รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. **แผนงานวิจัย** : วิจัยการใช้ประโยชน์จากเอ็นไซม์ของเชื้อจุลินทรีย์เพื่อควบคุมศัตรูพืช
2. **โครงการวิจัย** : วิจัยการใช้ประโยชน์จากเอ็นไซม์ของเชื้อจุลินทรีย์เพื่อควบคุมศัตรูพืช

   กิจกรรม : การผลิตเอ็นไซม์ย่อยสลายที่มีประโยชน์จากเชื้อราไตรโคเดอร์มาเพื่อใช้ในการควบคุมโรคพืช

   กิจกรรมย่อย (ถ้ามี) : ระบุชื่อกิจกรรมย่อยตามแบบ ว1-ก ที่ผ่านการอนุมัติ
3. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)** : การผลิตเอ็นไซม์จากเชื้อราไตรโคเดอร์มาในอาหารเหลวระดับขวดเขย่า (Flask-Culture technique) ในรูปแบบผง

   ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Production of enzymes by *Trichoderma* spp. in powder–derived liquid medium by Flask-Culture technique
4. **คณะผู้ดำเนินงาน**

หัวหน้าการทดลอง :	พยุงศักดิ์ รวยอารี	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
ผู้ร่วมงาน :	ทัศนาพร ทัศคร	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	ภรณี สว่างศรี	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด	สำนักผู้เชี่ยวชาญ

5. **บทคัดย่อ**

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความสามารถเชื้อราไตรโคเดอร์มาจำนวน 29 ไอโซเลตในการสร้างเอ็นไซม์ย่อยสลาย เซลลูเลส, อะไมเลส และเพคติเนส ในอาหารเหลว carboxy methyl cellulose (CMC), starch hydrolysed medium และ Czapek medium+1% เพคติน ตามลำดับ ต่อการยับยั้งเชื้อราไฟทอปธอราด้วยวิธี Dual technique ในสภาพห้องปฏิบัติการ และจากการทดสอบการสร้างกิจกรรมการสร้างเอ็นไซม์เซลลูเลส อะไมเลส และเพคติเนส โดยประเมินจากค่า HC (hydrolysis capacity) หรือ HC value ซึ่งได้จากค่าสัดส่วนของ hydrolysis zone และเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี โดยคัดเลือกจากราไตรโคเดอร์มาทั้งหมด 29 ไอโซเลท จากการทดลอง พบว่าเชื้อราไตรโคเดอร์มาไอโซเลต TC14 สามารถสร้างเอ็นไซม์เซลลูเลสได้ในระดับที่สูงที่สุด จากนั้น ทำการคัดเลือกเชื้อราไตรโคเดอร์มาไอโซเลท TC14 มาใช้ในการผลิตเอ็นไซม์เซลลูเลสในระดับขวดเขย่า (shake flask-cultured

กรมวิชาการเกษตร

technique) และผลิตผงเอ็นไซม์โดยวิธี freeze-dried method เพื่อนำผงเอ็นไซม์ไปใช้ในการทดสอบการควบคุมโรคพืชต่อไป ผลการทดลองที่กล่าวมา พอสรุปได้ว่าเชื้อราไตรโคเดอร์มาที่คัดเลือกและแยกได้มีศักยภาพในการสร้างเอ็นไซม์ได้ทั้งสามชนิด เพียงแต่ระดับความสามารถในการสร้างเอ็นไซม์ย่อยสลายแตกต่างกันและมีศักยภาพในการผลิตเป็นเอ็นไซม์ได้ เพื่อนำไปพัฒนาต่อยอดในการควบคุมโรคพืชต่อไป

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* spp. causing root rot disease using dual technique method. Enzyme activities were determined by hydrolysis capacity (HC value) which was the ratio of the hydrolysis zone and colony diameter. The TC14 showed presence of highest amount of cellulase enzyme among other *Trichoderma* isolates studied in dual 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 showed the ability in inhibition of pathogenic fungi and can be developed to further exploitation in plant disease control.

กรมวิชาการเกษตร

6. คำนำ

ราไตรโคเดอร์มามีประโยชน์ต่อการนำมาใช้ในการควบคุมโรคพืชหลายชนิด โดยมีกลไกในการควบคุมเชื้อโรคพืช ได้แก่ การแข่งขันกับเชื้อโรคพืช การเป็นปรสิตต่อเชื้อโรคพืช การสร้างสารยับยั้งหรือทำลายเชื้อโรคพืช และการชักนำให้พืชมีความต้านทานโรค ราไตรโคเดอร์มาสามารถควบคุมและยับยั้งการเจริญตลอดจนเข้าทำลายเส้นใยของเชื้อราไฟทอปธอราได้ (วันทนีย์ 2547) (Promwee *et al*., 2017) รายงานประสิทธิภาพของไตรโคเดอร์มาในการควบคุม Phytophthora leaf fall ในต้นยาง (Ahmed *et al*., 1999) รายงานการใช้ *Trichoderma harzianum* ในการควบคุม *Phytophthora capsici* ในพริกไทย

ในการศึกษาประสิทธิภาพของส่วนผสมของผงเชื้อรา *Trichoderma harzianum* (CB-Pin-01) กับอาหารเสริม (รำข้าวละเอียด) และสารเสริม (ปุ๋ยหมัก) อัตราส่วน 1:4:10 โดยน้ำหนัก ด้วยวิธีหว่านบริเวณใต้ทรงพุ่มของทุเรียนอัตรา 50 กรัมต่อตารางเมตรเพียงอย่างเดียว หรือใช้ร่วมกับการหว่านสารเคมี metalaxyl ชนิดเม็ด บริเวณใต้ทรงพุ่มอัตรา 1 กิโลกรัมต่อต้น หรือใช้ร่วมกับการฉีดพ่น metalaxyl หรือใช้ร่วมกับ การฉีดพ่นด้วยสารบำรุงพืชเพื่อยับยั้งสารบำรุงพืชเพื่อยับยั้งเชื้อรา *P. palmivora* ในสภาพสวน 4 จังหวัด และศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี พบว่าปริมาณเชื้อรา *T. harzianum* มีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นและความสมบูรณ์ของต้นทุเรียนเพิ่มขึ้นในการใช้เชื้อรา *T. harzianum* (กนกนาฎ 2540)

ในประเทศไทย มีการนำราไตรโคเดอร์มาชนิดสดเพื่อใช้ควบคุมโรคพืชโดยวิธีการคลุกเมล็ด การรองก้นหลุม การผสมกับวัสดุปลูก การหว่านลงดิน การฉีดพ่น การให้ไปกับระบบน้ำ และการทาแผล เป็นต้น (จิระเดช 2542, วันทนีย์ 2547)

นอกจากนี้ จากการศึกษา พบว่า เชื้อราไตรโคเดอร์มา ซึ่งมีคุณสมบัติในการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์และสามารถสร้างเอ็นไซม์เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราสาเหตุโรคพืช (plant pathogenic fungi) โดยชีววิธีได้ (biocontrol agent) ได้ โดยมีกลไกการทำลายเชื้อราปฏิปักษ์หลากหลายรูปแบบ รวมทั้งการสร้างเอ็นไซม์ย่อยสลายเชื้อราก่อโรคในพืช

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 และผล หรือส่วนเหนือดิน 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), เอ็นไซม์ย่อยสลาย (cell wall degrading enzymes) และ cellulytic enzymes เป็นต้น

โรคพืชที่เกิดจากราไฟทอปธอราก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจ และที่ผ่านมาเป็นการนำราไตรโคเดอร์มาชนิดสดมาใช้ในการควบคุมโรคพืช ทั้งๆที่มีความสำคัญ แต่ความรู้ความเข้าใจ เกี่ยวกับการนำเอ็นไซม์ย่อยสลายจากราไตรโคเดอร์มาเพื่อใช้ควบคุมโรคพืชนั้นยังไม่เป็นที่เข้าใจนัก งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นการศึกษาการผลิตเอ็นไซม์ย่อยสลายที่มีประโยชน์จากเชื้อราไตรโคเดอร์มาที่ได้จากการทดสอบและคัดเลือกไอโซเลทของเชื้อราที่มีคุณสมบัติในการสร้างเอ็นไซม์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อให้ได้เอ็นไซม์

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

จากไอโซเลทเชื้อราไตรโคเดอร์มาที่มีประสิทธิภาพสามารถยับยั้งเชื้อราโรครากเน่าโคนเน่าของพืชสำคัญได้ และนำผลวิจัยที่ได้ไปพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์ในอนาคต เพื่อเป็นทางเลือกให้เกษตรกรจะได้นำไปใช้เพื่อลดการใช้สารเคมีซึ่งเป็นอันตรายมากกว่าต่อไป

7. วิธีดำเนินการ :

- อุปกรณ์ - ฟลาสต์ ขนาด 500 มิลลิลิตร ขวดแก้วแบบมีฝาปิด กระดาษกรอง
  - จานเพาะเชื้อ
  - ปุ๋ยคอก
  - 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 (CMC)
  - หลอดอาหารแข็งเอียง (slant agar)
  - 1% Conga red (สารละลายย้อมสีจุลินทรีย์)
  - Tryptone peptone glucose yeast extracts (อาหารเลี้ยงเชื้อสารสกัดยีสต์)
  - Czapek dox broth (อาหารเหลวเลี้ยงเชื้อซาเพ็ค) (HIMEDIA)
  - Potato dextrose agar (วุ้นโปเตโต้เด็กซ์โตรสอาการ์) (HIMEDIA)
  - Starch agar (ผงวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อ สตาร์ชอาการ์) (HIMEDIA)
  - Lactobacillus MRS agar (อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS)
  - Iodine solution (สารละลายไอโอดีน)
  - Agar powder (ผงวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อ)
  - DNASE/RNASE free distilled water (น้ำกลั่นปลอดสารย่อย DNA/RNA)

กรมวิชาการเกษตร

- วิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างเชื้อราสาเหตุโรคและไอโซเลทเชื้อราไตรโคเดอร์มา

การแยกเชื้อสาเหตุโรค เชื้อราปฏิปักษ์ และการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา โดยการเก็บตัวอย่างและคัดแยกไอโซเลทเชื้อราจนได้เชื้อบริสุทธิ์ โดยทัศนาพร และคณะ (สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร) เลี้ยงเชื้อบนอาหาร Potato dextrose agar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5-7 วัน จึงเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ไว้ในอาหารแข็งเอียง (PDA agar slants) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

2. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อรา

เตรียมอาหารแข็ง potato dextrose agar (PDA) ตามคำแนะนำคู่มือผู้ผลิต และทำให้ปลอดเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที (Imarhiagbe *et al*., 2013) จากนั้นทำการคัดแยกราไอโซเลทต่างๆ จาก stock culture โดยการใช้ sterile loop (aseptically) บนจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยวุ้นเชื้อราในลักษณะคว่ำจานเพาะเลี้ยงและบ่มจานเพาะเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง 28±2 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน

3. การคัดแยกเชื้อราที่มีคุณสมบัติในการสร้างเอ็นไซม์ย่อยสลาย

บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งโดยวิธี dual technique จนได้ชนิดไอโซเลทของเชื้อราที่มีคุณสมบัติการสร้างเอ็นไซม์ชนิดต่างๆ ได้แก่ เซลลูเลส อะไมเลส และเพคติเนส (รายงานการทดลองสิ้นสุดปี 2562 พยุงศักดิ์ และคณะ 2562) บนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ ที่ประกอบด้วย carboxy methyl cellulose (CMC) ที่ประกอบด้วย carbpxy methyl cellulose 0.1 กรัม, polpeptone 0.5 กรัม, yeast extract 0.1 กรัม K2HPO4 0.4 กรัม ,,Kcl 0.02 กรัม, MgSO4.7H2O 0.1 กรัม, FeSO4.7H2O, วุ้นอาการ์ 1.5 กรัม และเติมน้ำลั่นปลอดเชื้อ 100 มิลลิลิตร ปรับค่าพีเอชเป็น 7.00, Stach agar (วุ้นอาหารแป้ง) และ Czapek+1% เพคติน ตามคำแนะนำคู่มือผู้ผลิต ตามลำดับ โดยการนำเชื้อราที่แยกได้ในข้อ 1 ในอาหาร Potado dextrose agar (PDA) เป็นเวลา 5-7 วัน จากนั้น ใช้ที่เจาะจุกยาง (cork borer) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซ็นตริเมตร เจาะชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยของเชื้อรา *Phytophthora* spp. วางลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยวางห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยวางห่างจากขอบจาน 2 เซ็นติเมตร และด้านตรงข้ามของในแนวเส้นผ่านศูนย์กลางนั้น วางชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยชองเชื้อราที่จะทดสอบประสิทธิภาพ ทำการทดลองและบ่มจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิและระยะเวลา ตามคำแนะนำของรายงานการทดลองสิ้นสุด ปี 2562 (พยุงศักดิ์ และคณะ 2562) บนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ ที่ประกอบด้วย carboxy methyl cellulose (CMC) , Starch agar (วุ้นอาหารแป้ง) และ Czapek + 1% เพคติน

4. การทดสอบความสามารถในการสร้างเอ็นไซม์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวระดับขวดเขย่าชนิดสูตรน้ำ

- นำตัวอย่างเชื้อราไตรโคเดอร์มา Tc14 มาเพาะเชื้อในอาหาร PDA
- เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ carboxy methyl cellulose (CMC) ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ในฟลาสต์ขนาด 500 มิลลิลิตร ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

กรมวิชาการเกษตร

- นำชิ้นวุ้นเชื้อราไตรโคเดอร์มา (agar plug) ไอโซเลท Tc14 จำนวน 5 ชิ้น ต่อ หนึ่งขวด
- เขย่าขวดทดลองที่ 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 31 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน
- เมื่อครบ 5 วัน นำอาหารเลี้ยงเชื้อนำมากรองผ่านกระดาษกรอง เพื่อเก็บรักษาน้ำใส (filtrated)
- ส่วนหนึ่งเก็บในกลีเซอรอลนึ่งฆ่าเชื้อที่ความเข้มข้นที่ 20%, 40%, 50% และ 80% ตามลำดับ โดยเก็บรักษาน้ำใสที่ได้จากการกรองมาเก็บรักษาที่ 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาดเล็ก ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- ส่วนหนึ่งนำปริมาตรเชื้อ 100 ไมโครลิตร มาเทใส่ขวดแก้วแบบมีฝาปิด ปริมาตร 50 มิลลิลิตร
- นำขวดตัวอย่างไปแช่งแข็งที่อุณหภูมิลบ 80 องศาเซลเซียส

5. การทดสอบความสามารถในการสร้างเอ็นไซม์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวระดับขวดเขย่าชนิดสูตรผง

- เจาะชิ้นวุ้นอาหาร PDA ที่ประกอบด้วยไตรโคเดอร์มาไอโซเลท 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
    ห้องปฏิบัติการ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
    ห้องปฏิบัติการ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

กรมวิชาการเกษตร

8. **ผลการทดลองและวิจารณ์**

ผลที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่า เชื้อราไตรโคเดอร์มาจำนวน 29 ไอโซเลท (ทัศนาพร และคณะ 2562) ที่นำมาทดสอบการสร้างเอ็นไซม์เซลลูเลส อะไมเลส และเพคติเนส บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่ประกอบด้วย carboxy methyl cellulose, starch hydrolysed และ Czapek medium+1% pectin มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Phytophthora* spp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง โดยวิธี Dual technique ยิ่งกว่านั้น พบว่าไอโซเลท Tc14 มีความสามารถในการสร้างเอ็นไซม์เซลลูเลสได้สูงที่สุด โดยเมื่อใช้สารละลายส่วนใสปริมาตร 50 มิลลิลิตร จำนวน 13 ขวด จะได้ผงปริมาณ 9.2 กรัม ของผงเอ็นไซม์แห้ง (มากกว่าอะไมเลสและเพคติเนส) และมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Phytophthora* spp. แม้ว่าราไตรโคเดอร์มามีความสามารถในการสร้างเอ็นไซม์อะไมเลสและเพคติเนส แต่จะได้ปริมาณที่น้อยกว่าในเบื้องต้น สอดคล้องกับรายงานของอังค์วราและคณะ

2562 ที่แนะนำการทดสอบการสร้างเอ็นไซม์เพคติเนสในระดับอาหารเหลวเพิ่มเติมเปรียบเทียบกับการสร้างเอ็นไซม์ในระดับเพลท พบว่าในระดับอาหารเหลว ไตรโคเดอร์มามีระดับการสร้างเอ็นไซม์เพคติเนสเพิ่มขึ้น

การทดสอบการนำเอ็นไซม์เพื่อทดสอบการควบคุมโรคไฟธอปธอราของพริก ซึ่งเป็นงานวิจัยในปีการทดลอง 2564 เมื่อทำการทดสอบการนำอาหารเหลวมาผ่านกระบวนการผลิตเป็นเอ็นไซม์ชนิดผงโดยวิธี Freeze drying ในระดับอาหารเหลวในระดับห้องปฏิบัติการ ผลการทดลองพบว่าเชื้อราในอาหารเหลว Tc14 สามารถสร้างเอ็นไซม์เซลลูเลสในอาหาร CMC ได้ในปริมาณที่สังเกตเห็นการเจริญของวุ้นเส้นใยเชื้อรา (Figure 1) ก่อนนำไปเข้าตู้บ่มก่อนผ่านกระบวนการ Freeze dried (Figure 2) เพื่อผ่านกระบวนการผลิตให้เป็นผงต่อไป (Figure 3a) และ เมื่อได้เป็นผลิตภัณฑ์ที่เป็นผงแล้ว จึงจะนำไปใช้ต่อยอดในการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบของเชื้อราสาเหตุโรคพืชต่อไป Figure 4a แสดงต้นพริกอายุ 1 เดือน ก่อนลงเชื้อไฟทอปธอรา (control) Figure 4b แสดงต้นพริกที่ราดด้วยซัสเพนชัน (suspension) เชื้อไฟทอปธอรา ห่อหุ้มด้วยพลาสติกเพื่อควบคุมความชื้นบ่มทิ้งไว้นาน 15 วัน และ Figure 4c แสดงผลการทดสอบประสิทธิภาพการเจริญของไฟทอปธอรา ด้วยผงเอ็นไซม์เซลลูเลสไตรโคเดอร์มา Tc14 ที่ได้จากการผ่านกระบวนการ Freeze-dried ในระดับโรงเรือนทดลอง ผลการทดลองในเบื้องต้นพบอัตราการอยู่รอดของต้นพริกจำนวนหนึ่ง ในการวิจัยนี้ ปริมาณความเข้มข้นของเอ็นไซม์ที่ผลิตได้ดังอธิบายไว้ในภาคผนวก ข้อที่ 2 และนำมาสูตรผงมาทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมโรคในรูปแบบของซัสเพนชั่น และในส่วนของการรายงานผลการทดสอบทางสถิติ (statistical analysis) จะได้ทำการศึกษาเพื่อความสมบูรณ์ของงานวิจัยในปีการทดลอง 2564 ต่อไป

จากการศึกษาผลของการคัดแยกและการผลิตเอ็นไซม์ย่อยสลายเป็นชนิดผง เพื่อนำไปศึกษาต่อเพื่อให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโของเชื้อรา *Phytophthora* spp. ต่อไป พบว่า TC14 มีศักยภาพในการสร้างเป็นเอ็นไซม์เซลลูเลสชนิดผงได้ดีที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Griffin *et al*., (1974) ที่ศึกษาการผลิตเอ็นไซม์เซลลูเลสโดย *Trichoderma viride* จาก Feedlot waste โดยใช้วิธีการหมัก (typical fermentation) และการทำให้เกิดเป็นผงแห้ง (lyophilized) บนภาชนะที่เป็นขวดฟลาสต์ (liophilization flast) นอกจากนี้ ไอโซเลทเชื้อราที่ได้จากงานวิจัยสามารถผลิตเอ็นไซม์ย่อยสลายเชื้อราสาเหตุโรคพืช ได้แก่ อะไมเลสและเพคติเนส ได้เช่นกัน

นอกจากนี้ ยังมีงานวิจัยพบว่า *T. harzianum* สามารถยับยั้งเชื้อรา *Phytophthora infestans* และ *P. parasitica* (Fatima *et al*., 2015; อังค์วรา 2562) จากรายงานของ สุดารัตน์ (2556) และ กนกนาฏ (2540) พบว่า *Trichoderma* spp. สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. palmivora* ได้

จากการรายงานการวิจัยอื่นๆ พบว่ามีการใช้เอนไซม์อะไมเลสและเซลลูเลสที่ผลิตได้จากไตรโคเดอร์มา (Reddy *et al*., 2015) ในการควบคุมเชื้อรา *Phytophthora cinnamomi* (Pond *et al*., 2001) และ การใช้เอนไซม์เซลลูเลสและเพคติเนสในการควบคุมโรคแคงเกอร์ (Apricot canker) ที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Hendersonula toruloidea* และ *Phiaoacremonium aleophillium* (Nidhal and Morad, 2013) เป็นต้น นอกจากนี้ ยังพบเชื้อราไตรโคเดอร์มาที่สามารถผลิตเอนไซม์ได้ เช่น *Trichoderma viride* (Mahmood, S., and

กรมวิชาการเกษตร

Rahman, S.R. 2008), *Trichoderma harzianum* (Nabi *et al*., 2003), *Trichoderma longibrachiatum* (Sandhu and Kalra, 1982) และ *Trichoderma reesei* QM 9414 (Haltmeier, 1983) เป็นต้น

การทดลองครั้งนี้ เป็นการศึกษาในเบื้องต้น เพื่อให้ได้ข้อมูลการสร้างผงเอ็นไซม์ในแบบ Dual culture และ แบบ Flask cultured technique รวมทั้งการนำผงเอ็นไซม์ไปประยุกต์ใช้ในการควบคุมหรือเพื่อพัฒนาต่อยอดให้เป็นผลิตภัณฑ์สู่การนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป เพื่อทดแทนวิธีการควบคุมศัตรูพืชด้วยวิธีอื่นๆ ที่มีราคาที่สูงกว่าแต่มีประสิทธิภาพที่น้อยกว่า.

9. **สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ** :

จากการศึกษาการทดสอบการสร้างเอ็นไซม์ย่อยสลาย ได้แก่ เซลลูเลส อะไมเลส และเพคติเนสจากราไตรโคเดอร์มาบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CMC, starch hydrolysed agar medium และ Czapek medium+1% เพคติน มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อราไฟธอปธอราโดยวิธี Dual technique โดยเชื้อ Tc14 มีความสามารถในการสร้างเอ็นไซม์เซลลูเลสได้สูงสุด การทดสอบการสร้างเอ็นไซม์ชนิดผงจากไอโซเลทเชื้อรา TC14 ด้วยวิธี freeze dried พบว่า สามารถผลิตเป็นผงเอ็นไซม์ได้ในปริมาณที่มากกว่าเอ็นไซม์อะไมเลส และเอ็นไซม์เพคติเนส อย่างไรก็ตาม แนะนำให้ทำการทดสอบในอาหารเหลวเพิ่มเติม เพื่อให้ผลของการสร้างเอ็นไซม์แสดงได้ชัดเจนยิ่งขึ้น เนื่องจากการทดลองบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งนั้นมีข้อจำกัด เนื่องจากเชื้อราโดยทั่วไป ที่มักจะเจริญเต็มจานเพาะเลี้ยงเชื้อภายในเวลาไม่เกิน 7 วัน จึงส่งให้เกิดการสร้างเอ็นไซม์ที่ไม่ชัดเจน เช่น การสร้างเอ็นไซม์เพคติเนสในเชื้อรา *Colletotricum* spp. (อังค์วรา และคณะ 2562) อีกทั้ง สามารถศึกษาพัฒนาต่อยอดการพัฒนาเอ็นไซม์ทั้งสามชนิดให้เป็นผลิตภัณฑ์ เพื่อใช้ในการกำจัดศัตรูพืชต่อไปได้ ทั้งในรูปผงหรือชนิดน้ำต่อไป

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ : งานวิจัยนี้ ประสบความสำเร็จในการวิจัยการผลิตผงเอ็นไซม์จากราไตรโคเดอร์มา เพื่อใช้ในการควบคุมโรคพืช ในรูปแบบผงเอ็นไซม์ที่มีประสิทธิภาพ ปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม ทดแทนการใช้สารเคมีที่เป็นอันตราย และผลิตเป็นผลิตภัณฑ์เอ็นไซม์ที่ต้องดำเนินการทดลองขั้นต่อไป รวมทั้ง เพื่อช่วยเพิ่มพูนความรู้ความเข้าใจด้านการควบคุมโรคพืชที่เกิดจากราไฟทอปธอรา ที่สร้างความสูญเสียทางเศรษฐกิจให้แก่เกษตรกร และมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคที่มีศักยภาพที่ดียิ่งขึ้นต่อไป ลดการสูญเสียผลผลิตในแต่ละฤดูกาลปลูก

11. คำขอบคุณ : ขอขอบคุณกรมวิชาการเกษตรที่สนับสนุนงบวิจัยเพื่อดำเนินการวิจัย ขอขอบคุณนายอนุชา สุขสังวาลย์ นักวิชาการเกษตร กลุ่มวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร ที่ให้ความ

กรมวิชาการเกษตร

ช่วยเหลือจัดเตรียมอุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมีงานทดลองในห้องปฏิบัติงานวิจัยจุลชีววิทยา จัดเตรียมสถานที่ปฏิบัติงานวิจัยและเก็บบันทึกข้อมูล

12. เอกสารอ้างอิง

กนกนาฎ เรืองวิเศษ. 2540. การใช้เชื้อรา *Trichoderma harzianum* เพื่อควบคุมโรครากเน่าของทุเรียนที่เกิดจาก *Phytophthora palmivora* (Butl.) Butl. ในสภาพสวนของเกษตรกร. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

จิระเดช แจ่มสว่าง และ วรรณวิไล อินทนู. 2542. การใช้เชื้อราไตรโคเดอร์มาควบคุมโรคพืช. โครงการเกษตรกู้ชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เอกสารเผยแพร่ทางวิชาการ กรุงเทพฯ.

ปัญจมา กวางติ๊ด และสมศิริ แสงโชติ. 2545. การจัดการโรคโคนเน่าและผลเน่าของทุเรียน (*Durio Zibertinus* Murr.) ที่เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora palmivora* (Butl.) Butl. ว.วิทย.กษ. 33: 6 (พิเศษ): 45-48.

พยุงศักดิ์ รวยอารี ทัศนาพร ทศคร ภรณี สว่างศรี และ นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด. 2562.การคัดเลือกและจำแนกชนิดของเอ็นไซม์จากเชื้อราไตรโคเดอร์มาที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืช. รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด ปี 2562. 20 หน้า.

วันทนีย์ ชุ่มจิตร์. 2547. การใช้เชื้อไตรโคเดอร์มาเพื่อควบคุมโรคพืช. สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 6 จันทบุรี. 64 หน้า.

สุดารัตน์ ดีช่วย 2556. เชื้อราและเศษซากพืชในพื้นที่ปกปักพันธุกรรมพืชเขื่อนรัชประภา จังหวัดสุราษฎร์ธานี และการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อก่อโรคยางพารา. สาขาวิชาโรคพืชวิทยา. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 181 หน้า.

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

อังค์วรา ดาราพาณิชย์ จุฬาลักษณ์ ตลับนาค สุริยสิทธิ์ สมนึก และถนิมนันต์ เจนอักษร. 2562. การสร้างเอนไซม์ของเชื้อราสาเหตุโรคทางใบของไม้ประดับ. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า. 37(2):250-261.

กรมวิชาการเกษตร

Ahmed, A.S., Pérez-Sánchez, C. Egea, C. and Candela, M.E. 1999. Evaluation of *Trichoderma harzianum* for controlling root rot caused by *Phytophthora capsici* in pepper plants. *Plant pathol*. 48. 58-65.

Fatima, K., Noureddine, K., Henni, J.E. and Mabrouk, K. 2015. Antagonistic effect of *Trichoderm harzianum* against *Phytophthora infections* in the North-west of Algeria. *IJAAR*. 6(4):44-53.

Griffin, H.L., Sloneker, J.H., and Inglett, G.E. 1974. Cellulase production by *Trichoderma viride* on feedlot waste. *Applied Microviology* 27(6):1061-1066.

Haltmeier, T. 1983. Pectinase from *Trichoderma reesei* QM9414. *Biotechnol*. 25:1685-1690.

Imarhiagbe, E.E., Ogichor, S.t., Omoregbe, N., and Obayagbona, N.O. 2013.The effect of composition on the degradability and toxicity of drilling muds used at ologbo active onshore field. Edo State, Nigeria. *Int. J. Biosci* 3:40-8.

Mahmood, S., and Rahman, S.R. 2008. Production and partial characterization of extracellcular alpha-amylase by *Trichoderma viride*. *Bangladesh J Microbial*. 25(2): 99-103.

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.., and 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. 3*: 146-150.

Promwee, A., Yenjit, P., Issarakraisila, M., Intana, W., and Chamswarng, C. 2017. Efficacy of indigenous *Trichoderma harzianum* in controlling *Phytophthora* leaf fall (*Phytophthora palmivora*) in Thai rubber trees. *J. Plant Dis Prot*. 124. 41-50.

Reddy, B.G., Venkateswarlu, Swarnabala, G., Vijayavani, S., Venkatanand Reddy, K., Harita, V, Kumar, S., and Ganesh, J. 2015. Production of high activity amylase from *Trichoderma Reesei* Ncim 1052 in solid state fermentation. *I J RHSS*. 3(11): 1-6.

กรมวิชาการเกษตร

Sandhu, D.K. and Kalra, M.K. 1982. Production of cellulase, xylanase and pectinase by *Trichoderma longibrachiatum* on different substrates. *Trans. Brit. Mycol. Soc*. 79(3):409-413.

Taechapoempol, K., Streethawong, T., Rungsanvigit, P., Namprohm, W., Thamprejamchit, B., Rengpipat, S., and Chavadej, S. 2011. Cellulase-producing bacteria from Thai higher termites, Microcerotermes; sp.: Enzymatic activities and ionic liquid tolerance. *Appl. Biochem*. 164(2):204-19.

กรมวิชาการเกษตร

13. ภาคผนวก

1. สูตรเพื่อบันทึกผลโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณโซนใส เพื่อคำนวณหาค่า Hydrolysis capacity (HC) value (Taechapoempol et al., 2011)

$$\text{HC value} = \frac{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณโซนใส}}{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อรา}}$$

โดยมีระดับดังนี้

- คือ ค่า HC value เท่ากับ 0 (ไม่พบการสร้างเอ็นไซม์)
- \+ ค่า HC value เท่ากับ **<**1.00 (พบการสร้างเอ็นไซม์น้อย)
- ++ ค่า HC value เท่ากับ 1.01-2.00 (ไมพบการสร้างเอ็นไซม์)
- +++ค่า HC value เท่ากับ 2.01-3.00 (พบการสร้างเอ็นไซม์มาก)
- ++++ ค่า HC value **>**เท่ากับ 3.01 (พบการสร้างเอ็นไซม์มากที่สุด)

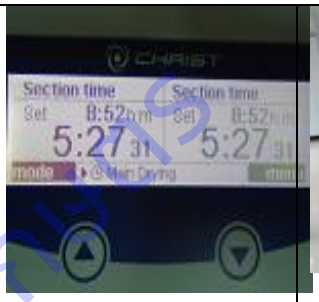
2.ตารางผลการทดสอบความสามารถในการสร้างเอ็นไซม์ชนิดสูตรน้ำ แสดงการวัดค่าการดูดกลืนแสงเพื่อวัดค่าความเข้มข้นของเชื้อ Tc14 สูตรน้ำ

ครั้งที่ 1 18 พฤศจิกายน 2563		ครั้งที่ 2 18 ธันวาคม 2563	
เอ็นไซม์สูตรน้ำ	***ค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 600 – 700 (nm)**	**เอ็นไซม์สูตรน้ำ**	***ค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 600 – 700 (nm)**
20%	0.013	20%	0.002
40%	0.013	40%	0.001
50%	0.014	50%	0.002
80%	0.000	80%	0.01
ความบริสุทธิ์ของผงเอ็นไซม์ (เชื้อ/ปริมาตร) (0.5 กรัม/น้ำ 5 มิลลิลิตร)	0.317		0.307

กรมวิชาการเกษตร

3.ตารางผลการทดสอบความสามารถในการสร้างเอ็นไซม์สูตรผง แสดงผลการวัดค่าการดูดกลืนแสง เพื่อวัดค่าความเข้มข้นของเชื้อ Tc14 สูตรผง

สูตรผง		สูตรผง	
ปริมาณที่ใช้ (ในน้ำ)	*ค่าการดูดกลืนแสง ในช่วงความยาวคลื่น (nm)	ปริมาณที่ใช้ (ในน้ำ)	*ค่าการดูดกลืนแสง ในช่วงความยาวคลื่น (nm)
0.5 ก./น้ำ 5 มล.	2.109/2.123	0.5 ก./น้ำ 5 มล.	2.208/2.123

		
Vacuum pump RZ 2.5 S/N: 41894011	โหมด Freeze drying mode: Section time set: 8.52 h:m	Alpha 1-2 LD plus

ภาพแสดงเครื่อง Vacuum pump RZ 2.5 S/N: 41894011 max. 2.3/2.8 m3/h $4x10^{-4}$ mbar 230v/50/60 HZ VACUUBRAND GMBN+Co KG Alfred-Zippe-Str.4 97877, Wertheim Germany. ภาพแสดงการตั้งค่าเครื่อง Freeze drying CHRIST Alpha 1-2 LD plus ในโหมด Freeze drying mode: Section time set: 8.52 h:m

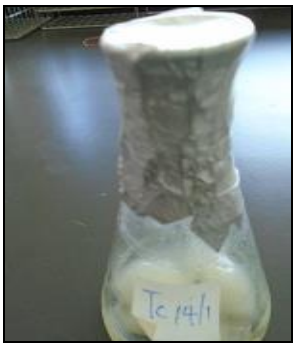
หมายเหตุ

รูปแบบ :

- หัวเรื่องข้อ 1-13 : ตัวอักษร TH SarabunPSK ขนาด 16 Point ตัวหนา
- เนื้อหา : ตัวอักษร TH SarabunPSK ขนาด 16 Point ตัวธรรมดา
- Page Setup : ด้านบน 2.5 ซม. ด้านซ้าย 2.5 ซม. ด้านขวา 2 ซม. ด้านล่าง 2.5 ซม.
- ขนาด A4 โดยใช้ Program Microsoft Word

* ให้แนบไฟล์รูปภาพประกอบด้วย เพื่อนำไปจัดทำรูปเล่มต่อไป

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 1

ภาพที่ 2

ภาพที่ 1 เส้นใยเชื้อราไตรเดอร์มาในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CMC

ภาพที่ 2 การบ่มเชื้อไตรโคเดอร์มาในอาหารเหลวในระดับขวดเขย่า (flask-cultured) ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ

ภาพที่ 3a

ภาพที่ 3b

ภาพที่ 3a ผงเอ็นไซม์ที่ได้จากการผ่านกระบวนการ Freeze-dried ในเครื่อง Freeze drying CHRIST ALPHA 1-2 LD PLUS

ภาพที่ 3b ผงเอ็นไซม์ที่ได้จากการผ่านกระบวนการ Freeze-dried ก่อนเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

ภาพที่ 4a

ภาพที่ 4b

ภาพที่ 4c

ภาพที่ 4a ต้นพริกอายุ 1 เดือน ก่อนลงเชื้อไฟทอปธอรา (control)

ภาพที่ 4b ต้นพริกที่ราดด้วยซัสเพนชัน (suspension) เชื้อไฟทอปธอรา ห่อหุ้มด้วยพลาสติกเพื่อควบคุมความชื้น บ่มทิ้งไว้นาน 15 วัน

ภาพที่ 4c การทดสอบประสิทธิภาพการเจริญของไฟทอปธอราที่มีต่อเอ็นไซม์เซลลูเลสไตรโคเดอร์มา Tc14 ที่ได้จากการผ่านกระบวนการ Freeze-dried ในระดับโรงเรือนทดลอง

กรมวิชาการเกษตร

กรมวิชาการเกษตร