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ได้แก่ ตู้เขี่ยเชื้อปลอดเชื้อ อุปกรณ์การแยกเชื้อราจานเพาะเชื้อแก้ว มีฝาคลอบ ขนาด 90 มม., ขวดแก้วรูปชมพู่, ที่เจาะจุกยาง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 ซม. , ใบมีดผ่าตัด, ด้ามใบมีดผ่าตัด, ห่วงเขี่ยเชื้อ
- อุปกรณ์วิทยาศาสตร์ เช่น ตู้ควบคุมอุณหภูมิ ตู้เย็นเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ ลบ 20 องศาเซลเซียส หม้อนึ่งความดันไอ เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ ตู้อบ เป็นต้น
-เครื่องแก้วและอุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ เช่น เครื่องชั่ง เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง กระดาษชั่ง ม้วนเทปกาวย่น ปากกาสีสำหรับเขียนติดข้อความ กระดาษทิชชู่ปลอดเชื้อ เป็นต้น
- ไอโซเลตเชื้อราไตรโคเดอร์มา

คัดแยกตัวอย่างไอโซเลตเชื้อรา จำนวน 30 ไอโซเลต โดยสกัดแยกได้จากการศึกษาของ ทัศนาพร และคณะ (2550)

- **สารเคมี** สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น

ผงวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อ, อาหารเลี้ยงแบคทีเรียสารสกัดยีสต์, สารละลายย้อมสีตรวจหาจุลินทรีย์ conga red, อาหารเลี้ยงเชื้อซาเพ็ค, อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB, เกลือโซเดียมซีเอ็มซี คาร์บอกซีเมธิลเซลลูโลส, czapek dox broth, ผงวุ้นโปเตโต้เด็กซ์โตรสอาการ์ (PDA) , ผงวุ้นแป้งอาหารเลี้ยงเชื้อ , อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (PDB) , สารละลายไอโอดีน, อาหารวุ้นเลี้ยงเชื้อ lactobacillus MRS

- **อุปกรณ์สำหรับงานจุลชีววิทยา**

จานเพาะเชื้อแก้ว มีฝาคลอบ ขนาด 90 มม., ขวดแก้วรูปชมพู่, ที่เจาะจุกยาง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 ซม. , ใบมีดผ่าตัด, ด้ามใบมีดผ่าตัด, ห่วงเขี่ยเชื้อ

วิธีการ

1.การคัดเลือกเชื้อราไตรโคเดอร์มา ไอโซเลตที่มีศักยภาพในการผลิตเอ็นไซม์ย่อยสลาย

1.1 การเก็บตัวอย่างเชื้อราไตรโคเดอร์มา

สุ่มเก็บตัวอย่างดินและเห็ดจากจังหวัดกาญจนบุรี แยกราไตรโคเดอร์มา โดยวิธีเจือจางดิน (Serial Dilution Spread Plate Technique) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Selective Medium PDA (พีดีเอ หรือ potato dextrose agar) ตามวิธีการของ ทัศนาพรและคณะ (2550) ได้เชื้อราไตรโคเดอร์มา จำนวนทั้งหมด 30 ไอโซเลต (เก็บ

กรมวิชาการเกษตร

รวบรวมไว้ที่กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร จำนวน 28 ไอโซเลต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์จำนวน 1 ไอโซเลต และ การสุ่มเก็บตัวอย่างจำนวน 1 ไอโซเลต) ให้ชื่อว่า Tc1 ถึง Tc30 บ่มบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน ก่อนนำไปใช้ทดลองหรือเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสต่อไป จากนั้น ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแต่ละไอโซเลตบนอาหารวุ้นแครอท slant agar เพื่อเก็บรักษาเป็นเชื้อตั้งต้น (Stock culture) เพื่อเก็บรักษาไว้ในระยะยาวที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อ Slant agar และบนจานเพาะเชื้อ ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อราแต่ละไอโซเลตบนอาหารเพาะเลี้ยงใหม่ที่เตรียมบนจานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 90 มม. ก่อนนำไปใช้ในการศึกษาในแต่ละการทดลอง เพื่อใช้ในการทดลองแยกสกัดเอ็นไซม์โดยการทดสอบคุณสมบัติการย่อยสลายของเอ็นไซม์เซลลูเลส อะไมเลส และเพคติเนสบนอาหารจำเพาะเอ็นไซม์ชนิดต่างๆ และคัดเลือกราไตรโคเดอร์มาที่สามารถสร้างเอ็นไซม์ย่อยสลายได้ เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

1.2 การแยกเชื้อราไตรโคเดอร์มา

นำชิ้นวุ้นเชื้อราไตรโคเดอร์มาที่แยกสกัดได้จากข้อ 1.1 มาเลี้ยงบนจานเพาะเชื้อมีฝาคลอบเชื้อพีดีเอ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 72 ชั่วโมง สังเกตหรือวัดขนาดการเจริญเติบโตของเส้นใยทุกวันเป็นเวลา 3 วัน เพื่อนำไปทำการทดลองในขั้นตอนต่อไป เพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณเชื้อราไตรโคเดอร์มา โดยการเตรียมอาหารสูตรพีดีเอ เพื่อทดสอบการสร้างเอ็นไซม์ พบว่า ราไตรโคเดอร์มาสามารถเส้นใยในอาหารพีดีเอได้ใกล้เคียงกัน ทำการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณจำนวน 3 ครั้ง เพื่อเก็บเป็น stock culture ทั้งในรูปจานอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อและในรูปสปอร์ (ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ประกอบด้วยกลีเซอรอล) เชื้อนำเชื้อราไตรโคเดอร์มาที่แยกได้มาทดสอบความสามารถการสร้างเอ็นไซม์เซลลูเลส เอ็นไซม์อะไมเลส และ เอ็นไซม์เพคติเนส จากนั้น จึงคำนวณหาค่าเฉลี่ยความสามารถการสร้างเอ็นไซม์แต่ละชนิด ต่อไป

กรมวิชาการเกษตร

2. ทดสอบความสามารถการสร้างเอ็นไซม์ของเชื้อราไตรโคเดอร์มา

2.1 นำเชื้อราไตรโคเดอร์มาที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคโคนเน่ารากเน่าจากการทดลองที่ 1 อย่างน้อย 5 ไอโซเลต มาทดสอบการสร้างเอ็นไซม์อะไมเลสด้วยวิธี zone clearing technique ด้วยการใช้ starch agar medium เป็นสารตั้งต้น บ่มจานเพาะเลี้ยงเชื้อนาน 3 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายหลังการบ่มจานเพาะเชื้อ ทดสอบปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสของแป้งเป็นโซนใสโดยการหยดด้วยสารละลายไอโอดีน สีที่ปรากฏบ่งบอกการปรากฏของแป้ง ในขณะที่พื้นที่รอบๆจุลินทรีย์ที่ทำปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสได้จะปรากฏลักษณะใส (Marmoodh and Sabita 2008) วัดเส้นผ่านศูนย์กลางการสร้างหรือเกิดบริเวณใส วงใสรอบโคโลนีต่ออัตราส่วนเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี หรือ ค่า HC (HC value) (เพชรลดาและกำไล 2556)

2.2 นำเชื้อราไตรโคเดอร์มาที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคโคนเน่ารากเน่าจากการทดลองที่ 1 อย่างน้อย 5 ไอโซเลต มาทดสอบการสร้างเอ็นไซม์เซลลูเลส ดังนี้ นำเชื้อรามาเลี้ยงลงบนอาหาร PDB เป็นเวลานาน 1 วัน เพื่อทดสอบความสามารถในการสร้างเอ็นไซม์ เช่น เซลลูเลส ทำการปิเปต สารละลายเชื้อ ปริมาตร 30

ไมโครลิตร ลงในหลุมอาหารวุ้น CMC (carboxy methyl cellulose) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.8 เซนติเมตร โดยวิธี agar spot บ่มเป็นเวลา 3 วัน และ flood plate ด้วยสารละลาย congo red ความเข้มข้นร้อยละ 1 ให้ท่วมผิวหน้าอาหาร ทิ้งไว้ 15 นาที และเทออก วัดเส้นผ่านศูนย์กลางการสร้างหรือเกิดบริเวณใส วงใสรอบโคโลนีต่ออัตราส่วนเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี หรือ ค่า HC (HC value) (เพชรลดาและกำไล 2556)

2.3 นำเชื้อราไตรโคเดอร์มาที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคโคนเน่ารากเน่าจากการทดลองที่ 1 อย่างน้อย 5 ไอโซเลต มาทดสอบการสร้างเอ็นไซม์เพคติเนส Czepek medium วัดเส้นผ่านศูนย์กลางการสร้างหรือเกิดบริเวณใส วงใสรอบโคโลนีต่ออัตราส่วนเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี หรือ ค่า HC (HC value) (เพชรลดาและกำไล 2556)

2.4 บันทึกผลการทดลอง

คัดเลือกเชื้อราไตรโคเดอร์มาที่ผลิตเอ็นไซม์ชนิดต่างๆได้ดีที่สุดตามค่าคะแนน โดยคำนวณจากอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (clear zone) และโคโลนี (Xu and Yang, 2010; Taechapoempol, 2010) ซึ่งจัดเป็นระดับต่างๆ คือ

*	=	< 1.00
**	=	1.10-2.00
***	=	2.01-3.00
****	=	> 3.00

3. การจำแนกชนิดของเอ็นไซม์ที่เชื้อราไตรโคเดอร์มาที่สามารถสร้างเอ็นไซม์

วิธีการดำเนินงาน

ตัดปลายเส้นใยของเชื้อราไตรโคเดอร์มาที่เพาะเลี้ยงบนจานเพาะเชื้อพีดีเอ โดยใช้ที่เจาะจุกยาง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 ซม. วางชิ้นอาหารวุ้นที่มีเชื้อราบนอาหารที่ประกอบด้วย CMC สำหรับทดสอบการสร้างเอ็นไซม์เซลลูเลส อาหารวุ้นแป้ง (starch agar) สำหรับทดสอบการสร้างเอ็นไซม์อะไมเลส และอาหารวุ้น Czapek-Dox (Czapek-Dox agar) สำหรับทดสอบการสร้างเอ็นไซม์เพคติเนส จากนั้น วัดเส้นผ่านศูนย์กลางการสร้างหรือเกิดบริเวณใส วงใสรอบโคโลนีต่ออัตราส่วนเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีหรือค่า HC (HC value) (เพชรลดาและกำไล 2556)

4. การวิเคราะห์ความแปรปรวนและความแตกต่างของค่าเฉลี่ยการสร้างเอ็นไซม์ทางสถิติ

ออกแบบหรือแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (completely randomized design, CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ (3 replications) ใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANALYSIS OF VARIANCE)และความแตกต่างของค่าเฉลี่ยหรือวิธีการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย (DMRT)

- เวลาและสถานที่ - ระบุเวลา (เริ่มต้น-สิ้นสุด) และสถานที่ทำการทดลอง

- ตุลาคม 2561 – กันยายน 2562 สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

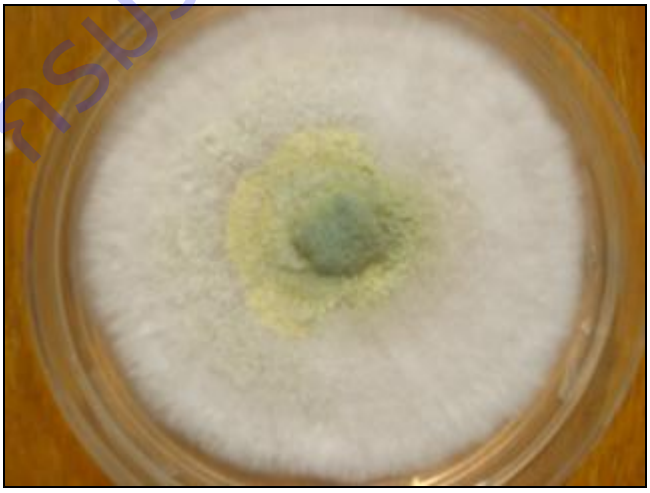
ผลการทดลองและวิจารณ์

ศรีปทุมการเกษตร

1.การคัดเลือกไอโซเลตเชื้อราไตรโคเดอร์มาที่มีศักยภาพในการผลิตเอ็นไซม์ย่อยสลาย

จากการทดสอบการแยกเชื้อราไตรโคเดอร์มาจากตัวอย่างดินและเห็ด จำนวน 30 ตัวอย่าง โดยวิธี soil dilution plate บนอาหารพีดีเอ สามารถได้ราไตรโคเดอร์มาจำนวนทั้งสิ้น 29 ไอโซเลต สาเหตุจากเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อเพื่อศึกษาการสร้างเอ็นไซม์ พบว่า ไอโซเลต ชื่อว่า TC29 ไม่สามารถเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อต่อไปได้ ส่วนไอโซเลตอื่นๆ ลักษณะเชื้อรามีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เส้นใยสีขาวสปอร์มีสีเขียวเข้มเต็มขอบ เส้นใยฟูเจริญเป็นวงกว้างบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (รูปที่ 1) นอกจากนี้ ทดสอบการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราทุกไอโซเลตที่สามารถเจริญเติบโตในวุ้นอาหารจำเพาะเพื่อทดสอบการสร้างเอ็นไซม์เซลลูเลสบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (CMC), เอ็นไซม์อะไมเลสบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (star agar) และ เอ็นไซม์เพคติเนสบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Czapek-Dox) พบว่า ราไตรโคเดอร์มาทุกไอโซเลตสามารถสร้างเอ็นไซม์ทั้งสามชนิดได้ โดย ไอโซเลต TC14, TC1 และ TC22 สามารถสร้างเอ็นไซม์ย่อยสลายเซลลูเลส เพคติเนสและ อะไมเลส ได้สูงสุดตามลำดับ โดยได้ค่าเฉลี่ยการสร้างวงใสบนอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดเอ็นไซม์ที่ 21.20, 7.73 และ 5.00 ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

จากการศึกษาเกี่ยวกับเอ็นไซม์สำคัญ ที่เชื้อรา *Trichoderma* spp. สามารถสร้างได้ และเป็นกลไกที่ทำให้เชื้อรา *Trichoderma* spp. สามารถกระตุ้นหรือชักนำให้พืชสร้างความต้านทานต่อเชื้อราสาเหตุโรคต่างๆ (biocontrol) โดยเฉพาะได้ เช่น คุณสมบัติการเป็น mycoparasitism, antagonism, antibiosis, nutrient competition และ phytopathogen suppression เป็นต้น (Hansan, 2014) ยังมีรายงานการศึกษาน้อยมากดังกล่าวข้างต้น ดังนั้น ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาถึงการสร้างเอ็นไซม์ สามารถนำมาประยุกต์ใช้หรือนำเอ็นไซม์ดังกล่าวมาใช้เป็นกลไกสำคัญเพื่อชักนำให้พืชเกิดความต้านทานต่อโรคโคนเน่ารากเน่า ต่อไปได้ จากการศึกษานี้พบว่า รา *Trichoderma* สามารถสร้างเอ็นไซม์ย่อยสลายได้ทั้งสามชนิด และจากการศึกษานี้พบว่า ไตรโคเดอร์มาสามารถสร้างเอ็นไซม์เซลลูเลสได้ในปริมาณที่สูง สอดคล้องกับรายงานการศึกษาอื่นๆ (Bech, 2015)



รูปที่ 1 ลักษณะการเจริญเติบโต สปอร์ และเส้นใยของราไตรโคเดอร์มา บนอาหารเลี้ยงเชื้อ พีดีเอหลังการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องนาน 5 วัน

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 1 แสดงไอโซเลตราไตรโคเดอร์มาที่สามารถสร้างเอ็นไซม์เฉลี่ย (MEAN) สูงสุด 5 ไอโซเลตทั้งสามชนิดเอ็นไซม์ จากจำนวนราทั้งหมด 29 ไอโซเลต การทดลองจำนวน 3 ครั้ง (replications)

ชนิดเอ็นไซม์	ชื่อไอโซเลตที่สร้างเอ็นไซม์ได้สูงสุด	ขนาดวงใสเฉลี่ยสูงสุด (เซ็นตริเมตร)
เซลลูเลส	Tc14	7.13
	Tc18	6.40
	Tc24	6.40
	Tc13	6.13
	Tc17	5.93
อะไมเลส	Tc22	5.00
	Tc27	4.93
	Tc25	4.93
	Tc24	4.83
	Tc21	4.66
เพคติเนส	Tc1	7.73
	Tc23	6.90
	Tc27	6.80
	Tc30	6.70
	Tc26	6.60

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 2 การทดสอบการสร้างเอ็นไซม์เซลลูเลสบนอาหาร CMC ที่ระยะเวลา 3 วันหลังการบ่มเชื้อ

Isolates of *Trichoderma* spp.	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ผลรวม (sum value)	Mean
TC1	-	3.40	3.30	6.70	2.23
TC2	1.50	2.60	3.00	7.10	2.36
TC3	4.00	4.00	4.30	12.30	4.10
TC4	-	2.50	3.20	5.70	1.90
TC5	1.00	1.50	1.40	3.90	1.30
TC6	2.00	1.60	3.10	6.70	2.23
TC7	1.20	2.20	2.10	5.50	1.83
TC8	2.00	2.50	4.00	8.50	2.83
TC9	4.60	4.70	4.50	13.80	4.60
TC10	2.50	1.60	1.50	5.60	1.86
TC11	3.60	6.00	5.30	14.90	4.96
TC12	5.80	5.70	5.80	17.30	5.76
TC13	6.00	6.50	5.90	18.40	6.13
TC14	7.00	7.50	6.90	21.40	7.13
TC15	7.20	6.50	2.00	15.70	5.23
TC16	5.50	5.60	5.20	16.30	5.43
TC17	6.50	5.80	5.50	17.80	5.93
TC18	6.50	6.50	6.20	19.20	6.40
TC19	6.00	2.00	5.00	13.00	4.33
TC20	4.30	5.00	5.20	14.50	4.83
TC21	5.80	4.30	4.60	14.70	4.90
TC22	5.60	6.00	5.70	17.30	5.76
TC23	5.60	6.00	6.00	17.60	5.86
TC24	6.20	6.50	6.50	19.20	6.40
TC25	6.00	6.00	5.20	17.20	5.73
TC26	5.50	5.00	4.50	15.00	5.00
TC27	2.20	2.00	3.00	7.20	2.40
TC28	5.70	-	5.90	11.60	3.86

กรมวิชาการเกษตร

TC30	4.50	5.50	5.50	15.50	5.16

ตารางที่ 3 การทดสอบการสร้างเอ็นไซม์อะไมเลสบนอาหาร Starch agar ที่ระยะเวลา 3 วันหลังการบ่มเชื้อ

Isolates of *Trichoderma* spp.	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ผลรวม (sum value)	Mean
TC1	2.00	2.50	2.50	7.00	2.33
TC2	2.50	2.50	3.00	8.00	2.66
TC3	2.80	3.50	3.50	9.90	3.30
TC4	2.50	2.50	3.00	8.00	2.66
TC5	2.20	2.50	2.50	7.20	2.40
TC6	2.50	3.00	3.00	8.50	2.83
TC7	3.00	2.00	2.00	7.50	2.50
TC8	2.50	-	-	2.50	0.83
TC9	-	-	-	-	-
TC10	2.50	2.50	2.00	7.00	2.33
TC11	4.50	4.20	3.00	11.70	3.90
TC12	3.00	3.20	3.00	9.20	3.06
TC13	3.50	3.00	4.00	10.50	3.50
TC14	-	1.50	1.00	2.50	0.83
TC15	2.00	2.00	1.50	5.50	1.83
TC16	3.00	3.00	4.00	10.00	3.33
TC17	6.00	4.00	4.60	14.60	4.86
TC18	5.00	3.60	5.50	14.10	4.70
TC19	3.00	3.80	4.20	11.00	3.66
TC20	4.50	3.50	4.50	12.50	4.16
TC21	4.50	5.20	4.30	14.00	4.66
TC22	4.50	5.00	5.50	15.00	5.00
TC23	3.00	3.50	4.00	10.50	3.50
TC24	6.00	4.00	4.50	14.50	4.83
TC25	4.30	5.00	5.50	14.80	4.93
TC26	4.30	4.00	4.00	12.30	4.10
TC27	4.30	5.00	5.50	14.80	4.93
TC28	4.50	3.60	4.30	12.40	4.13
TC30	3.30	3.00	5.00	11.30	3.76

ตารางที่ 4 การทดสอบการสร้างเอ็นไซม์เพคติเนสบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Czapek agar ที่ระยะเวลา 3 วันหลังการบ่มเชื้อ

กรมวิชาการเกษตร

Isolates of *Trichoderma* spp.	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ผลรวม (sum value)	Mean
TC1	8.00	7.70	7.50	23.20	7.73
TC2	5.50	6.90	6.80	19.20	6.40
TC3	6.00	5.80	5.00	16.80	2.13
TC4	6.50	6.60	7.00	20.10	6.70
TC5	-	-	4.00	4.00	1.33
TC6	6.50	7.00	6.50	20.00	6.66
TC7	6.50	7.00	6.50	20.00	6.66
TC8	-	-	-	-	-
TC9	-	-	-	-	-
TC10	4.80	5.00	6.00	15.80	5.26
TC11	-	1.00	-	1.00	0.33
TC12	6.60	6.50	6.50	19.60	6.53
TC13	6.00	6.00	6.50	18.50	6.16
TC14	-	1.00	-	1.00	0.33
TC15	-	-	1.00	1.00	0.33
TC16	6.00	6.70	6.50	19.30	6.43
TC17	5.00	6.00	6.00	17.00	5.66
TC18	1.20	-	1.50	2.70	0.90
TC19	1.20	-	1.50	2.70	0.90
TC20	5.50	-	2.50	13.00	4.33
TC21	6.00	5.00	6.50	19.10	6.36
TC22	6.00	6.60	6.20	18.20	6.06
TC23	7.00	6.00	6.80	20.70	6.90
TC24	6.50	6.90	6.50	19.00	6.33
TC25	6.60	6.00	6.50	19.00	6.33
TC26	6.50	6.00	7.00	20.00	6.66
TC27	6.80	6.60	6.60	20.40	6.80
TC28	6.00	7.00	5.50	18.50	6.16
TC30	6.60	7.00	6.50	20.10	6.70

ตารางที่ 5 แสดงการศึกษาความสามารถของไอโซเลตเชื้อราไตรโคเดอร์มาที่แตกต่างกันจำนวน 29 ไอโซเลตต่อการสร้างเอ็นไซม์เซลลูเลส (CELLULASE) โดยใช้วิธีการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย DMRT

TRT	N	RANKS	MEANS
t1	2	19	3.35 fgh[1/]
t2	3	23	2.37 hi
t3	3	18	4.10 efg
t4	2	20	2.85 ghi
t5	3	27	1.30 i
t6	3	24	2.23 hi

กรมวิชาการเกษตร

t7	3	26	1.83 hi
t8	3	21	2.83 ghi
t9	3	16	4.60 c-f
t10	3	25	1.87 hi
t11	3	13	4.97 b-f
t12	3	7	5.77 a-e
t13	3	3	6.13 abc
t14	3	1	7.13 a
t15	3	10	5.23 b-e
t16	3	9	5.43 b-e
t17	3	4	5.93 a-d
t18	3	2	6.40 ab
t19	3	17	4.33 d-g
t20	3	15	4.83 b-f
t21	3	14	4.90 b-f
t22	3	7	5.77 a-e
t23	3	5	5.87 a-d
t24	3	2	6.40 ab
t25	3	8	5.73 a-e
t26	3	12	5.00 b-f
t27	3	22	2.40 hi
t28	2	6	5.80 a-e
t29	3	11	5.17 b-e
MEAN			4.52

[1/]Means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 6 แสดงการศึกษาความสามารถของไอโซเลตเชื้อราไตรโคเดอร์มาที่แตกต่างกันจำนวน 29 ไอโซเลตต่อการสร้างเอ็นไซม์อะไมเลส (AMYLASE) โดยใช้วิธีการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย DMRT

TRT	N	RANKS	MEANS
t1	3	19	2.33 ghi[1/]
t2	3	17	2.67 e-i
t3	3	14	3.10 d-h
t4	3	17	2.67 e-i
t5	3	18	2.40 f-i
t6	3	16	2.83 d-h
t7	3	19	2.33 ghi
t10	3	19	2.33 ghi
t11	3	10	3.90 a-e
t12	3	15	3.07 d-h
t13	3	12	3.50 b-g

t14	2	21	1.25 i
t15	3	20	1.83 hi
t16	3	13	3.33 c-g
t17	3	3	4.87 ab
t18	3	5	4.70 abc
t19	3	17	2.67 e-i
t20	3	7	4.17 a-d
t21	3	6	4.67 abc
t22	3	1	5.00 a
t23	3	12	3.50 b-g
t24	3	4	4.83 ab
t25	3	2	4.93 a
t26	3	9	4.10 a-d
t27	3	2	4.93 a
t28	3	8	4.13 a-d
t29	3	11	3.77 a-f
MEAN			3.50

[1/]Means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 7 แสดงการศึกษาความสามารถของไอโซเลตเชื้อราไตรโคเดอร์มาที่แตกต่างกันจำนวน 29 ไอโซเลตต่อการสร้างเอ็นไซม์เพคติเนส (PECTINASE) โดยใช้วิธีการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย DMRT

TRT	N	RANKS	MEANS
t1	3	1	7.73 a[1/]
t2	3	8	6.40 abc
t3	3	14	5.60 bc
t4	3	2	6.70 ab
t6	3	3	6.67 ab
t7	3	3	6.67 ab
t10	3	16	5.27 cd
t12	3	6	6.53 abc
t13	3	11	6.17 bc
t16	3	15	5.40 bc
t17	3	13	5.67 bc

t18	2	18	1.35 e
t19	2	18	1.35 e
t20	2	17	4.00 d
t21	3	12	5.83 bc
t22	3	10	6.27 bc
t23	3	5	6.60 abc
t24	3	4	6.63 abc
t25	3	9	6.37 bc
t26	3	7	6.50 abc
t27	3	3	6.67 ab
t28	3	11	6.17 bc
t29	3	2	6.70 ab
MEAN			5.95

[1/]Means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

กรมวิชาการเกษตร

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

1. จากการทดลองสามารถแยกเชื้อราไตรโคเดอร์มาที่ได้จากตัวอย่างดินและตัวอย่างเห็ด (ทัศนาพรและคณะ 2550) ได้จำนวนทั้งหมด 29 ไอโซเลต ทำการต่อเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอ (PDA) บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยเก็บรักษาไว้ในจานอาหารเพาะเชื้อแก้วพีดีเอในหลอดแก้วทดลอง ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ เพื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (stock culture) และบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป นำไตรโคเดอร์มาแต่ละไอโซเลตบนอาหารเพาะเลี้ยงใหม่ที่เตรียมในจานเพาะเชื้อแก้วมีฝาคลอบขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 90 มิลลิเมตร โดยบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ก่อนนำไปใช้ในการศึกษาแต่ละการทดลอง

2.เมื่อนำมาทดสอบการสร้างเอ็นไซม์ พบว่า ไอโซเลตที่สามารถสร้างเอ็นไซม์เซลลูเลส อะไมเลส และเพคติเนสได้จำนวนทั้งหมด 29 ไอโซเลต โดยไตรโคเคอร์มาจำนวน 5 ไอโซเลตที่สามารถสร้างเอ็นไซม์เซลลูเลสได้สูงสุด คือ Tc14, Tc18, Tc13, Tc23 และ Tc24 ไตรโคเคอร์มาจำนวน 5 ไอโซเลตที่สามารถสร้างเอ็นไซม์อะไมเลสได้สูงสุด คือ Tc22, Tc27, Tc25, Tc24 และ Tc21 และ ไตรโคเคอร์มาจำนวน 5 ไอโซเลตที่สามารถสร้างเอ็นไซม์เพคติเนสได้สูงสุด คือ Tc1, Tc23, Tc27, Tc30 และ Tc24 ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

3.เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นพบว่าเชื้อราไตรโคเดอร์มา ที่คัดแยกได้จำนวน 29 ไอโซเลต จะสร้างเส้นใยฟูสีขาว และเส้นใยฟูสีเขียวอมเข้ม ขอบเรียบ

4.ผลการทดลองโดยรวมที่ผ่านมา ได้ไอโซเลตเชื้อราไตรโคเดอร์มาที่สร้างเอ็นไซม์เซลลูเลส (ไอโซเลต Tc14) เอ็นไซม์เพคติเนส (ไอโซเลต Tc1) และเอ็นไซม์อะไมเลส (ไอโซเลต Tc22) ที่สร้าง clear zone หรือไอโซเลตที่มีความสามารถในการสร้างเอ็นไซม์ได้สูงสุด (โดยพิจารณาจากค่าเฉลี่ยความสามารถการสร้างวงใส ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่จำเพาะต่อการสร้างเอ็นไซม์แต่ละชนิด) วัดขนาดเฉลี่ยสูงสุดบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะได้ที่ 21.2, 7.73

และ 5.0 เซ็นติเมตร ตามลำดับ ดังนั้น ข้อมูลที่คัดเลือกได้นี้ สามารถนำไปใช้ศึกษาการยับยั้งหรือควบคุมโรครากเน่าโคนเน่า สาเหตุจากเชื้อราโรคพืช ทั้งในสภาพโรงเรือนปลูกทดลองหรือในระดับโรงเรือนต่อไป

5. ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANALYSIS OF VARIANCE) และแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05

จากการวิเคราะห์คุณสมบัติการสร้างเอ็นไซม์จากความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทั้งสามชนิด พบว่า ไอโซเลตที่ Tc14 สามารถสร้างเอ็นไซม์เซลลูเลส ได้สูงสุด ไอโซเลตที่ Tc22 สามารถสร้างเอ็นไซม์อะไมเลส ได้สูงสุด และ ไอโซเลตที่ Tc1 สามารถสร้างเอ็นไซม์เพคติเนสได้สูงสุด และมีค่า มีค่า F เท่ากับ 11.03, 6.26 และ 10.90 ที่ 0.01 แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ผลงานที่สิ้นสุด สามารถนำไปใช้ประโยชน์ด้านวิชาการ โดยมีกลุ่มเป้าหมาย ได้แก่ นักวิจัย นักวิชาการด้านโรคพืชวิทยา เพื่อให้ผลลัพธ์ เป็นเชื้อราไตรโคเดอร์มาของกรมวิชาการเกษตรที่มีศักยภาพในการควบคุมโรคพืช เป็นผลดีแก่เกษตรกรต่อการควบคุมโรคพืช ลดปริมาณและค่าใช้จ่ายที่สูงต่อการใช้สารเคมี เนื่องจากเป็นศึกษาวิจัยโดยใช้ชีววิธี ปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม และข้อมูลที่ได้มาใช้ปรับปรุงหรือสามารถพัฒนาต่อยอด ถ่ายทอดในการควบคุมโรคพืชสำคัญทางเศรษฐกิจต่อในอนาคตหรือเผยแพร่เป็นเอกสารทางวิชาการได้

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 2. 2 การผลิตเอ็นไซม์จากเชื้อราไตรโคเดอร์มาในอาหารเหลวระดับขวดเขย่า (Flask-Culture technique) ในรูปแบบผงหรือเม็ดแห้ง

Production of enzymes by *Trichoderma* spp. in powder –derived liquid medium by shake flask technique

พยุงศักดิ์ รวยอารี ทัศนาพร ทัศคร
ภรณี สว่างศรี นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด

คำสำคัญ (Key words)
ไตรโคเดอร์มา
Trichoderma species

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความสามารถเชื้อราไตรโคเดอร์มาจำนวน 29 ไอโซเลตในการสร้างเอ็นไซม์ย่อยสลาย เซลลูเลส, อะไมเลส และเพคติเนส ในอาหารเหลว carboxy methyl cellulose (CMC), starch hydrolysed medium และ Czapek medium +1% เพคติน ตามลำดับ ต่อการยับยั้งเชื้อราไฟทอปธอราโดยวิธี Dual culture plate ในสภาพห้องปฏิบัติการ และจากการทดสอบการสร้างกิจกรรมการสร้างเอ็นไซม์เซลลูเลส อะไมเลส และเพคติเนส โดยประเมินจากค่า HC (hyhrolysis capacity) หรือ HC value ซึ่งได้จากค่าสัดส่วนของ hydrolysis zone และเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (Taechapoempol *et al.,* 2011) โดยคัดเลือกจากราไตรโคเดอร์ม่าทั้งหมด 29 ไอโซเลท (รายงานการทดลองสิ้นสุด ปี 2562 พยุงศักดิ์ และคณะ) จากการทดลอง พบว่าเชื้อราไตรโคเดอร์มาไอโซเลต TC14 สามารถสร้างเอ็นไซม์เซลลูเลสได้ในระดับสูงที่สุด จากนั้นจึงทำการคัดเลือกเชื้อราไตรโคเดอร์ม่าไอโซเลท TC14 มาใช้ในการผลิตเอ็นไซม์เซลลูเลสในระดับขวดเขย่า (shake flask-cultured technique) และผลิตผงเอ็นไซม์โดยวิธี freeze-dried method เพื่อนำผงเอ็นไซม์ไปใช้ในการทดสอบการควบคุมโรคพืชต่อไป ผลการทดลองที่กล่าวมา พอสรุปได้ว่าเชื้อราไตรโคเดอร์มาที่คัดเลือกและแยกได้มีศักยภาพในการสร้างเอ็นไซม์ได้ทั้งสามชนิด เพียงแต่ระดับความสามารถในการสร้างเอ็นไซม์ย่อยสลายแตกต่างกันและมีศักยภาพในการผลิตเป็นเอ็นไซม์ได้เพื่อนำไปใช้ศึกษาในการควบคุมโรคพืชต่อไปได้

กรมวิชาการเกษตร

Abstract

This study investigated cell-wall degrading enzyme activities, namely cellulase (in carboxy methyl cellulose (CMC), amylase in starch hydrolysed medium and pectinase in Czapek medium+1% pectin) in *Trichoderma* isolates for controlling activity of *Phytopththora* sp. causing root rot disease using dual culture method. Enzyme activities were determined by hydrolysis capacity (HC value) which was the ratio of the hydrolysis zone and colony diameter (Payungsak et al. 2020). The TC14 showed presence of highest amount of cellulase enzyme among other *Trichoderma* isolates studied in dual culture plate technique. Then, *Trichoderma* TC14 was used for powder-derived cellulase enzyme production by shake flask-cultured technique using Freeze-dried method. *Trichoderma*-producing cellulase shown in our experiment will further be used for plant disease control. Also, *Trichoderma* species studied showed the different capability in producing cell wall degrading enzymes. The results indicated that Tc14 may be showed the ability in inhibiting of the pathogenic fungi and can be developed to further exploitation in plant disease control.

โรครากเน่าโคนเน่าที่มีสาเหตุมาจากรา *Phytophthora* spp. เป็นปัญหาสำคัญในการเพาะปลูกพืชในพื้นที่ปลูกที่มีพืชเศรษฐกิจอาศัยอยู่หลายชนิด ทั้งระยะกล้าและต้นไม้ใหญ่ ส่งผลให้พืชดังกล่าวเกิดการสูญเสียมูลค่าทางเศรษฐกิจ และไม่เป็นที่ต้องการของตลาด โดยในปี พ.ศ. 2538-2542 ราไฟทอปธอรา (*P. palmivora*) ทำลายสวนทุเรียนกว่า 90,000 ไร่ ทำให้ผลผลิตลดลง 70,000 ตัน สร้างความเสียหายคิดเป็นมูลค่าทางเศรษฐกิจมากกว่า 750 ล้านบาท (ปัญจมา 2546, อมรรัตน์ 2556) พืชจะแสดงอาการต่างๆเช่น รากเน่า โคนเน่า ใบไหม้ เป็นต้น โดยเชื้อราสาเหตุโรคที่เกิดจาก *Phytophthora* spp. จะเข้าทำลายพืชอาศัยทั้งทางราก ลำต้น ใบ และผลหรือส่วนเหนือดิน โดยเชื้อจะเข้าสู่ระบบท่อน้ำของลำต้น ทำให้เกิดอาการที่เรียกว่า รากเน่า โคนเน่าที่ต้น กิ่ง และผล เกิดอาการเหี่ยวทั้งต้น ตั้งแต่ยอด ใบ บริเวณราก และโคนต้น ถูกทำลาย ดังกล่าว ที่เรียกว่า systemic infections (อมรรัตน์ 2556) เพื่อการเข้าทำลายของเชื้อราสาเหตุโรคดังกล่าว โดยเชื้อรา *Phytophthora* spp. จะสร้างโครงสร้างต่างๆ เพื่อแทงผ่านเนื้อเยื่อพืช และสร้างเอ็นไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์พืช โดยเอ็นไซม์ต่างๆ เพื่อให้เนื้อเยื่อพืชเกิดการเสื่อมสลาย หรือก่อโรคพืช (infection) เช่น เพคติคเอ็นไซม์ (pectic enzyme) , CAZymes (Carbohydratre-Active enZymes), cell wall degrading enzymes และ cellulytic enzymes เป็นต้น อย่างไรก็ตาม จากการศึกษา พบว่า เชื้อราไตรโคเดอร์ม่า มีคุณสมบัติในการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์และสามารถสร้างเอ็นไซม์เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราสาเหตุโรคพืช (plant pathogenic fungi) โดยชีววิธีได้ (biocontrol agent) ได้ วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ เพื่อศึกษาการผลิตเอ็นไซม์ย่อยสลายที่มีประโยชน์จากเชื้อราไตรโคเดอร์ม่าจากการคัดเลือกไอโซเลทของเชื้อราที่มีคุณสมบัติในการสร้างเอ็นไซม์บนอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวได้สูงสุดจำนวน 1 ไอโซเลท ได้แก่ Tc14 จากนั้นนำมาผ่านการผลิตเป็นเอ็นไซม์ชนิดผงโดยวิธี Freeze drying ในระดับห้องปฏิบัติการ ผลการทดลองพบว่าเชื้อรา Tc14 สามารถสร้างเอ็นไซม์เซลลูเลสได้ในปริมาณมาก และเพื่อนำไปใช้ต่อยอดในการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบของเชื้อราสาเหตุโรคพืชต่อไป

ศรีวิทยาการ

วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์ - ฟลาสต์ ขนาด 500 มิลลิลิตร ขวดแก้วแบบมีฝาปิด กระดาษกรอง
  - จานเพาะเชื้อ
  - ปุ่ยคอก
  - cork borer (ที่เจาะจุกยาง)
  - ห่วงเขี่ยเชื้อ
  - ด้ามใบมีดผ่าตัด ใบมีดผ่าตัด
  - เครื่อง Freeze drying CHRIST ALPHA 1-2 LD plus, Scientific promotion Co., LTD.

- สารเคมี - อาหารเชื้อ Carboxy methyl cellulose sodium salt
  - หลอดอาหารแข็งเอียง
  - 1% Conga red (สารละลายย้อมสีจุลินทรีย์)
  -Tryptone peptone glucose yeast extract (อาหารเลี้ยงเชื้อสารสกัดยีสต์)
  -Agar powder (ผงวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อ)
  - Czapek dox broth (อาหารเหลวเลี้ยงเชื้อซาเพ็ค)
  - Potato dextrose agar (วุ้นโปเตโต้เด็กซ์โตรสอาการ์)
  - Starch agar (ผงวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อ สตาร์ซอาการ์)
  - Lactobacillus MRS agar (อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS)
  - Iodine solution (สารละลายไอโอดีน)
  - Agar powder (ผงวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อ)
  - DNASE/RNASE free distilled water (น้ำกลั่นปลอดสารย่อย DNA/RNA)

1. การเก็บตัวอย่างเชื้อราสาเหตุโรคและไอโซเลทเชื้อราไตรโคเดอร์ม่า

การแยกเชื้อสาเหตุโรค เชื้อราปฏิปักษ์ และการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา โดยการเก็บตัวอย่างและคัดแยกไอโซเลทเชื้อราจนได้เชื้อบริสุทธิ์ โดยทัศนาพร และคณะ (สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืชกรมวิชาการเกษตร) เก็บรักษาเชื้อไว้ในอาหารแข็งเอียง (agar slants) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาใช้ต่อไป

2. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อรา

เตรียมอาหารแข็ง Potato dextrose agar (PDA) ตามคำแนะนำคู่มือผู้ผลิต และทำให้ปลอดเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที (Imarhiagbe et al. 2013) จากนั้นทำการคัดแยกราไอโซเลทต่างๆ

กรมวิชาการเกษตร

จาก stock culture โดยการใช้ sterile loop (aseptically) บนจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยวุ้นเชื้อราในลักษณะคว่ำจานเพาะเลี้ยงและบ่มจานเพาะเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง 28±2 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน

3. การคัดแยกเชื้อราที่มีคุณสมบัติในการสร้างเอ็นไซม์ย่อยสลาย

บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งโดยวิธี dual plate technique จนได้ชนิดไอโซเลทของเชื้อราที่มีคุณสมบัติการสร้างเอ็นไซม์ชนิดต่างๆ ได้แก่ เซลลูเลส อะไมเลส และเพคติเนส (รายงานการทดลองสิ้นสุด ปี 2562 พยุงศักดิ์และคณะ 2562) บนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ ที่ประกอบด้วย Carboxy methyl cellulose (CMC) , Starch agar (วุ้นอาหารแป้ง) และ Szapek + 1% เพคติน ตามคำแนะนำคู่มือผู้ผลิต ตามลำดับ

4. การทดสอบความสามารถในการสร้างเอ็นไซม์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวระดับขวดเขย่าชนิดสูตรน้ำ

- นำตัวอย่างเชื้อราไตรโคเดอร์ม่า Tc14 มาเพาะเชื้อในอาหาร PDA
- เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ carboxy methyl cellulose (CMC) ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ในฟลาสต์ขนาด 500 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ
- นำชิ้นวุ้นเชื้อราไตรโคเดอร์ม่า (agar plug) ไอโซเลท Tc14 จำนวน 5 ชิ้น ต่อ หนึ่งขวด
- เขย่าขวดทดลองที่ 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 31 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน
- เมื่อครบ 5 วัน นำอาหารเลี้ยงเชื้อนำมากรองผ่านกระดาษกรอง เพื่อเก็บรักษาน้ำใส (filtrated)
- ส่วนหนึ่งเก็บรักษาเติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อให้ได้ปริมาณสุดท้ายที่ 20%, 40%, 50% และ 80% ตามลำดับ โดยเก็บรักษาน้ำใสที่ได้จากการกรองมาเก็บรักษาที่ 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาดเล็ก
- ส่วนหนึ่งนำมาเทใส่ขวดแก้วแบบมีฝาปิด ปริมาตร 50 มิลลิลิตร
- นำขวดตัวอย่างไปแช่งแข็งที่อุณหภูมิ ลบ 80 องศาเซลเซียส

5. การทดสอบความสามารถในการสร้างเอ็นไซม์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวระดับขวดเขย่าชนิดสูตรผง

- เจาะชิ้นวุ้นอาหาร PDA ที่ประกอบด้วยไตรโคเดอร์ม่าไอโซเลท Tc14 จำนวน 5 ชิ้น
- บ่มไอโซเลทเชื้อราในอาหารเหลว CMC ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ในฟลาสต์ขนาด 500 มิลลิลิตร
- เขย่าอาหารเหลว CMC ในสภาพขวดเขย่าที่อุณหภูมิและสภาวะที่กำหนด
- จากนั้น นำมาใส่เครื่อง Freeze-drying (CHRIST ALPHA 1-2 LD plus, Scientific promotion Co., LTD. Crist, Germany) ตามคำแนะนำของคู่มือผู้ผลิต จนกว่าจะได้ส่วนผง ก่อนเก็บรักษาไว้ในขวดบรรจุที่อุณหภูมิลบ 80 องศาเซลเซียส

- เวลาและสถานที่ - ปีเริ่มต้น ต.ค. 2562 ถึง ปีสิ้นสุด ก.ย. 2563
  - สถานที่การทดลอง สทช.

ผลการทดลองและวิจารณ์

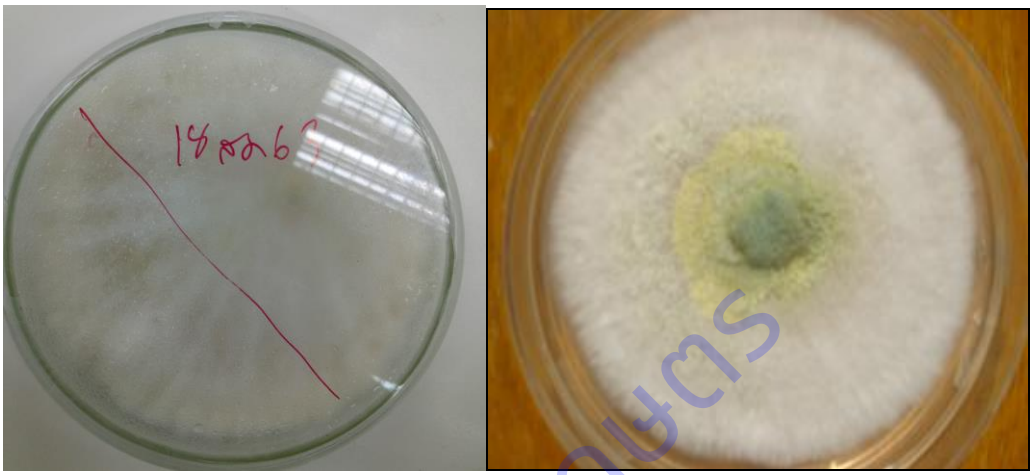
1.การเก็บตัวอย่างเชื้อราสาเหตุโรคและไอโซเลทเชื้อราไตรโคเดอร์มา

จากการคัดแยกตัวอย่างเชื้อราสาเหตุโรคและไอโซเลทเชื้อราไตรโคเดอร์มา (ทัศนาพร และคณะ) ลงบนอาหาร PDA พบว่า สามารถเชื้อทุกไอโวเลทยังเจริญเติบโตและได้จำนวนทั้งสิ้น 30 ไอโซเลท ให้ชื้อว่า T1 – TC30 และเก็บรักษาไว้ที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

กรมวิชาการเกษตร

2.ผลที่ได้จากการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อรา

จากการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อไตรโคเดอร์มา Popato dextrose agar (PDA) พบว่า ทุกไอโซเลทสามารถเจริยเติบโตได้ดีในขั้นตอนการสร้างเอ็นไซม์ โดยมีลักษณะเป็นเส้นใยฟูสีขาวและ/หรือสีเขียวเข้ม เต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 แสดงลักษณะเส้นใยไอโซเลทราไตรโคเดอร์มา TC1 และ TC14 บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ระยะเวลา 5 วัน อุณหภูมิห้อง

3.การคัดแยกเชื้อราที่มีคุณสมบัติในการสร้างเอ็นไซม์ย่อยสลาย

ผลที่ได้จากการคัดแยกและคัดเลือกเชื้อราไตรโคเดอร์มาโดยวิธี soil dilution plate บนอาหาร PDA ได้ไตรโคเดอร์มาจำนวน 30 ไอโซเลต เพื่อศึกษาการสร้างเอ็นไซม์ย่อยสลายจำนวน 3 ชนิด ได้แก่ เซลลูเลส อะไมเลส และเพคติเนส จากการทดสอบความสามารถในการสร้างเอ็นไซม์บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ (selective medium) โดยวิธีการวัดการเจริญเติบโตเฉลี่ยของราไตรโคเดอร์มาบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะตามค่าเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของเส้นใย พบว่า ราไตรโคเดอร์มาทุกไอโซเลต คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ สามารถสร้างเอ็นไซม์ย่อยสลายได้ทั้ง 3 ชนิด โดย ไตรโคเดอร์มาไอโซเลต T14 สามารถสร้างเอ็นไซม์เซลลูเลสได้ดีที่สุดบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะเกลือ CMC ไอโซเลต T22 สามารถสร้างเอ็นไซม์อะไมเลสได้ดีที่สุดบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะผงวุ้นแป้ง และ ไตรโคเดอร์มาไอโซเลต TC1 สามารถสร้างเอ็นไซม์เพคติเนสได้ดีที่สุดบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ Czapek ด้วยเหตุนี้ เซลลูเลสเป็นเอ็นไซม์ย่อยสลายหลักที่ไตรโคเดอร์มาสามารถสร้างได้จากคุณสมบัติในการสร้างเอ็นไซม์ย่อยสลาย

นำเชื้อราไตรโคเดอร์มาที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคโคนเน่ารากเน่าจากการทดลองที่ 1 อย่างน้อย 5 ไอโซเลต มาทดสอบการสร้างเอ็นไซม์เซลลูเลส ดังนี้ นำเชื้อรามาเลี้ยงลงบนอาหาร PDB เป็นเวลานาน 1 วัน เพื่อทดสอบความสามารถในการสร้างเอ็นไซม์ เช่น เซลลูเลส ทำการปิเปต สารละลายเชื้อ ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ลงในหลุมอาหารวุ้น CMC (carboxy methyl cellulose) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.8 เซนติเมตร โดยวิธี agar spot บ่มเป็นเวลา 3 วัน และ flood plate ด้วยสารละลาย congo red ความเข้มข้นร้อยละ 1 ให้ท่วมผิวหน้า

กรมวิชาการเกษตร

อาหาร ทิ้งไว้ 15 นาที และเทออก วัดเส้นผ่านศูนย์กลางการสร้างหรือเกิดบริเวณใส วงใสรอบโคโลนีต่ออัตราส่วนเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี หรือ ค่า HC (HC value) (เพชรลดาและกำไล 2556) และนำเชื้อราไตรโคเดอร์มาที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคโคนเน่ารากเน่าจากการทดลองที่ 1 อย่างน้อย 5 ไอโซเลต มาทดสอบการสร้างเอ็นไซม์เพคติเนส Czapek medium วัดเส้นผ่านศูนย์กลางการสร้างหรือเกิดบริเวณใส วงใสรอบโคโลนีต่ออัตราส่วนเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี หรือ ค่า HC (HC value) (เพชรลดาและกำไล 2556) (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 แสดงไอโซเลตราไตรโคเดอร์มาที่สามารถสร้างเอ็นไซม์เฉลี่ย (MEAN) สูงสุด 5 ไอโซเลตทั้งสามชนิดเอ็นไซม์ จากจำนวนราทั้งหมด 29 ไอโซเลต ตามขนาดวงใส การทดลองจำนวน 3 ครั้ง (replications)

ชนิดเอ็นไซม์	ชื่อไอโซเลตที่สร้างเอ็นไซม์ได้สูงสุด	ขนาดวงใสเฉลี่ยสูงสุด (เซ็นติเมตร)
เซลลูเลส	Tc14	7.13
	Tc18	6.40
	Tc24	6.40
	Tc13	6.13
	Tc17	5.93
อะไมเลส	Tc22	5.00
	Tc27	4.93
	Tc25	4.93
	Tc24	4.83
	Tc21	4.66
เพคติเนส	Tc1	7.73
	Tc23	6.90
	Tc27	6.80
	Tc30	6.70
	Tc26	6.60

กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 1 ลักษณะโคโลนี *Trichoderma* spp. อายุ 5 วัน บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

4.การทดสอบความสามารถในการสร้างเอ็นไซม์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวระดับขวดเขย่าชนิดสูตรน้ำ

ผลการทดลองในเบื้องต้นการผลิตงเอ็นไซม์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวระดับขวดเขย่าชนิดสูตรน้ำ โดยใช้เปอร์เซ็นต์ที่ระดับต่าง พบว่า เอ็นไซม์อายุ 5 วันที่ต้องการเก็บรักษา สามารถเก็บสภาพคงไว้ได้ที่ 20% 40% 50% และ 80% ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ อุณหภูมิที่เก็บรักษา -80 องศาเซลเซียส ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง 1.5 มิลลิลิตร อย่างไรก็ตาม คณะผู้วิจัยทดสอบการเก็บรักษาเอ็นไซม์ในเบื้องต้น พบว่า การสร้างเอ็นไซม์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CMC สามารถให้น้ำใส (filtrated enzyme) ได้สูงสุด เทียบกับ อะไมเลส และเพคติเนส ซึ่งจำเป็นต้องศึกษาเพิ่มเติมต่อไป หากต้องการข้อมูลเพิ่มเติม

5. ผลการผลิตเอ็นไซม์จากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวระดับขวดเขย่าชนิดสูตรผง ด้วยเครื่อง Freeze-dying

ภาพที่ 2 เอ็นไซม์เซลลูเลสจากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวระดับขวดเขย่าชนิดสูตรผง ด้วยเครื่อง Freeze-dying (CHRIST ALPHA 1-2 LD Plus, Scientific promotion Co., LTD. Christ, Germany)

กรมวิชาการเกษตร

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ผลที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่า เชื้อราไตรโคเดอร์ม่าจำนวน 29 ไอโซเลท ที่นำมาทดสอบการสร้างเอ็นไซม์เซลลูเลส อะไมเลส และเพคติเนส บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่ประกอบด้วย carboxy methyl cellulose, starch hydrolysed และ Czapek medium+1% pectin มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Phytophthorq* sp. โดยวิธี Dual culture ยิ่งกว่านั้น พบว่า Tc14 มีความสามารถในการสร้างเอ็นไซม์เซลลูเลสได้สูงที่สุด และมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Phytophthorq* sp. ดีที่สุด โดยไอโซเลทเชื้อราไอโซเลท TC14 เมื่อนำไปทดสอบการสร้างเอ็นไซม์ชนิดผง โดยวิธี freeze dried พบว่า สามารถผลิตเป็นผงเอ็นไซม์ได้ในปริมาณที่มากกว่าเอ็นไซม์อะไมเลส และเอ็นไซม์เพคติเนส ด้วยเช่นกัน แม้ว่าราไตรโคเดอร์ม่ามีความสามารถในการสร้างเอ็นไซม์อะไมเลส และเพคติเนส แต่ได้ปริมาณที่น้อยกว่าในเบื้องต้น ซึ่งน่าจะขึ้นอยู่กับชนิดไอโซเลทของเชื้อรา หรืออาจต้องมีการปรับสภาพการทำ freeze dried ดังนั้น จากที่กล่าวมาข้างต้น เชื้อราไตรโคเดอร์ม่าที่ได้จากงานวิจัย มีความน่าสนในที่จะนำไปศึกษาต่อเกี่ยวกับวิธีการสกัดและชนิดเอ็นไซม์ได้ทั้งสามชนิดที่ไตรโคเดอร์ม่าที่ใช้ในการศึกษาสร้างขึ้นมา โดยเฉพาะเอ็นไซม์เซลลูเลส เพื่อพัฒนานำไปสู่การ

ใช้ประโยชน์ต่อไป เพื่อทดแทนวิธีการควบคุมศัตรูพืชด้วยวิธีอื่นๆ ที่มีราคาที่สูงกว่าแต่มีประสิทธิภาพที่น้อยกว่า.

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ : 1. ผลงานที่สิ้นสุด สามารถนำไปใช้ประโยชน์โดยการนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ในการพัฒนาต่อหรือถ่ายทอด เผยแพร่ หรือประยุกต์ใช้เพื่อนำไปใช้ประโยชน์กับกลุ่มเป้าหมายที่เป็นเกษตรกร และนักวิชาการในสาขาวิชาการที่เกี่ยวข้องต่อไปได้

2. **คำขอบคุณ** : ขอขอบคุณนายอนุชา สุขสังวาลย์ นักวิชาการเกษตร กลุ่มวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร ที่ให้ความช่วยเหลือจัดเตรียมอุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมีงานทดลองในห้องปฏิบัติงานวิจัยจุลชีววิทยา จัดเตรียมสถานที่ปฏิบัติงานวิจัยและเก็บบันทึกข้อมูล ขอขอบคุณกรมวิชาการเกษตรที่สนับสนุนงบวิจัยเพื่อดำเนินการวิจัย

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 2.3..การทดสอบประสิทธิภาพของเอ็นไซม์ในการกระตุ้นความต้านทานเชื้อราสาเหตุโรคที่เกิดจาก Phytophthora ของพริก

Enzymes Efficiency Testing in Resistant Stimulating against Plant Pathogenic Fungi causing Root Rot Disease on Chilli plant

พยุงศักดิ์ รวยอารี ทัศนาพร ทัศคร
ภรณี สว่างศรี นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด

คำสำคัญ (Key words)
ไตรโคเดอร์มา
Trichoderma species

บทคัดย่อ

แยกเชื้อราไฟทอปธอรา (Phytopthora spp.) สาเหตุโรครากเน่าจากตัวอย่างมะเขือเทศที่แสดงอาการของโรค และนำมาทำการแยกเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose (PDA) ในพื้นที่จังหวัดกาญจนบุรี ระยะเวลาที่ทำการวิจัย เดือนกรกฎาคม – กันยายน พ.ศ. 2564 จากนั้นทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคบนใบพริก และศึกษาประสิทธิภาพของเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา Trichoderma spp. ไอโซเลท TC14 ที่ระดับความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร 3 กรัมต่อลิตร และ 5 กรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าของพริกในเรือนทดลอง ผลการทดลอง พบว่าที่ 24 ชั่วโมง ภายหลังการปลูกเชื้อ สังเกตพบการเกิดรอยโรคที่ผิวใบในกลุ่มควบคุมและกลุ่มกรรมวิธี จากการศึกษาครั้งนี้ แนะนำให้ศึกษาประสิทธิภาพของเอนไซม์เซลลูเลสในการควบคุมโรคไฟทอปธอราที่ระยะเวลาที่นานขึ้น หลังการปลูกเชื้อที่หลังการทดลอง 3, 5 และ 7 วัน

ABSTRACT

Phytophthora spp. was isolated from the มะเขือ diseased samples in Kanchanaburi. The cellulase enzyme of Trichoderma spp. at concentration of 1, 3 and 5 gram per liter, were tested for the effectiveness of controling of root-rot disease caused by in small plot field. Phytophthora spp. in chili was studied. The results showed that at twenty-four hours after fungal inoculation on leaves, at least, we observed a small size of disease legion in control chili leaves. However, in our study, we suggest to further observe disease occurrence and the cellulase enzyme efficiency in controlling Phytophthora disease at 10 days after inoculation.

บทนำ

ปัจจุบันการศึกษาถึงการนำเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ มาใช้ในการควบคุมโรคพืชด้วยชีววิธี (biocontrol agents) มีวัตถุประสงค์เพื่อป้องกันโรคพืชที่สำคัญ โดยเฉพาะการใช้เชื้อรา *Trichoderma* spp. นั้น พบว่ามีการศึกษาการนำมาใช้ประโยชน์ในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืช และทำลายเชื้อสาเหตุโรคพืชที่สำคัญมากมายอย่างต่อเนื่องเป็นเวลานานในประเทศไทย ซึ่งวิธีการนำเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไปใช้ควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี มี

กรมวิชาการเกษตร

หลากหลายวิธี เช่น การคลุกเมล็ด การรองก้นหลุม การผสมกับวัสดุปลูก การหว่านลงดิน การให้ไปกับระบบน้ำ การทาแผลและการฉีดพ่น (จิระเดช และ วรรณวิไล, 2542) เป็นต้น

เชื้อรา Trichoderma (*Trichoderma spp.*) เป็นจุลินทรีย์ชั้นสูงชนิดหนึ่งที่มีประโยชน์ จัดเป็นเชื้อราที่เจริญได้ดีในดิน เศษซากพืชซากสิ่งมีชีวิตต่างๆ รวมทั้ง จุลินทรีย์ และวัสดุอินทรีย์ตามธรรมชาติ (soil saprophyte) จากการศึกษาในการคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรค มีกลไกในการต่อสู้กับเชื้อสาเหตุโรคอยู่ 4 ประการได้แก่ 1. การแข่งขันอาหารและปัจจัยจ่างๆของเชื้อโรคส่งผลให้เชื้อราก่อโรคสลายและตายไปในที่สุด (จิระเดช 2546) 2. การเป็นปรสิตหรือเชื้อราปฏิปักษ์ที่สามารถควบคุมเชื้อราที่เป็นเชื้อสาเหตุโรคพืชได้ โดยเชื้อราไตรโคเดอร์มาจะเข้าทำลายเส้นใยเชื้อราก่อโรคโดยการพันและการแทงเข้าไปทำลาย ทำให้เส้นใยเหี่ยวแฟบและย่อยสลายไป (จิระเดช 2546) 3. การสร้างสารยับยั้งหรือทำลายโรคพืช เช่น เอ็นไซม์ และ 4.การชักนำหรือกระตุ้นให้พืชมีความต้านทานโรค เช่น สร้างเอ็นไซม์ให้พืชเกิดความต้านทานต่อโรคได้ (วันทนีย์ 2547) โดยประโยชน์ของเชื้อรา *Trichoderma* ที่มีโดยตรง ได้แก่

1.การลดกิจกรรมของเชื้อราสาเหตุโรคพืช

2.การลดปริมาณเชื้อราสาเหตุโรคพืช

3.การเพิ่มการเจริญเติบโตของพืช

เชื้อราสาเหตุโรคพืชที่เชื้อรา *Trichoderma* สามารถควบคุมได้ มีดังต่อไปนี้ 1.เชื้อราไฟธอพธอร่า 2.เชื้อราไรซ็อคโทเนีย 3.เชื้อราพิเธียม 4. เชื้อราฟิวซาเรียม และ 5.เชื้อราสเคลอโรเทียม เชื้อราสาเหตุทั้งหมดเป็นสาเหตุของโรคเน่าในพืชเจ้าบ้านที่แตกต่างกันออกไป

กลไกสำคัญของเชื้อรา Trichoderma ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืช (Mode of actions) คือ

1. การแข่งขันกับเชื้อราสาเหตุโรคพืช โดยเชื้อรา *Trichoderma* สามารถเจริญสร้างเส้นใยได้รวดเร็ว สร้างสปอร์ได้ในปริมาณที่สูง โดยอาศัยอาหารจากเศษซากพืชวัสดุต่างๆ ซึ่งทำให้เชื้อราสามารถเจริญแข่งขันกับเชื้อราสาเหตุโรคพืชหรือเชื้อจุลินทรีย์อื่นได้ (competition)
2. การเป็นปรสิต (parasitism) ต่อเชื้อราสาเหตุโรคพืช โดยเชื้อรา *Trichoderma* สามารถใช้เส้นใยพันรัดเส้นใยเชื้อราโรคพืช แล้วสร้างเอ็นไซม์ไคติเนส เซลลูเลส อะไมเลส และกลูคาเนส ซึ่งมีคุณสมบัติในการย่อยสลายเฉพาะกับผนังเส้นใยเชื้อราโรคพืช (Vinale *et al.* 2008) จากนั้นจึงเจริญเข้าไปภายในเส้นใยเชื้อรา จึงทำให้เชื้อราโรคพืชตายหรือลดปริมาณของเชื้อในดินลงได้
3. การสร้างสารยับยั้งหรือทำลายเชื้อราสาเหตุโรคพืช โดยเชื้อรา *Trichoderma* สามารถสร้างสารปฏิชีวนะ สารพิษ และเอ็นไซม์ เพื่อหยุดยั้งหรือทำลายเฉพาะเส้นใยเชื้อราโรคพืช
4. การชักนำให้พืชมีความต้านทานโรค โดยเชื้อรา *Trichoderma* สามารถชักนำให้พืชสร้างกระบวนการผลิตสารประเภทเอ็นไซม์หรือโปรตีน ซึ่งมีส่วนช่วยให้พืชเกิดความต้านทานโรคได้

ดังที่ได้กล่าวข้างต้น โดยการมีคุณสมบัติของการเป็น mycoparasite (ความสามารถในการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์กับเชื้อราสาเหตุโรค) โดยใช้เส้นใยขดเป็นวงรอบๆ เส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคพืช จากนั้นเข้าไปเจริญในเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้โดยการย่อยผนังเซลล์ แล้วใช้อาหารจากเชื้อราสาเหตุโรคพืช เชื้อรา Trichoderma เจริญได้ดีในดินที่มีความชื้นแต่ไม่แฉะ สามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์จากดินธรรมชาติได้ง่าย ขยายพันธุ์โดยการสร้างสปอร์ นำมาเพาะเลี้ยงจะเห็นเส้นใยและสปอร์สีเขียว อยู่รวมกันเป็นกลุ่มก้อน ได้อธิบายลักษณะของเชื้อราชนิดนี้ไว้ว่า เป็นเชื้อราที่เจริญรวดเร็วบนอาหารหลายชนิด สร้าง conidiophore ที่แตกกิ่งก้านสาขา โดยที่ปลาย conidiophore มีโครงสร้างกำเนิด conidium หรือ spore เรียกว่า phialide รูปร่างคล้ายลูกโบว์ลิ่ง conidium ซึ่งเกิดจากปลาย phialide จะรวมกันเป็นกลุ่มก้อน (slime head) เห็นเป็นสีเขียวหรือใส (hyaline) ส่วนระยะสมบูรณ์เพศ หรือ teleomoph ของเชื้อรา Trichoderma คือ เชื้อราในจีนัส Hypocrea หรือจีนัสอื่นๆ ที่

กรมวิชาการเกษตร

ใกล้เคียงกัน สามารถพบได้ทั่วไปในดินที่มีความอุดมสมบูรณ์และมีอินทรีย์วัตถุอาศัยเศษซากพืชและสัตว์เป็นแหล่งอาหาร พบว่าในดินที่ปราศจากแหล่งอาหาร เชื้อราชนิดนี้สามารถอยู่รอดได้นานกว่า 130 วัน เชื้อรา *Trichoderma* จัดเป็นเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงในการเจริญแข่งขันกับเชื้อราสาเหตุโรคพืช เนื่องจากมีการเจริญเติบโตและเพิ่มปริมาณได้อย่างรวดเร็ว และสามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้ในที่มีอุณหภูมิเย็นจัดประมาณ 10-12 องศาเซลเซียส (กณิษฐา และคณะ , 2543)

จากการศึกษาการใช้เชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่แยกได้จากถุงวัสดุเพาะเห็ดและก้อนเชื้อเห็ดที่ปนเปื้อนจากฟาร์มเพาะเห็ดต่างๆ 9 จังหวัด ได้แก่ จ. นครปฐม ราชบุรี เชียงราย ลพบุรี พังงา นครศรีธรรมราช สุราษฎร์ธานี อุดรธานี และสกลนคร สามารถแยกเชื้อรา *Trichoderma*. spp. จากก้อนเชื้อเห็ดได้ทั้งหมด 100 ไอโซเลท จากนั้นนำเชื้อราที่แยกได้ทั้งหมดมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Phomopsis asparagi* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ซึ่งสามารถ คัดเลือกได้เชื้อรา *T.* spp. ที่มีประสิทธิภาพดี จำนวน 18 ไอโซเลท และได้ทำการจำแนกชนิดของเชื้อรา *T.* spp. พบว่า ทุกไอโซเลทที่คัดเลือกได้ คือ เชื้อรา *T. hazianum* จึงได้คัดเลือกเชื้อเพื่อทดสอบในสภาพเรือนทดลอง จำนวน 5 ไอโซเลท ได้แก่ TS15, TS29, TS31, TS33 และ TS38 โดยการทดสอบได้มีการใช้เชื้อรา *T. hazianum* ร่วมกับก้อนเชื้อเห็ดหมัก ซึ่งจากการทดลองพบว่า เชื้อรา *T. hazianum* ไอโซเลท TS29 และ TS31 มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดโรคลำต้นไหม้ได้ดีในสภาพเรือนทดลอง ที่หลังการทดลอง 10 วัน พบเปอร์เซ็นต์โรคลำต้นไหม้เท่ากับ 10.07 และ 15.72 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีปลูกเชื้อสาเหตุโรคเพียงเดียว มีเปอร์เซ็นต์โรคลำต้นไหม้เท่ากับ 42.54 เปอร์เซ็นต์ (ทัศนาพร และคณะ, 2550)

การศึกษาการนำเอ็นไซม์ที่เชื้อรา *Trichoderma* สามารถผลิตหรือสร้างขึ้นมาได้ มาใช้ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชจึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจ จากการศึกษาพบว่า เอ็นไซม์อะไมเลสและเซลลูเลสผลิตได้จาก *Trichoderma* (Reddy, et al., 2015) เอ็นไซม์เพคติเนส สามารถควบคุมโรคโคนเน่ารากเน่า ที่เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora infestans* (Adorado, et al., 2000) นอกจากนี้ยังมีการใช้เอ็นไซม์เซลลูเลส ในการควบคุมเชื้อรา *Phytophthora cinnamomi* (Pond, et al., 2001) ซึ่งการใช้เอ็นไซม์เซลลูเลสและเพคติเนส ในการควบคุมโรคแคงเกอร์ (Apricot canker) ที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Hendersonula toruloidea* และ *Phiaoacremonium aleophillium* (Nidhal and Morad, 2013) เป็นต้น นอกจากนี้ เอ็นไซม์ที่เชื้อรา *Trichoderma* สามารถผลิตเอ็นไซม์ได้ เช่น *Trichoderma viride* (Mahmood, S., and Rahman, S.R. 2008) , (*Trichoderma harzianum* (Nabi, et al., 2003.) *Trichoderma longibrachiatum* (Sandhu and Kalra, 1982) และ *Trichoderma reesei* QM 9414 (Tomme, 1988) เป็นต้น

ดังที่ได้กล่าวข้างต้น การศึกษาการควบคุมโรคโคนเน่ารากเน่าที่มีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Phytophthora* spp. นั้น มีการนำเชื้อรา *Trichoderma* มาใช้ในการป้องกันกำจัดอย่างมากมาย หลากหลายวิธีการ แต่งานวิจัยเกี่ยวกับการใช้เอ็นไซม์ย่อยสลายจากเชื้อรา *Trichoderma* ใช้เพื่อควบคุมโรคโคนเน่ารากเน่านั้น ยังมีอยู่อย่างจำกัดในประเทศไทย ดังนั้น เพื่อเป็นการศึกษาหาเอ็นไซม์ที่มีประโยชน์ที่เชื้อราปฏิปักษ์สามารถสร้างขึ้น จึงเป็นงานที่น่าสนใจและนำไปสู่นวัตกรรมใหม่ในการป้องกันกำจัดโรคพืช

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาถึงการครอบครองรากพืชของเชื้อรา *Trichoderma* spp. โดยการผสมเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในดินสำหรับปลูกข้าวโพด ถั่วลิสงและยาสูบ พบว่าพืชสร้างเอ็นไซม์เป็นปริมาณมาก จึงส่งผลให้พืชมีความต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคได้ (Engelberth et al., 2003) โดยการสร้างสารเคมีส่งสัญญาณ คือ salicylic acid (SA) และ jasmonic acid (JA) สารทั้งสองจะถูกลำเลียงไปยังส่วนต่างๆ ของพืชและไปกระตุ้นการทำงานของ R gene (Wasternack et al., 2006) ซึ่งมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตัวเองของพืช เช่น PR genes ทำหน้าที่สังเคราะห์ PR-proteins (Pathogenesis Related Proteins) โดย PR-proteins ซึ่งมีหลายชนิด

กรมวิชาการเกษตร

ด้วยกัน เช่น CWDE (Cell Wall Degrading Enzymes) ที่ *Trichoderma* สร้างได้เอง เช่น chitinase , cellulose, xylanase, amylase, pectinase, glucanase (b-1,3 glucanase; b-1,4-glucanase), lipase, arabinase และ protease เป็นต้น โดยความสามารถที่เชื้อรา *Trichoderma* สามารถสร้างเอ็นไซม์ย่อยสลายต่างๆเหล่านี้ จะเกิดปฏิสัมพันธ์ (interact) ในเชิงปฏิปักษ์ (antagonist) และ การเป็นปรสิต (parasite) โดยเฉพาะกับเชื้อราสาเหตุโรคเท่านั้น (Vinale et al., 2008)

นอกเหนือจากการสร้างเอ็นไซม์ย่อยสลายที่มีผลต่อเชื้อราสาเหตุโรคดังกล่าว PR-proteins ที่ *Trichoderma* สร้างได้ยังมีคุณสมบัติกระตุ้นให้เกิดการสร้าง secondary compound เช่น nicotine สารจำพวก phenolic compounds และสาร proteinase-inhibitors ซึ่งเป็นสารต่อต้านแมลง (Heil and Bostock, 2002) ส่งผลให้พืชสามารถต่อต้านได้ทั้งเชื้อรา แบคทีเรีย ไวรัส ไส้เดือนฝอยและแมลง (Jones and Takemoto, 2004)

นอกจากคุณสมบัติในการกระตุ้นการสร้าง PR-protein ดังกล่าวข้างต้น เชื้อรา *Trichoderma* ยังส่งเสริมการเจริญเติบโตของรากพืชและช่วยให้พืชดูดซึมแร่ธาตุอาหารได้ดีขึ้น (Harman et al., 2004) เชื้อรา *Trichoderma* spp. เมื่อมีการเจริญบนบริเวณรากพืชจะกระตุ้นให้พืชมีการเจริญเติบโต และมีความต้านทานโรคที่ดีขึ้น และก่อให้เกิดกระบวนการกระตุ้นความต้านทานแบบทั่วต้น (induce systemic resistance, ISR) โดยทำให้ปริมาณของ jasmonic acid (JA) และ ethylene (ET) เพิ่มขึ้น และก่อให้เกิดการแสดงออกของยีน อย่างไรก็ตาม การศึกษากลไกต่างๆที่สำคัญ ที่ทำให้เชื้อรา *Trichoderma* spp. สามารถกระตุ้นให้พืชสร้างความต้านทานต่อเชื้อราสาเหตุโรคต่างๆ โดยการใช้เอ็นไซม์ชักนำให้พืชเกิดความต้านทานนั้นยังมีรายงานการศึกษาน้อย ถึงการใช้เอ็นไซม์ที่เชื้อรา *Trichoderma* spp. สามารถสร้างได้ และนำมาใช้ประโยชน์โดยนำมาใช้เป็นกลไกชักนำให้พืชเกิดความต้านทานต่อโรคโคนเน่ารากเน่า ที่เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora* spp. เช่น โรครากเน่าโคนเน่าทุเรียน ส้ม ยางพารา พริก มะเขือเทศ และมันสำปะหลัง เป็นต้น

จากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่า มีการศึกษาการใช้เอ็นไซม์เพื่อใช้ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชและชักนำหรือกระตุ้นความต้านทานต่อโรคพืช เช่น ไคติเนส เซลลูเลส อะไมเลส และกลูคาเนส เป็นต้น ทั้งนี้ เพื่อเพื่อเพิ่มองค์ความรู้วิธีการศึกษาการผลิตและการใช้เอ็นไซม์ย่อยสลายจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. มาใช้ในการชักนำความต้านทานโรคหรือควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชรากเน่าโคนเน่า วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ เพื่อศึกษาการผลิตเอ็นไซม์ย่อยสลายที่เชื้อรา *Trichoderma* spp. สามารถสร้างได้ และนำไปใช้ในชักนำให้พืชเกิดความต้านทานและควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืช เพื่อลดหรือทดแทนการใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัดโรคพืชของเกษตรกร ซึ่งเป็นแนวทางที่ปลอดภัยและยั่งยืนต่อเกษตรกรและสภาพแวดล้อมต่อไป

ระเบียบวิธีวิจัย

- อุปกรณ์

- ระบุอุปกรณ์ที่สำคัญ เช่น อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA อุปกรณ์เจาะจุกยาง (cork borer) จานอาหารเลี้ยงเชื้อ พริกพันธุ์พริกพวาน กระบอกฉีดน้ำ ถุงพลาสติกใส ปากกามาร์คเกอร์ เทปกาว ดินตราอาหลี ถาดหลุมเพาะพันธุ์พืช

- วิธีการ - วิธีการ ระบุชื่อการทดลอง เช่น แผนการทดลอง Experimental design) การปลูก การดูแลรักษา และวิธีปฏิบัติอื่น ๆ รวมทั้งการบันทึกข้อมูล

การทดลองที่ 1 การทดสอบประสิทธิภาพของเอ็นไซม์ในการกระตุ้นความต้านทานเชื้อราสาเหตุโรคที่เกิดจากเชื้อรา Phytophthora spp. ของพริก

วิธีดำเนินการวิจัย

1.1 เตรียม Trichoderma spp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

- เตรียมเชื้อรา Trichoderma จำนวน 29 ไอโซเลท (ที่ได้จากงานวิจัยปี 2562-2563) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 13.5 กรัม/500 มิลลิลิตร เก็บรักษาในหลอดอาหารเอียง (slant PDA) อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน หรือจนกว่าเชื้อราจะเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ นำเส้นใยเชื้อราบริสุทธิ์มาทำการทดลองส่วนหนึ่งและเก็บรักษาเป็น stock culture นำเชื้อรามาใช้ศึกษาในการทดสอบประสิทธิภาพของเอ็นไซม์ในการยับยั้งเชื้อรา Phytopthora spp.

1.2 การสกัดเอ็นไซม์เซลลูเลส

ขั้นตอนการผลิตเอ็นไซม์ในเครื่องสกัดเอ็นไซม์ เอ็นไซม์เซลลูเลสผ่านกระบวนการฟรีซดราย โดยใช้เครื่อง FD200 Buchi ภายใต้สภาวะภายในเครื่องอุณหภูมิ ลบ 40 องศาเซลเซียส ความดันอากาศ 30 PA Condenser ลบ 40 องศาเซลเซียส อุณหภูมิของ product ลบ 20 องศาเซลเซียส Temp product out 28 เซลเซียส ความดัน Passzervaccum 30pa เวลา Runtime 72 ชั่วโมง ผงบรรจุภัณฑ์ในถุงสุญญากาศไม่โดนแสง ตามคำแนะนำคู่มือผู้ผลิต

1.3 เก็บตัวอย่าง และบันทึกลักษณะอาการของมะเขือที่แสดงอาการของโรครากเน่าโคนเน่า แยกเชื้อจากผลมะเขือ โดยตัดบริเวณปลายเส้นใยที่มีการเจริญของเชื้อราออก นำไปแยกเลี้ยงลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) บ่มที่ 25 องสาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน เก็บรักษา stock culture ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.4 การทดสอบการยับยั้ง Phytopthora spp.ด้วยเอ็นไซม์จากเชื้อราไตรโคเดอร์มา เพื่อใช้ในการควบคุมโรคในระดับเรือนทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (completely randomized block design) 5 กรรมวิธีๆ ละ 3 ซ้ำ (ถาดหลุมเพาะต้นพริก) กรรมวิธีการทดลอง มีดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 เอ็นไซม์เซลลูเลส 1 กรัม/ลิตร นาน 5 วัน ก่อนการปลูกเชื้อ

กรรมวิธีที่ 2 เอ็นไซม์เซลลูเลส 3 กรัม/ลิตร นาน 5 วัน ก่อนการปลูกเชื้อ

กรรมวิธีที่ 3 เอ็นไซม์เซลลูเลส 5 กรัม/ลิตร นาน 5 วัน ก่อนการปลูกเชื้อ

กรรมวิธีที่ 4 ปลูกเชื้อราสาเหตุโรคโคนเน่ารากเน่าโดยวิธีแปะชิ้นวุ้นเชื้อราสาเหตุโรคบนใบพริกทดสอบ นาน 5 วัน

กรรมวิธีที่ 5 น้ำกลั่น (ไม่ใส่เชื้อ)

วิธีการดำเนินงาน ดังนี้

กรมวิชาการเกษตร

เตรียมดินอบนึ่งฆ่าเชื้อแล้วบรรจุในถาดเพาะเมล็ด 15 หลุม เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 นิ้ว เพาะลงดิน และปฏิบัติตามกรรมวิธีกำหนด ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งรา Phytopthora spp.ต่อเอ็นไซม์เซลลูเลส แบ่งตามระดับความเข้มข้นของเอ็นไซม์ ได้แก่ความเข้มข้น 1, 3 และ 5 กรัม/ลิตร โดยใช้เอ็นไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา Trichoderma ตามอัตราส่วนที่กำหนด ใช้ชิ้นวุ้นเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าลงบนใบพนิก 2 ใบ ต่อ ถาดหลุม

การบันทึกข้อมูล

วัดขนาดของแผลที่เกิดขึ้นภายหลังการปลูกเชื้อโดยวิธี ที่ 24 ชั่วโมง ลงบนใบพริก ตามขนาดกว้างxยาว ในแต่ละกรรมวิธี

- เวลาและสถานที่ - ห้องปฏิบัติการและเรือนทดลองสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร แปลงทดลองมะเขือเปราะเกษตรกร จังหวัดนครปฐมปฐมกาญจนบุรี เริ่มต้นการทดลองตั้งแต่เดือนตุลาคม 2563 ถึง กันยายน พ.ศ. 2564

ภาพที่ 1 การเจริญของไฟทอปธอรา *Phytophthora capcisi*. บนใบพริก *Capsicum annuum* L. ในภาพแสดงชุดควบคุมที่ใส่น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ (a) การเจริญของต้นพริกที่ปลูกเชื้อด้วยไฟทอปธอรา (b) การเจริญของราไฟทอปธอราที่ถูกยับยั้งด้วยเอ็นไซม์เซลลูเลส Tc14 ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (c) ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (d) ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร (e) ภายหลังการปลูกเชื้อที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง

ตารางที่ 1 การทดสอบประสิทธิภาพของเอ็นไซม์เซลลูเลส Tc14 ภายหลังการให้เอ็นไซม์เซลลูเลส TC14 ในการควบคุมเชื้อราไฟทอปธอราบนใบพริกที่ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร 3 กรัมต่อลิตร และ 5 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 5 วัน ก่อนการปลูกเชื้อ ตามกรรมวิธีที่กำหนดระยะเวลา 24 ชั่วโมง หลังการปลูกเชื้อ วัดการเกิดโรคที่ใบ (ตารางเซ็นตริเมตร) บันทึกผลการทดลองที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง หลังการปลูกเชื้อ

กรรมวิธี	การประเมินความรุนแรงของโรค								
	ซ้ำที่ 1			ซ้ำที่ 2			ซ้ำที่ 3		
	วันที่ 1	วันที่ 3	วันที่ 5	วันที่ 1	วันที่ 3	วันที่ 5	วันที่ 1	วันที่ 3	วันที่ 5
พ่นเอ็นไซม์ 1 กรัมต่อลิตร	1.5	1.7	2	1.5	1.8	1.6	1.6	1.8	2
พ่นเอ็นไซม์ 3 กรัมต่อลิตร	1.5	1.7	2	1.6	1.8	1.6	1.6	1.8	2
พ่นเอ็นไซม์ 5 กรัมต่อลิตร	1.6	1.7	2	1.6	1.7	1.6	1.6	1.7	1.93
เชื้อไฟทอปธอรา (control)	1.5	1.8	1.6	1.5	1.8	1.5	1.5	3.8	1.6

หมายเหตุ 1/ = ค่าเฉลี่ยระดับความรุนแรงของโรค จากการประเมินโรค จำนวน 18 ต้น/ซ้ำ ทั้งหมด 3 ซ้ำ
โดยคำนวณระดับความรุนแรงของโรคตามขนาดรอยแผลของรอยโรค กว้างxยาว (ตารางซม.)

กรมวิชาการเกษตร

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราไฟทอปธอราในใบพริก (*Capsicum annuum* L.) ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสไอโซเลท TC14 ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง 3 วัน และ 5 วัน ในเบื้องต้น ในเบื้องต้นเราสังเกตพบรอยโรคปรากฏที่ผิวใบพริกในทุกกรรมวิธี จากการทดลองครั้งนี้ เราแนะนำให้ทำการศึกษาประสิทธิภาพการควบคุมโรคให้นานขึ้น เช่น ที่ 7 วัน 10 วัน 14 เพื่อศึกษาการเกิดรอยโรคของไฟทอปธอราในกลุ่มกรรมวิธีเทียบกับกลุ่มควบคุมต่อไป เพื่อให้ปรากฏผลการทดลองชัดเจนยิ่งขึ้น

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ผลงานวิจัยที่ได้ นำไปใช้ประโยชน์ให้กับนักวิชาการ นักวิจัยในสาขาวิจัยที่เกี่ยวข้อง โดยการพัฒนาต่อยอดจากข้อมูลงานวิจัยที่ได้ หรือสามารถปรับใช้เพิ่มเติมเพื่อเผยแพร่ต่อไปได้ ส่วนกลุ่มเป้าหมายนั้น เกษตรกรสามารถได้พันธุ์พืชที่ดี ปลอดโรคต่อไป เป็นต้น

กรมวิชาการเกษตร

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

เชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถผลิตเอ็นไซม์ที่นำมาใช้ประโยชน์ในการควบคุมศัตรูพืชได้ เอ็นไซม์ไคติเนสเป็นเอ็นไซม์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงศัตรูพืช สามารถผลิตได้จากเชื้อราเมตาไรเซียมและบิววาเลีย จึง

ทำการศึกษาการผลิตไคติเนสจากเชื้อราดังกล่าว พบว่าเอ็นไซม์ไคติเนสที่ผลิตได้มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญเติบโตและทำให้หนอนกระทู้ผักตายได้ เมื่อนำไปทดสอบในแปลงคะน้าพบว่ามีประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนกระทู้ที่เข้าทำลายคะน้าได้ การผลิตเอนไซม์เพื่อการย่อยสลายจำนวน 3 ชนิด ได้แก่ เซลลูเลส อะไมเลส และเพคติเนสสามารถผลิตได้จากเชื้อราไตรโคเดอร์มาสปีชีส์ (*Trichoderma* species) ได้ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อการควบคุมโรคพืช โดยได้ศึกษาประสิทธิภาพของเอนไซม์เซลลูเลสในการควบคุมโรคไฟทอปธอราบนใบพริก พบว่าที่ 24 ชั่วโมง ภายหลังการปลูกเชื้อ สังเกตพบการเกิดรอยโรคที่ผิวใบในกลุ่มควบคุมและกลุ่มกรรมวิธี จากการศึกษาครั้งนี้ จึงแนะนำให้การศึกษาประสิทธิภาพของเอนไซม์เซลลูเลสในการควบคุมโรคไฟทอปธอราครั้งต่อไปที่ระยะเวลาที่นานขึ้นหลังการปลูกเชื้อที่หลังการทดลอง 10 วัน

ข้อเสนอแนะที่ได้จากการวิจัย

ควรมีการวิจัยต่อไปดังนี้

1.ศึกษารูปแบบเอ็นไซม์ที่เหมาะสมในการใช้ในภาคการเกษตร

2.ศึกษาการผลิตเอ็นไซม์จำนวนมากเพื่อขยายออกสู่เกษตรกรต่อไป

กรมวิชาการเกษตร

เอกสารอ้างอิง

กิจกรรมที่ 1 เอ็นไซม์ควบคุมแมลง

ทิพย์วดี อรรถธรรม. 2549. ไวรัสของแมลง: นิวคลีโอโดลิฮีโดรไวรัส. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อิศเรศ เทียนทัด อนุสรณ์ พงษ์มี และ นันทนัช พินศรี. 2560. การใช้ไวรัส NPV ในการควบคุมหนอนกระทู้ผักในหอมหัวใหญ่ หน้า 2079-2087 ใน รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2560 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Binod, P., R.K. Sukamaran, S.V. Shirke, J.C. Rajput and A. Pandey. 2007. Evaluation of fungal

culture filtrate containing chitinase as a biocontrol agent against Helicoverpa armigera. J. of Applied Micrology. 103:1845-1852

Karthik, N., K. Akanksha, P. Binod abd A. Pandey. 2014. Production, purification and properties of fungal chitinase. Indiean Journal of Experiment Biology. 52: 1025-1035.

Kramer, K. L. and S. Muthikrishnan, 1997. Insect Chitinases: Molecular biology and potential use as pesticides. Insect Biochem. Molec. 27: 887-900.

Rustiguel, C.B., J.A. Jorge and L.H.S. Guimaraes. 2012. Optimization of the Chitinase Production by Different Metarhzium anisopliae Strains under Solid-State Fermentation with Silkworm Chrysalis as Substrate Using CCRD. Advances in Microbiology. 2:268-276.

Sahai A. S. and M. S. Manocha. 1993. Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host-parasite intereaction: FEMS Microbial. Rev. 11: 317-338.

Vijayakumar N., S. Alagar, N. Madanagopal. 2017. Biocontrol potential of fungal chitinase from high yielding Trichoderma viride against Corcyra cephalonica (stainton)

Wo, J.H., S. Ali., S.X. Ren. 2010 Evaluation of Chitinase from Metarhizium anisopliae as Biopesticide agaust Plutella xylostella. Pakistan J. Zool. 42(5): 521-528

กิจกรรมที่ 2 การผลิตเอ็นไซม์ย่อยสลายที่มีประโยชน์จากเชื้อราไตรโคเดอร์มาเพื่อใช้ในการควบคุมโรคพืช

กณิษฐา สังคะหะม, ญาณี มั่นอ้น และ เฟื่องฟ้า จันทนิยม. 2543. การใช้เชื้อรา *Trichoderma* ในรูปหัวเชื้อสดควบคุมเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* สาเหตุโรคเน่าระดับคอดินในพืชผัก. *ใน* การประชุมวิชาการครั้งที่ 38 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. หน้า 260-267.

ขจรเกียรติ ธิปตา จิรพรรณ โสภี และ พิภัทร เจียมพิริยะกุล. 2553. การคัดเลือกเชื้อรา *Trichoderma* spp. เพื่อการ ควบคุมเชื้อรา Pythium spp. สาเหตุโรคโคนเน่าคอดิน. เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 49: สาขาพืช. 659 หน้า.

จิระเดช แจ่มสว่าง. 2534. การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี. เอกสารปะกอบการฝึกอบรมทางวิชาการหลักสูตร การควบคุมโรคและแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี. หน้า 1-13. ระหว่างวันที่ 13-17 พฤษภาคม 2534 ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม.

จิระเดช แจ่มสว่าง และ วรรณวิไล อินทนู. 2542. การใช้เชื้อรา *Trichoderma* ควบคุมโรคพืช. โครงการเกษตรกู้ชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เอกสารเผยแพร่ทางวิชาการ ฉบับที่ 2. 90 หน้า.

ทัศนาพร ทัศคร อภิรัชต์ สมฤทธิ์ และธารทิพย ภาสบุตร.2550. ศึกษาผลการใช้วัสดุเพาะเห็ดร่วมกับเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการป้องกันกำจัดโรคลำต้นไหม้หน่อไม้ฝรั่ง.รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2550 เล่มที่ 1. สำนักวิจัยพัฒนากาอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ. หน้า. 366 – 378.

ปัญจมา กวางติ๊ด. 2546. การจัดการโรคโคนเน่าและผลเน่าของทุเรียน (Durio Zibertinus Murr.) ที่เกิดจากเชื้อรา Phytophthora palmivora (Butl.) Butl. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. เกษตรศาสตร์.

ศูนย์วิทยทรัพยากร

มาลัยพร เชื้อบัณฑิต, วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์, พิศาล ศิริธร และนิวัฒ เสนาะเมือง. 2546. ความ หลากหลายชนิดเชื้อ ราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. จากแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์และการ ประยุกต์ใช้ในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี. *ใน* บทคัดย่อโครงการวิจัยและวิทยานิพนธ์ 2546: การประชุมวิชาการประจำปีโครงการ BRT ครั้งที่ 7. 163 น.

วันทนีย์ ชุ่มจิตต์ 2547 การใช้เชื้อ *Trichoderma* เพื่อควบคุมโรคพืช. พิมพ์ครั้งที่ 1. 64 หน้า

เพชรลดา ปั้นหยา และกำไล เลาห์พัฒนาเลิศ 2556. การคัดกรองและทำการคัดแยกจุลินทรีย์ที่สร้างเอ็นไซม์เซลลูเลส อะไมเลส และเพคติเนส จากกากมันสำปะหลังสด. การประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยรังสิตประจำปี 2556.

อมรรัตน์ ภู่ไพบูรณ์ 2556.รา ไฟทอปธอรา สาเหตุโรคพืชในประเทศไทย. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. ISBN: 978-974-436-833-1. จัดพิมพ์โดย กลุ่มวิชาการ สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 8 จังหวัดสงขลา. 114 หน้า.

Bech, L., Busk, P.K., and Lange, L. 2014. Cell wall degrading enzymes in Trichoderma asperellum grown on wheat bran. Fungal Genom Bio. 4:1. 1-10.

Engelberth, J., Schmetz, E.A., Alborn,H.T., Cardoza,Y.J., Huang, J., and Tumlinson, J.H. 2003. Simultaneous quantification of jasnonic acid and salicyclic acid in plants by vector-phase extraction and gas chromatography-chemical organization-mass spectrometry. Anal. Biochem.312:242-250.

Gomes, D.J., Hasan, M.F., Rahman, M.M. 2002. Screening of alpha-amylase producing thermophilic fungi recovered from natural decomposing lignocellulosic materials. Dhaka Univ j Biol Sci: 11(1):39-48.

Haltmeier, T., Leisola, M., Ulmer, M., and Waldner, R. 1983. Pectinase from *Trichoderma reesei* QM9414. Biotechnology and Bioengineering. Vo.XXV, Pp.1685-1690.

Hasan, S., Guptam G, Anand, S., and Kaur, H. 2014. Lytic enzymes of Trichoderma: Their role in Plant Defense. International Journal pf Applied Research and Studies (iJARS). 3(2): 1-6.

Heil, M. and R.M.Bostock. 2002. Induce systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induce resistance. Nat.Rev.Microbiol.2:43-56.

Jose, A.T.S., Erika, V.M., Jessica, M.S., Dyana, A.T., Keila, A.M., Talita, C.E.S.N. and Cristina S.M. 2016. *Trichoderma aureoviride* URM 5158 and *Trichoderma hamatum* URM 6656 are Biocontrol Agents that act against Cassava Root rot through different Mechanisms. Journal of Phytophathology. 1-9.

Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randal, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193,267-275, 1951.

Luis, H.S.G., Simone, C. P.N., Michele, M., Ana, C.S.R., Valéria, C. S., Fabiana, F. Z.; Ana Carla M.M. *Aquino 1* ; *Latino*, B. J., Maria, de Lourdes T.M. *Polizei*. 2006. Screening of

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. Brazilian Journal of Microbiology.37:474-480.

Mahmood, S., and Sabita, R. R. 2008. Production and Partial Characterization of Extracellcular alpha-Amylase by *Trichoderma viride*. Bangladesh J Microbial, 25(2). 99-103.

Moses, E., Asafu-Agyei, J.N., and Ayueboteng, F. Disease guide: Identification and control of root rot diseases of cassava. CSIR:Crops Research Institute; International society for plant pathology. http://www.isppweb.org/foodsecurity_cassavaghana.asp เข้าถึงข้อมูล 19 เมษายน 2560.

Nabi, N.G., Asgher, M., Shah, A.H., Sheikh, M.A., and Asad, M.J. 2003. Production of Pectinase by *Trichoderma harzianum* in solid state fermentation on citrus peel. Pak. J.Agri.Sci. 40(3-4);193 201.

Nidhal, Y.M.. Al-Morad. 2013. The role of Cellulase and Pectinase in Apricot Canker caused by *Hendersonula toroloidea* and *Phiaocremonium aleophillium*. Journal of Agricultural Science and Technology A 3. 146-150 ISSN: 1939-1250.

Patricia POLETTO, Caroline BORSOP, Mara ZENP and Mauricio Moura da SILVEIRA. 2015. Down stream processing of pectinase produced by Aspergillus niger in solid state cultivation and its application to fruit juice clarification. Food.Sci.Technol.Campinas.35(2):391-397.

Parker, E.J. 2000. Signaling in plant disease resistance. P.198-217 in Dickinson, M. and Beynon, J. (ed) Molecular Plant Pathology. Sheffield Academic Press, Sheffield. U.K.

Paterson, R.R.M.; Bridge, P.D. Biochemical techniques for filamentous fungi. CAB I Publishing International, 1994, Wallingford, United Kingdom, 144.

Reddy, G.B.., Venkateswarlu, G., Swarnabala, G., Vijayavani, S., Reddy, K.V., Harita., V, Kumar, C.S., and Ganesh, J. 2015. Production of High Activity Amylase from *Trichoderma Reesei* Ncim 1052 in Solid State Fermentation. Quest Journals, Journal of Research in Humannities and Social Science. 3(11): 01-06.

Rajeswari, P. 2015. In Vitro inhibition of Pectinolytic Enzymes of Fusarium oxysporum by Trichoderma spp and Pseudomonas fluorescfens on Arachis hypogaea. L. Int.Curr.Microbiol.App.Sci. 4(1):604-613.

Sandhu, D.K. and Kalra, M.K. 1982. Production of cellulase, Xylanase and Pectinase by *Trichoderma longibrachiatum* on different substrates. Transaction of the British Mycological Society. 79(3);409-413.

Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisaberti, E.L., Marra, R., Woo, S.L., Lorito, M. (2008). Trichoderma-plant-pathogen interaction. Soil Biol Biochem: 40:1-10.

Wasternack, C., i. Stenzel, B. Hause, C. Kutter, H. Maucher, J.Neumerkel, I. Feussner and O, Miersh. 2006. The wound response in tomato-Role of jasmonic acid. Journal of Plant Physiology. 163:297-306.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัย

Weijers, S.R., AND Van't Riet, K. 1992. Enzyme stability in downstream processing part I enzyme inactivation, stability and stabilization. Biotechnology Advance. 10(2):237-249.

กณิษฐา และคณะ. การใช้เชื้อราไตรโคเดอร์มาในรูปหัวเชื้อสดควบคุมโรครากเน่าโคนน่าของถั่วฝักยาว สาเหตุเกิดจาก Sclerotium rolfsii Sacc. การประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 39 สาขาพืช สาขาส่งเริมและนิเทศการเกษตร 4-7 กุมภาพันธ์ กรุงเทพฯ 2544. หน้า 357-364. (589 หน้า)

วันทนีย์ ชุ่มจิตร์. 2547. ใช้เชื้อราไตรโคเดอร์มาควบคุมโรคไม้ผล. กสิกร. ปีที่ 7 ฉบับที่ 6. (พ.ย.-ธ.ค. 2547). หน้า 71-82.

จิระเดช แจ่มสว่าง และ วรรณวิไล อินทนู. 2542. การใช้เชื้อราไตรโคเดอร์มาควบคุมโรคพืช.โครงการเกษตรกู้ชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์เอกสารเผยแพร่ทางวิชาการ ฉบับที่ 2. 90 หน้า.

จิระเดช แจ่มสว่าง. 2546. การควบคุมโรคพืชและแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี. โครงการเกษตรกู้ชาติ โครงการถ่ายทอดเทคโนโลยีชีวภาพและชีวภัณฑ์ในการกำจัดศัตรูพืช เพื่อทดแทนสารเคมีสังเคราะห์ ภาควิชาโรคพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขต กำแพงแสน. 194 หน้า.

ทัศนาพร ทัศคร ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล ธารทิพย ภาสบุตร และ พีระวรรณ พัฒนาวิภาส. 2550. การพัฒนารูปแบบการป้องกันกำจัดโรคลำต้นไหม้ของหน่อไม้ฝรั่งแบบผสมผสาน. กลุ่มวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร. 12 หน้า.

Adorada, D. L., Biles, C. L., Liddell, C. M., Fernandez-Pavia, S., Waugh, K. O., and Waugh, M. E. 2000. Disease development and enhanced susceptibility of wounded pepper roots to Phytophthora capsici. Plant Pathol. (Oxf) 49:719-726.

Engelberth, J., E.A. Schmelz, H.T. Alborn, Y.J. Cardoza, J. Huang and J.H. Tumlinson. 2003. Simultaneous quantification of jasmonic acid and salicylic acid in plants by vapor-phase extraction and gas chromatography-chemical ionization-mass spectrometry**.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 101(6):1781-5.

Harman, G.E., C.R. Howell, A. Viterbo, I. Chet and M. Lorito. 2004. *Trichoderma* species, opportunistic, avirulent plant and Symbionts. *Nature reviews Microbiology.* 2:43-56.

Heil, M., and R.M. Bostock. 2002. Induced Systemic Resistance (ISR) Against Pathogens in the Context of Induced Plant Defences. *Annals of Botany*. 89(5):503-512.

Jones, D., and D.Takemoto. 2004. Plant innate immunity -direct and indirect recognition of general and specific-pathogen associated molecules. *Current opinion in immunology*. 16(1):48-62.

Mahmood, S and Rahman, S.R. 2008. Production and partial characterization of extracellular **α**-amylase by *Trichoderma viride*. Bangladesh Journal of Microbiogy, 25(2):99-103.

Nabi, N.G., A. Asgher, A. Shah, M. Asgher., and A. Muhammad. Production of

กรมวิชาการเกษตร

pectinase by *Trichoderma harzianum* in solid state fermentation of Citrus peel. Pak. J. Agric. Sci. 40.

Sandhu, D.K., and M.K. Kalra. 1982. Production of cellulase xylanase and pectinase by *Trichoderma longibrachiatum* on different substrates. Transaction of the British Mycological Society. 79: 409-413.

Tomme P, Tilbeurgh H, Pettersson G, Damme J, Vande-kerckhove J, Knowles J, Teeri T, and Claeyssens M. 1988. Studies of the cellulolytic system of *Trichoderma reesei* QM9414. *Eur. J. Biochem*. 170(3):575–81.

Vinale, F., K. Sivasithamparum, E.L. Ghisalbert, R. Marra, S.L. Woo and M. Lorito. 2008. Trichoderma-plant-pathogen interaction. *Soil Microbiology and Biochemistry*. 40(1): 1-10.

Wasternack, C., I. Stenzel, and B. Hause. 2006. The wound respond in tomato. Role of jasmomic acid. *Journal of plant physiology*. 163(3):297-306.

กรมวิชาการเกษตร

ภาคผนวก

กิจกรรมที่ 1 เอ็นไซม์ควบคุมแมลง

การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส

ชุดคิทประกอบด้วย

Assay buffer **(A4855)**	20ml
4-Nitrophenol N-acetyl-β-D-glucosaminide **(no.N9376)**	10mg
4-Nitrophenol N,N'-diacetyl- β-D-chitobioside **(no.N6133)**	5mg
4-Nitrophenol β –D-N,N',N"-triacetylchitotriose **(no.N8638)**	1mg
Chitinase from *Trichoderma viride* **(C6242)**	1mg
p-Nitrophenol Solution 10mM **(N7660)**	1ml
sodium carbomate **(S2127)**	1g

Reagent และอุปกรณ์ที่ต้องเตรียมเอง

1. Dulbecco's Phosphate buffer saline (PBS) **(no.D8537)**
2. ultrapure water
3. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 405 nm
4. 96 well plate
5. water bath 37 องศาเซลเซียส
6. For macrophages lysis **(no.C2978)**

การเตรียมสาร

1.Stop Solution

- เติม 24 ml ultrapure water ใน sodium carbonate **(no.S2127)**
- ทำให้ละลายโดยใช้ magnetic จนละลาย
- เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2.Substrate Solution(s) (1mg/ml)

-ละลาย 1 mg 4-Nitrophenol N-acetyl-β-D-glucosaminide **(no.N9376)**ใน 1ml ของ Assay Buffer **(A4855)**

-ละลาย 1 mg 4-Nitrophenol β –D-N,N',N"-triacetylchitotriose **(no.N8638)**ใน 1ml ของ Assay Buffer **(A4855)**

-ละลาย 1 mg 4-Nitrophenol N,N'-diacetyl- β-D-chitobioside **(no.N6133)**ใน 1ml ของ Assay Buffer **(A4855)**

1ml ของสารละลายเพียงพอสำหรับ ~10 ปฏิกิริยา mix สารละลายด้วยเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง

กรมวิชาการเกษตร

Substrate ละลายยากในบัฟเฟอร์ อาจใช้เวลานานประมาณ 1 ชั่วโมง ในการเขย่าเพื่อให้สารละลาย ละลายสมบูรณ์ เก็บสารละลายบนน้ำแข็งระหว่างทำการทดลอง (เก็บไวที่-20 องศาเซลเซียส เก็บได้นาน 1 เดือน)

3.Chitinase Control Enzyme
- เติม 5 ml ของ PBS ในขวด Chitinase **(no.C6242)**
- จะได้ไคติเนสความเข้มข้น 0.2mg/ml
- Vortex จนสารละลาย
- เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส (เก็บได้นาน 3 เดือน)
- ก่อนใช้ให้ dilute 20 เท่า ด้วย PBS และเก็บบนน้ำแข็ง

4.Strandard Solution
- dilute 5 μl ของ 10 mM สารละลาย *p*-Nitrophenol **(no.N7660)** ด้วย 995 μl ของ stop solution
- Vortex
- เก็บบนน้ำแข็ง

5. Sample preparation
- ตัวอย่างเอนไซม์ เตรียมโดย centrifuge อาหารที่เลี้ยงเชื้อราไว้
- ถ้าเป็น มนุษย์ แมคโคฟาจ โปรตีน ต้องย่อยด้วยชุดคิท ก่อน **(no.C2978)**

6.Procedure
- chitinase hydrolysis จะทำในสภาวะเป็นกรด pH ประมาณ 4-8 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
- การ hydrolysis enzyme จะปลดปล่อย *p*-Nitrophenol
- เมื่อใส่ stop solution จำทำให้เกิด ionization ของ *p*-Nitrophenol ได้เป็นสีเหลือง
- วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm[3]

-การหา total activity ของ ไคติเนส จะใช้สับสตรท 3 ตัว ที่มากับชุดคิท

4-Nitrophenol N-acetyl-β-D-glucosaminide **(no.N9376)**

4-Nitrophenol β –D-N,N',N"-triacetylchitotriose **(no.N8638)**

4-Nitrophenol N,N'-diacetyl- β-D-chitobioside **(no.N6133)**

วิธีการทดสอบ

1. ชั่งตัวอย่าง 0.01 ละลายด้วย ultrapure water 10 μl
2. บ่ม substrate solution และ standard solution ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
3. set plate reader ที่ 405 nm
4. ใส่ reaction components ใน 96 well plate ตามตาราง 1 แล้ว mix โดยใช้ไปเปต

	Substrate Solution	Sample	Standard Solution

กรมวิชาการเกษตร

Blank*	100 μl	-	-
Standard**	-	-	300 μl
Positive Control***	90-99 μl	1-10 μl of chitinase control enzyme	-
Test	90-99 μl	1-10 μl of sample	-

5. ใส่ Substrate ก่อนตามด้วยเอนไซม์
6. บ่ม plate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา30 นาที (สามารถลดเวลาได้)
7. stop reaction โดยใส่ 200 μl ของ stop reaction ไปในแต่ละ well ยกเว้น wells ที่มี Standard Solution เขย่าจะได้เป็นสีเหลือง
8. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm ภายใน30 นาที

วิธีคำนวณ

นิยาม เอนไซม์ 1 ยูนิต หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสที่สามารถปลดปล่อย *p*-Nitrophenol 1μ mole ภายใต้สภาวะที่กำหนด (pH 4.8 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส)

$$\text{Units/ml} = \frac{(A_{405}\text{sample} - A_{405}\text{blank}) \times 0.05 \times 0.3 \times DF}{A_{405}\text{standard} \times \text{time} \times V_{enz}}$$

A_{405}sample=ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง ที่ 405 nm
A_{405}blank= ค่าการดูดกลืนแสงของ blank ที่ 405 nm
0.05= μmole/ml ของ *p*-Nitrophenol ใน standard solution
0.3=ปริมาตรสุดท้ายของปฏิกิริยาใน 96well plate หลังจากเติม stop solution (ml)
DF=อัตราส่วนระหว่างปริมาตรสุดท้ายและปริมาตรเริ่มต้นของเอนไซม์ไคติเนส
A_{405}standard= ค่าการดูดกลืนแสงของ standard solution ที่ 405 nm
Time= เวลา (นาที)
V_{enz}= ปริมาตรของตัวอย่าง (ml)

กรมวิชาการเกษตร