



วิทยานิพนธ์

ศักยภาพของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ในการชักนำให้มะเขือเทศ
ต้านทานต่อโรคราใบดำสาเหตุจากเชื้อรา *Pseudocercospora fuligena*

POTENTIAL OF *Trichoderma harzianum* FOR INDUCING
RESISTANCE IN TOMATO AGAINST BLACK LEAF MOLD
CAUSED BY *Pseudocercospora fuligena*

นายขวัญเนตร หินอ่อน

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2550



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร

โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง ศักยภาพของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ในการชักนำให้มะเขือเทศต้านทานต่อ
โรคราใบดำสาเหตุจากเชื้อรา *Pseudocercospora fuligena*

Potential of *Trichoderma harzianum* for Inducing Resistance in Tomato Against
Black Leaf Mold Caused by *Pseudocercospora fuligena*

นามผู้วิจัย นายขวัญเนตร หินอ่อน

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์วรัณวิไล อินทนู, วท.ด.)

กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์จิระเดช แจ่มสว่าง, Ph.D.)

กรรมการ

(อาจารย์วิษุพร จันทร์ศรี, D.Agr.)

ประธานสาขาวิชา

(รองศาสตราจารย์พงศ์เทพ อัครชนกุล, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์วินัย อัจจงหาญ, M.A.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ศักยภาพของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ในการชักนำให้มะเขือเทศต้านทานต่อโรคราใบดำ
สาเหตุจากเชื้อรา *Pseudocercospora fuligena*

Potential of *Trichoderma harzianum* for Inducing Resistance in Tomato Against Black Leaf Mold
Caused by *Pseudocercospora fuligena*

โดย

นายขวัญเนตร หินอ่อน

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

พ.ศ. 2550

ขวัญเนตร หินอ่อน 2550: สักยภาพของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ในการชักนำให้มะเขือเทศต้านทานต่อโรคราใบดำสาเหตุจากเชื้อรา *Pseudocercospora fuligena* ปรินญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา ภาควิชาการเกษตรที่ปรึกษา: ผู้ช่วยศาสตราจารย์วรรณวิไล อินทนู, วท.ค. 85 หน้า

การใช้สปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01, T50 และ T152 พ่นลงบนวัสดุปลูก ไร้ดินและบนต้นมะเขือเทศ ทุกๆ 2 สัปดาห์ รวม 5 ครั้ง หลังจากพ่นเชื้อรา *T. harzianum* ครั้งที่ 5 หรือสารเคมี mancozeb ครบ 24 ชั่วโมง จึงพ่นเชื้อรา *Pseudocercospora fuligena* สาเหตุโรคราใบดำของมะเขือเทศ ที่ความเข้มข้น 1×10^4 สปอร์/มิลลิลิตร พบว่าความรุนแรงของโรคไม่แตกต่างกันทางสถิติกับการใช้สารเคมี mancozeb โดยสามารถลดการเกิดโรคได้ 50.62, 62.74 และ 37.51 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่พ่นเชื้อรา *P. fuligena* (เกิดโรค 51.24 เปอร์เซ็นต์) ในขณะที่กรรมวิธีที่พ่นเฉพาะสายพันธุ์ CB-Pin-01 และ T50 สามารถลดการเกิดโรคราใบดำ 45.55 และ 47.81 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่ไม่ได้พ่นเชื้อรา *P. fuligena* (เกิดโรค 39.01 เปอร์เซ็นต์)

การศึกษาเชื้อรา *P. fuligena* ต่อการเกิดโรคและ specific activity ของเอนไซม์ β -1,3-glucanase และเอนไซม์ chitinase โดยการพ่นสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *P. fuligena* ความเข้มข้น 1×10^4 สปอร์/มิลลิลิตร ที่ใบมะเขือเทศอายุ 4 สัปดาห์หลังย้ายกล้า พบว่ามีความรุนแรงของโรคเพิ่มขึ้น 12.60 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (ไม่ได้ปลูกเชื้อโรค) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และจากการตรวจสอบ specific activity ของเอนไซม์ β -1,3-glucanase และเอนไซม์ chitinase ทุกวันเป็นเวลา 14 วันหลังจากการพ่นสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *P. fuligena* พบมีกิจกรรมของเอนไซม์ β -1,3-glucanase และเอนไซม์ chitinase เพิ่มขึ้นสูงสุดในวันที่ 1 และ 3 โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 45.47 และ 29.36 U/mg protein ตามลำดับ

การทดลองการชักนำให้มะเขือเทศต้านทานต่อโรคราใบดำด้วยการรดมะเขือเทศด้วยสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01, T50 และ T152 ทุกสัปดาห์จนครบ 4 สัปดาห์ จึงพ่นเชื้อรา *P. fuligena* ความเข้มข้น 1×10^4 สปอร์/มิลลิลิตร พบว่าสามารถลดการเกิดโรคได้ 21.26 - 60.95 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การรดด้วยสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *T. harzianum* ร่วมกับการปลูกเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* สาเหตุของโรครากเน่าในมะเขือเทศ พบว่าเชื้อรา *T. harzianum* ทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถลดการเข้าครอบครองรากของเชื้อรา *P. aphanidermatum* ได้ และชักนำให้มะเขือเทศต้านทานต่อโรคราใบดำของมะเขือเทศสาเหตุจากเชื้อรา *P. fuligena* โดยลดการเกิดโรคได้ 18.70 - 67.05 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01, T50 และ T152 ยังสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของมะเขือเทศได้ โดยเพิ่มน้ำหนักและความสูงของต้น น้ำหนักราก ความยาวราก อย่างไรก็ตามผลผลิตของมะเขือเทศไม่แตกต่างจากกรรมวิธีควบคุมที่ปลูกเชื้อโรค

Khwannet Hin-on 2007: Potential of *Trichoderma harzianum* for Inducing Resistance in Tomato Against Black Leaf Mold Caused by *Pseudocercospora fuligena*. Master of Science (Agricultural Biotechnology), Major Field: Agricultural Biotechnology, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Assistant Professor Wanwilai Intanoo, Ph.D. 85 pages.

Spore suspensions of *Trichoderma harzianum* (strains CB-Pin-01, T50 and T152) were sprayed every other week (5 times) on soilless planting medium and on whole tomato plant. After the 5th spraying of *T. harzianum* or mancozeb spray for 24 hrs., *Pseudocercospora fuligena*, a causal agent of black leaf mold (BLM) at 1×10^4 spore/ml was inoculated on test plants. In *P. fuligena* inoculated treatments strains CB-Pin-01, T50 and T152 significantly reduced BLM by 50.62%, 62.74% and 37.51%, respectively as compared to a pathogen inoculated control (51.24%). These efficacies were comparable to a mancozeb treatment which reduced BLM by 54.22 %. Natural infection of BLM (uninoculated control) was 39.01 %. Spray application of *T. harzianum* strains CB-Pin-01 and T50 significantly reduced disease severity of BLM by 45.55 % and 47.81 %, respectively, when compared to a pathogen uninoculated control.

Study on pathogenicity and specific activities of β -1,3-glucanase and chitinase by spraying spore suspensions of *P. fuligena* at 1×10^4 spore/ml on tomato leaves at 4 weeks after transplanting showed that disease severity was 12.60 % significantly increased as compared to a non-inoculated control. Determination of specific activities of β -1,3-glucanase and chitinase after spraying spore suspensions of *P. fuligena* everyday until 14 days revealed the increase of enzyme activity in plant at the 1st and 3rd day with amount of 45.47 and 29.36 U/mg protein, respectively.

On experiment for inducing resistance in tomato against BLM, tomato plants were drenched with spore suspensions of *T. harzianum* strains CB-Pin-01, T50 and T152 every week for four times and then sprayed with spore suspensions of *P. fuligena* at 1×10^4 spore/ml. The BLM incidences were reduced by 21.26 - 60.95%. While drenching of tomato plants with spore suspensions of *T. harzianum* in combination with inoculation of *Pythium aphanidermatum*, a causal agent of tomato root rot revealed that all strains of *T. harzianum* reduced colonization of *P. aphanidermatum* on tomato roots and induced resistance in tomato against BLM with 18.70 – 67.95 % of disease reduction. In addition, *T. harzianum* strains CB-Pin-01, T50 and T152 promoted growth of tomato plant by increasing weight and height of stem, weight and length of roots, however, yield of tomato was not significantly different as compared to a pathogen inoculated control.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ผศ. ดร.วรรณวิไล อินทนู ประธานกรรมการ ผศ.ดร. จิระเดช แจ่มสว่าง กรรมการสาขาวิชาเอกและดร. วิชชุพร จันทรศรี กรรมการสาขาวิชารอง และอาจารย์ รัชภพ บรรเจิดเชิดชู ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัยที่ได้ให้คำแนะนำในการศึกษาวิจัยและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ คุณถวัลย์ คุ่มซ่าง คุณเครือวัลย์ ดาวงษ์ คุณวาสนา ฤทธิ์ไธสง คุณกรพินธุ์ ทนกล้า สำหรับความช่วยเหลือทุกอย่างและขอขอบคุณเพื่อน ๆ และน้องๆ ในห้องปฏิบัติการ ควบคุมโรคพืชโดยชีวภาพ ภาควิชาโรคพืช ที่คอยเป็นกำลังใจและช่วยเหลือในเวลาทำการทดลอง

ขอขอบคุณ คุณพ่อมานิต คุณแม่อุไร หินอ่อน คุณพจนารถ หินอ่อน และ คุณ วรพรรณ อภิรัตน์โยธิน ที่เป็นแรงบันดาลใจให้ศึกษาต่อในครั้งนี้ และสำหรับแรงผลักดันต่าง ๆ และ กำลังใจ ที่มีส่วนช่วยให้สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาโท

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โดยงบประมาณของ โครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรภายใต้โครงการบัณฑิตศึกษาและ วิจัยสาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการ การอุดมศึกษากระทรวงศึกษาธิการ

ขวัญเนตร หินอ่อน

พฤษภาคม 2550

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(5)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	15
อุปกรณ์	15
วิธีการ	16
ผลและวิจารณ์ผล	28
สรุป	57
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	58
ภาคผนวก	67
ภาคผนวก ก สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์และการผลิตเชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดสด	68
ภาคผนวก ข สารเคมีและวิธีวิเคราะห์ทางเคมี	72
ภาคผนวก ค ภาพประกอบผลการทดลอง	78
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	85

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การชักนำให้มะเขือเทศต้านทานโรค	11
2	ผลของการพ่นสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> ทุก 2 สัปดาห์ทั้งต้นมะเขือเทศเพื่อลดโรคราใบดำของมะเขือเทศสาเหตุจากเชื้อรา <i>Pseudocercospora fuligena</i> (Pf)	30
3	ความรุนแรงของโรคราใบดำของมะเขือเทศ หลังจากพ่นเชื้อรา <i>Pseudocercospora fuligena</i> (Pf) ไปแล้ว 4 สัปดาห์	39
4	ความรุนแรงของโรค และเปอร์เซ็นต์การลดการเกิดโรคราใบดำของมะเขือเทศ หลังจากการพ่นเชื้อรา <i>Pseudocercospora fuligena</i> (Pf) ไปแล้ว 6, 8 และ 10 สัปดาห์	42
5	ค่าเฉลี่ยน้ำหนักลำต้น และน้ำหนักรากของมะเขือเทศ เมื่อสิ้นสุดการทดลองที่มีการรดเชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> สายพันธุ์ CB-Pin-01, T50 และ T152 ร่วมกับการปลูกเชื้อรา <i>Pythium aphanidermatum</i> (Pa) และพ่นเชื้อรา <i>Pseudocercospora fuligena</i> (Pf)	45
6	ค่าเฉลี่ยความสูงลำต้น ความยาวราก และน้ำหนักผลผลิตของมะเขือเทศ เมื่อสิ้นสุดการทดลองที่มีการรดเชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> สายพันธุ์ CB-Pin-01, T50 และ T152 ร่วมกับการปลูกเชื้อรา <i>Pythium aphanidermatum</i> (Pa) และพ่นเชื้อรา <i>Pseudocercospora fuligena</i> (Pf)	46
7	แสดงปริมาณประชากร เฮอร์เซ็นต์การครอบครองรากเมื่อสิ้นสุดการทดลองที่มีการรดเชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> สายพันธุ์ CB-Pin-01, T50 และ T152 ร่วมกับการปลูกเชื้อรา <i>Pythium aphanidermatum</i> (Pa) และพ่นเชื้อรา <i>Pseudocercospora fuligena</i> (Pf)	49

สารบัญญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แสดงค่า specific activity ของเอนไซม์ β -1,3-glucanase ในใบและยอดมะเขือเทศ	32
2	แสดงค่า specific activity ของเอนไซม์ chitinase ในใบและยอดมะเขือเทศ	33
3	แสดงค่า specific activity ของเอนไซม์ β -1,3-glucanase ในใบและยอดของกล้ามะเขือเทศ เมื่อปลูกเชื้อรา <i>Pythium aphanidermatum</i> (Pa)	36
4	แสดงค่า specific activity ของเอนไซม์ β -1,3-glucanase ในใบและยอดมะเขือเทศ เมื่อรดด้วยเชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> และปลูกเชื้อรา <i>Pythium aphanidermatum</i> (Pa)	37
5	แสดงค่า specific activity ของเอนไซม์ chitinase ในใบและยอดมะเขือเทศ เมื่อรดด้วยเชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> และปลูกเชื้อรา <i>Pythium aphanidermatum</i> (Pa)	38
6	แสดงค่า specific activity ของเอนไซม์ β -1,3-glucanase ในใบและยอดมะเขือเทศ เมื่อพ่นด้วยเชื้อรา <i>Pseudocercospora fuligena</i>	40
7	แสดงค่า specific activity ของเอนไซม์ chitinase ในใบและยอดมะเขือเทศ เมื่อพ่นด้วยเชื้อรา <i>Pseudocercospora fuligena</i>	40
8	แสดงค่า specific activity ของเอนไซม์ ในใบและยอดมะเขือเทศ เมื่อพ่นด้วยเชื้อรา <i>Pseudocercospora fuligena</i> (Pf) และปลูกเชื้อรา <i>Pythium aphanidermatum</i> (Pa)	53
9	แสดงค่า specific activity ของเอนไซม์ β -1,3-glucanase ในใบและยอดมะเขือเทศ เมื่อพ่นด้วยเชื้อรา <i>Pseudocercospora fuligena</i> (Pf) และรดด้วยเชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> ร่วมกับการปลูกเชื้อรา <i>Pythium aphanidermatum</i> (Pa)	54
10	แสดงค่า specific activity ของเอนไซม์ chitinase ในใบและยอดมะเขือเทศ เมื่อพ่นด้วยเชื้อรา <i>Pseudocercospora fuligena</i> (Pf) และรดด้วยเชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> ร่วมกับการปลูกเชื้อรา <i>Pythium aphanidermatum</i> (Pa)	55

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่		หน้า
1	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ BSA กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร (A 750 nm)	74
2	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกลูโคสกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร (A 520 nm)	76
3	แสดงกราฟมาตรฐานระหว่าง N-acetylglucosamine กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร (A 550 nm)	77
4	ประสิทธิภาพของเชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> สายพันธุ์ต่างๆ หลังจากการทดสอบรบกวนของเชื้อรา <i>T. harzianum</i> ร่วมกับการปลูกเชื้อรา <i>Pythium aphanidermatum</i> และชักนำให้ต้านทานต่อโรคราใบดำของมะเขือเทศสาเหตุจากเชื้อรา <i>Pseudocercospora fuligena</i> (ในโรงเรือน)	79
5	ขนาดและความยาวของราก หลังจากการทดสอบรบกวนของเชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> ร่วมกับการปลูกเชื้อรา <i>Pythium aphanidermatum</i> และชักนำให้ต้านทานต่อโรคราใบดำของมะเขือเทศสาเหตุจากเชื้อรา <i>Pseudocercospora fuligena</i>	81
6	การเจริญของเชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> สายพันธุ์ต่างๆ ในวัสดุปลูก หลังจากการทำ dilution spread plate ที่ระดับความเข้มข้น 10^4 CFU/กรัม	83
7	การเจริญของเชื้อรา <i>Pythium aphanidermatum</i> ที่เจริญครอบครองรากมะเขือเทศหลังจาก ล้างด้วยน้ำนิ่งฆ่าเชื้อ และล้างด้วยสารละลาย 0.525 % sodium hydrochlorite	84

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

A	=	ค่าดูดกลืนแสง (Absorbance)
BLM	=	โรคราใบดำของมะเขือเทศ (Black leaf mold of tomato)
BSA	=	Bovine Serum Albumine
CFU	=	จำนวนโคโลนีที่ตรวจพบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (colony forming unit)
cm	=	เซนติเมตร (centimeter)
Conc	=	Concentration
M	=	โมลาร์ (Molar)
mg	=	มิลลิกรัม (milligram)
ml	=	มิลลิลิตร (milliliter)
NAG	=	N-acetyl glucosamine
nm	=	นาโนเมตร (nanometer)
Pa	=	เชื้อรา <i>Pythium aphanidermatum</i>
PDA	=	อาหารแข็งเลี้ยงเชื้อรา (Potato dextrose agar)
Pf	=	เชื้อรา <i>Pseudocercospora fuligena</i>
ppm	=	ส่วนในล้านส่วน (part per million)
PR – protein	=	pathogenesis-related protein
T	=	เชื้อรา <i>Trichoderma</i>
U	=	unit/mg protein
V	=	ปริมาตร (volume)
W	=	น้ำหนัก (weight)
WA	=	water agar
μg	=	ไมโครกรัม (microgram)
°C	=	องศาเซลเซียส
%	=	เปอร์เซ็นต์

ศักยภาพของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ในการชักนำให้มะเขือเทศต้านทานต่อ
โรคราใบดำสาเหตุจากเชื้อรา *Pseudocercospora fuligena*

Potential of *Trichoderma harzianum* for Inducing Resistance in Tomato Against
Black Leaf Mold Caused by *Pseudocercospora fuligena*

คำนำ

มะเขือเทศ จัดเป็นพืชผักที่มีความสำคัญทั้งในแง่การบริโภคผลสดและการผลิตเชิงอุตสาหกรรม ปริมาณการส่งออกมะเขือเทศสดและผลิตภัณฑ์มะเขือเทศแปรรูป เช่น มะเขือเทศเข้มข้น ซอสมะเขือเทศ และน้ำมะเขือเทศ เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องทุกปี ดังนั้นการปลูกมะเขือเทศจึงเป็นอาชีพทางการเกษตรที่ให้ผลตอบแทนค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับพืชผักชนิดอื่นทั่วไป อย่างไรก็ตามการผลิตมะเขือเทศก็มีอุปสรรคค่อนข้างมากเช่นกัน โดยเฉพาะด้านโรคที่เกิดจากเชื้อราต่างๆ เนื่องจากมะเขือเทศเป็นพืชผักที่อ่อนแอ จึงทำให้เชื้อโรคต่างๆ เข้าทำลายได้ง่าย (ศักดิ์, 2537) ตัวอย่างโรคของมะเขือเทศที่สำคัญ ที่มีสาเหตุจากเชื้อราได้แก่ early blight (*Alternaria solani*), late blight (*Phytophthora infestans*), leaf mould (*Mycovellosiella fulva*), powdery mildew (*Leveillula taurica*), southern blight (*Corticium rolfsii*), Phytophthora root rot (*Phytophthora capsici*, *Phytophthora parasitica*), target spot (*Corynespora casicola*) และ black leaf mold (*Pseudocercospora fuligena*) (ศุภลักษณ์, 2536; CAB international, 2003)

โรคราใบดำในมะเขือเทศ (Black leaf mold) มีสาเหตุมาจากเชื้อรา *P. fuligena* เป็นโรคทางใบที่สำคัญโรคหนึ่งของมะเขือเทศที่ปลูกในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ญี่ปุ่น และเม็กซิโก ทำให้ผลผลิตลดลง โดยลดจำนวนผลและน้ำหนักของผลจากต้นที่เป็นโรค (ศุภลักษณ์, 2536) สร้างความเสียหายให้มะเขือเทศเป็นอย่างมากในช่วงฤดูฝน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระยะที่ต้นมะเขือเทศยังเล็กอยู่จะแสดงอาการอย่างรุนแรงและตายได้ (ศศิธร, 2545) เนื่องจากในปัจจุบันมีการศึกษาวิจัยเพื่อลดการใช้สารเคมีทำให้มีการนำเอาจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่าง ๆ มาใช้เพื่อทดแทนสารเคมี เช่น เชื้อรา *Trichoderma* spp. เป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีผู้ศึกษากันมากเนื่องจากมีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมเชื้อโรคในดิน สามารถครอบครองรากพืช ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช อยู่รอดในดินได้นาน สามารถผลิตเอนไซม์ และสารปฏิชีวนะที่มีผลต่อการเข้าทำลายเชื้อโรคหลายชนิดได้ แต่

การศึกษาเรื่องการชักนำให้พืชเกิดความต้านทานโรค (induced resistance) โดย *Trichoderma* spp. ยังมีการศึกษาน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับ rhizobacteria ซึ่งอาจเป็นเพราะการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการใช้ *Trichoderma* spp. ควบคุมโรคนั้นเน้นไปที่ การแข่งขัน (competition) การเป็นปรสิต (parasitism) และการสร้างสารปฏิชีวนะ (antibiosis) มากกว่า อย่างไรก็ตามได้มีการอธิบายถึงการชักนำให้พืชเกิดความต้านทานต่อโรคโดย *Trichoderma* spp. อย่างชัดเจนเป็นครั้งแรก ในปี 1997 ด้วยการที่ใส่เชื้อรา *T. harzianum* T-39 ลงดิน แล้วทำให้ใบของถั่วต้านทานต่อการเกิดโรคบนลำต้นและใบ ซึ่งมีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Botrytis cinerea* และ *Colletotrichum lindemuthianum* ได้ และมีการตรวจพบ T-39 เฉพาะที่รากถั่วเท่านั้น (Harman et. al. 2004a)

ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้จึงมุ่งที่จะศึกษาความสามารถของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่มีการศึกษามาก่อนว่าสามารถควบคุมโรคต่าง ๆ ครอบคลุมรากและกระตุ้นการเจริญของพืชได้ มาทดสอบการชักนำให้มะเขือเทศต้านทานต่อโรคราใบดำสาเหตุจากเชื้อรา *Pseudocercospora fuligena* ทั้งในกรณีที่มีหรือไม่มีเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* สาเหตุโรครากและโคนเน่าของมะเขือเทศ

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาการใช้เชื้อรา *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 T50 และ T152 ในการลดการเกิดโรคราใบดำของมะเขือเทศ
2. เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลง specific activity ของเอนไซม์ β -1,3-glucanase และเอนไซม์ chitinase ในใบและยอดของมะเขือเทศ เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อรา *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 T50 และ T152
3. เพื่อศึกษาผลของเชื้อรา *Pseudocercospora fuligena* ต่อการเกิดโรคราใบดำและ specific activity ของเอนไซม์ β -1,3- glucanase ในมะเขือเทศ
4. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ต่อการลดการเกิดโรค และการชักนำให้มะเขือเทศต้านทานต่อการเกิดโรคราใบดำจากเชื้อรา *Pseudocercospora fuligena* ในกรณีที่วัสดุปลูกมีเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* สาเหตุโรครากเน่าของมะเขือเทศ

การตรวจเอกสาร

1. โรคราใบดำของมะเขือเทศ

โรคราใบดำ (Black leaf mold) หรือโรคราเขม่า (Gray leaf mold) หรือโรคใบเป็นเหลือง (Cercospora leaf mold) เป็นโรคทางใบที่สำคัญโรคหนึ่งของมะเขือเทศที่พบบ่อย เกิดขึ้นทั่วไปในเกือบทุกแห่งที่มีการปลูกมะเขือเทศ แต่ในบางท้องถิ่นที่มีสภาพเหมาะสมก็อาจจะกลายเป็นโรคที่สร้างความเสียหายรุนแรงได้ (ศักดิ์, 2537) โรคนี้สร้างความเสียหายแก่มะเขือเทศอย่างมากในช่วงฤดูฝน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระยะที่ต้นมะเขือเทศยังเล็กอยู่ จะแสดงอาการอย่างรุนแรงและอาจถึงตายได้ (ศศิธร, 2545)

1.1 ลักษณะอาการของโรค

เชื้อราสาเหตุโรคอาจเข้าทำลายลำต้น กิ่งอ่อนและก้านใบ (petiole) ก่อให้เกิดอาการแผลสีน้ำตาลหรือดำ ลักษณะกลมหรือรียาว ส่วนใหญ่อารมณ์จะเริ่มจากใบแก่ที่อยู่ตอนล่างของต้นก่อน แล้วจึงค่อยกระจายไปยังใบที่อยู่สูงขึ้นไปจนในที่สุดหมดทั้งต้น (ศักดิ์, 2537) แต่ยังไม่มียารายงานถึงการเข้าทำลายของเชื้อนี้ในผล (Mohanty and Mohanty, 1955; Sherf and Macneb, 1986) โรคราใบดำสามารถก่อให้เกิดความเสียหายโดยการลดปริมาณและคุณภาพของผลผลิตมะเขือเทศ (Hartman *et al.*, 1991; Hartman and Wang, 1992) Hartman and Wang (1992) ได้รายงานว่า มะเขือเทศพันธุ์ Tainan Selection No.2 ที่ปลูกในไต้หวันในปี 1989 -1990 เป็นโรคนี้ทำให้ผลผลิตลดลงถึง 32 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากต้นมะเขือเทศที่ถูกเชื้อเข้าทำลาย ติดผลน้อยและมีขนาดเล็ก ยังไม่มีรายงานถึงการถ่ายทอดโรคนี้ผ่านทางเมล็ดพันธุ์ (seed-born infection) (CAB international, 2003)

โรคราใบดำมักพบในใบแก่ หรือใบล่าง ๆ ของทรงพุ่ม โดยใบมะเขือเทศที่ถูกเชื้อเข้าทำลายจะพบแผลจุดค่อนข้างกลมสีซีดบนใบ ขนาดประมาณ 1-5 มิลลิเมตร จากนั้นจะเกิดเป็นเซลล์ตายสีเหลืองขึ้นทั่วไปที่ด้านหลังหรือด้านบนของใบ ต่อมาที่ด้านใต้ หรือท้องใบจะมีการสร้างสปอร์สีน้ำตาลหรือดำเกิดขึ้น เนื่องจากเชื้อราสามารถสร้างสปอร์ได้มากมายบนแผล และสร้างได้ทั้งด้านบนใบและใต้ใบมะเขือเทศ โดยเฉพาะบริเวณใต้ใบ ทำให้มองเห็นเป็นสีดำ แผลจะแห้งเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ตรงกลางจุดเป็นสีขาว ปกติแผลแต่ละแผลจะมีขนาดไม่โตนัก แต่ถ้าเป็นมาก

แผลอาจจะมาเชื่อมต่อกันเกิดเป็นแผลขนาดใหญ่ทำให้ใบเกิดบิดงอ เหี่ยวเฉาแห้งตาย รวมทั้งหลุดร่วงในขณะที่ใบยังไม่แก่จัด ในสภาพที่มีเชื้อราขึ้นปกคลุมใบเป็นสีดำ (ศักดิ์, 2537 ; Wang *et al.*, 1995)

1.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Pseudocercospora fuligena* (Roldan) Deighton

โรคราใบดำมีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Pseudocercospora fuligena* (Roldan) Deighton (syn. *Cercospora fuligena* Roldan). เป็นราพวก imperfecti ขยายพันธุ์โดยการสร้างโคนิเดีย (conidia) ซึ่งพบได้ตั้งแต่สี subhyaline ถึง สี pale olivaceous รูปร่างโคนิเดียมีตั้งแต่แบบ cylindrical จนถึงแบบ cylindrical obclavate หรือแบบ straight จนถึงแบบ slightly curve เซลล์ส่วนปลาย (tip cell) กลมมน (round) เซลล์ส่วนฐาน (basal cell) มีรูปร่างเป็นแบบ long obconic จนถึงแบบ long obconical truncate ความยาวโคนิเดียประมาณ 9 -137x 3.5-6.1 μm พบจำนวนผนังกัน (septum) ตั้งแต่ 2-27 septa ต่อโคนิเดีย hilum เป็นแบบ unthicken บาง โคนิเดียสามารถแตกแขนง หรือแตกเป็นง่ามได้บริเวณเซลล์ส่วนปลาย (tip cell) (Hartman *et al.*, 1991)

มีรายงานว่าโคนิเดียของเชื้อนี้สามารถอยู่รอดได้นานถึง 6 เดือนในดินและในใบมะเขือเทศที่เป็นโรคที่อยู่ในสภาพอากาศแห้ง แต่ไม่สามารถอยู่ได้ถึง 40 วันในสภาพอากาศชื้น (Yamada, 1951) primary inoculum พบได้ในเศษซากพืชที่เป็นโรคและจากพืชอาศัยต่าง ๆ โดยพืชอาศัยของเชื้อ *P. fuligena* นี้ได้แก่พืชในตระกูล Solanaceae เช่น มะเขือ (eggplant; *Solanum melongena* L.), black nightshade (*Solanum nigrum* L.) (Harman *et al.*, 1991) นอกจากนี้ยังมี *Lycopersicon* spp. 5 สายพันธุ์, *Solanum* spp. 3 สายพันธุ์ และ *Capsicum* spp. 4 สายพันธุ์ที่ได้ทดสอบและมีรายงานว่า เป็นพืชอาศัยของ *P. fuligena* อีกด้วย (Wang *et al.*, 1995)

1.3 สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเกิดและการแพร่ระบาดของโรค

โรคนี้อาจพัฒนาได้ดีหากมีอุณหภูมิที่เหมาะสม ความชื้นสัมพัทธ์ และช่วงเวลาที่ใบเปียกชื้นนานเพียงพอ หากผิวใบได้รับความชื้นจากน้ำค้าง ฝน และหมอก จะเป็นปัจจัยที่เหมาะสมในการเข้าทำลายมาก โดยหากช่วงเวลาที่ใบได้รับความชื้นมากขึ้น ก็จะเพิ่มอัตราความรุนแรงของโรค เพราะฉะนั้น โรคนี้อาจเกิดรุนแรงในช่วงฤดูฝนที่มีอากาศร้อน สปอร์เชื้อราจะไม่งอกหากมีความชื้นสัมพัทธ์น้อยกว่า 85% การแพร่ระบาดของเชื้อสาเหตุเกิดขึ้นได้โดยโคนิเดียจะปลิวไปตาม

ลม หรือการสาดกระเซ็นของน้ำฝนหรือน้ำที่รดให้กับต้นพืช หรือติดไปกับแมลง มนุษย์ สัตว์ และเครื่องมือการเกษตร เมื่อสปอร์ตกลงบนพืช และมีสิ่งแวดล้อมเหมาะสมก็จะงอกเป็นเส้นใยเข้าทำลายพืช แล้วเกิดอาการให้เห็นภายใน 2-3 วัน (ศักดิ์, 2537)

1.4 การป้องกันกำจัดโรค

1.4.1 ใช้พันธุ์ต้านทาน โดยตรวจสอบว่ามะเขือเทศสายพันธุ์ใดต้านทานต่อโรคในแต่ละพื้นที่ปลูก

1.4.2 ใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัด เช่น แมนโคเซบ เบโนมิล หรือ คาร์เบนดาซิม นอกจากนี้ การปลูกพืชหมุนเวียน (crop rotation) สลับกับการใช้สารเคมีที่มีฤทธิ์ทำลายกว้าง (broad spectrum fungicide) จะช่วยป้องกันไม่ให้เชื้อราเกิดสายพันธุ์ต้านทานได้

1.4.3 ไม่ปลูกพืชตระกูล Solanaceous crop เช่น พริก และมะเขือ เป็นเวลา 2 ปี และควบคุมวัชพืช โดยเฉพาะ black nightshade (*Solanum nigrum* L.) ที่อาจเป็นพืชอาศัยของเชื้อสาเหตุโรคได้

1.4.4 กำจัดเศษซากต้นมะเขือเทศที่เป็นโรคออกจากแปลง เพื่อเป็นการลดชิ้นส่วนก่อโรค (inoculum) หรืออาจใช้วิธีฝังเศษซากพืชดังกล่าวลงดิน เพื่อเป็นการเร่งการย่อยสลายซากพืชที่เป็นโรค และเป็นการช่วยให้จุลินทรีย์ดินสามารถเข้าย่อยสลายเชื้อราได้ง่ายขึ้น

1.4.5 หลีกเลี่ยงการปลูกมะเขือเทศรุ่นใหม่ หากยังพบต้นที่เป็นโรคอยู่บริเวณใกล้เคียง เนื่องจากสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรคจากต้นที่เป็นโรคสามารถปลิวเข้ามาทำลายต้นรุ่นใหม่ได้ และทำให้ช่วงต้นฤดูปลูกของมะเขือเทศดังกล่าวมีความระดับความรุนแรงของโรคที่สูงกว่าปกติ

1.4.6 ลดความชื้นที่อาจเกิดบนใบ โดยทำค้างให้มะเขือเทศ (staking tomato) เว้นระยะห่างในการปลูกเพื่อให้ระบายอากาศได้ดี รวมทั้งหลีกเลี่ยงการให้น้ำแบบ overhead irrigation (CAB international, 2003)

2. กลไกการต้านทานโรคในพืช (Mechanism of resistance in plant)

กลไกการของความต้านทานโรคในพืช สามารถแบ่งออกได้ 2 พวก คือ

2.1 Passive resistance หมายถึง การป้องกันตัวเองของพืช ซึ่งมีอยู่ก่อนแล้วในพืชหรือก่อนที่จะถูกเชื้อโรคเข้าทำลาย แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ

2.1.1 Structural barrier หมายถึง โครงสร้างของพืช ซึ่งสามารถป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อโรคได้ เช่น ชั้น cuticle ที่มีความหนามาก

2.1.2 Chemical barrier หมายถึง กระบวนการทางเคมีที่มีอยู่ในพืชซึ่งสามารถทำลายหรือป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อโรคได้ เช่น สารพวก fungitoxic, fungistatic ซึ่งเป็นสารประกอบพวก alkaloid, phenol และ glycosides

2.2 Active resistance หมายถึง กระบวนการที่ก่อให้เกิดความต้านทานโรคขึ้นในพืช ซึ่งถูกกระตุ้นให้สร้างขึ้นมาโดยเชื้อโรค หรือโดยพืช เป็นผลเนื่องมาจากความสัมพันธ์ร่วมกันระหว่างเซลล์ต่อเซลล์พืช และเชื้อโรค ผลจากปฏิกิริยาร่วมกันนี้จะไปยับยั้งการพัฒนาการของเชื้อโรค ขบวนการต้านทานแบบนี้อาจเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า Defense mechanism แบ่งออกเป็น 2 ชนิด ได้แก่

2.2.1 Structural Defense mechanism คือ กลไกการของความต้านทานโรคที่เกี่ยวข้องกับโครงสร้างที่สร้างขึ้นมาภายหลังจากเชื้อโรคเข้าทำลายแล้ว (ณรงค์, 2529) เช่น การเปลี่ยนแปลงผนังเซลล์ หรือ การสร้าง callose, lignin และ cellulose (Whipps, 2001)

2.2.2 Chemical Defense mechanism คือ กลไกการของความต้านทานโรคที่เกี่ยวข้องกับขบวนการทางชีวเคมีที่เกิดขึ้นด้วยการกระตุ้นของเชื้อโรค (ณรงค์, 2529) โดยทั่วไปการเปลี่ยนแปลงในพืชเมื่อถูกชักนำประกอบด้วย (1) มีการผลิต phytoalexin (2) เพิ่มการแสดงออกของ stress-related genes (3) การเพิ่มระดับของเอนไซม์ เช่น เอนไซม์ chitinase, β -1,3- glucanase, peroxidase, polyphenol oxidase, และ phenylalanine ammonia (Whipps, 2001)

นอกจากนี้พบว่า เอนไซม์ chitinase และเอนไซม์ β -1,3- glucanase ในพืชถูกกระตุ้นให้สร้างขึ้นจากชิ้นส่วนของเชื้อรา หรือที่เรียกว่า elicitors ไปกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาตอบสนองเพื่อป้องกันการรุกรานของเชื้อโรค (defense reaction) เอนไซม์หรือโปรตีนที่ถูกสร้างขึ้นในปฏิกิริยาตอบสนองนี้ เรียกว่า PR- protein ในพืช (pathogenesis related protein) (Benhamou, 1998)

3. PR โปรตีนในพืช

PR- protein (pathogenesis-related protein) ในพืชบางชนิดจัดเป็น Phytoalexins ซึ่งเป็นสารโมเลกุลเล็กที่มีคุณสมบัติในการต่อต้านจุลินทรีย์ PR- protein มีมากมายหลายชนิดแต่จะมักจะไม่พบในพืชปกติ (healthy plants) แต่จะสร้างเพิ่มขึ้นก็ต่อเมื่อมีการรุกรานของเชื้อโรค

PR- protein ที่สำคัญซึ่งมีการศึกษากันมากและมักพบในพืชที่สามารถต้านทานต่อเชื้อโรคได้ ได้แก่ เอนไซม์ 2 ชนิด คือ เอนไซม์ chitinase (β -1,4-poly-N-acetylgluco-saminidase, EC 3.2.1.14) และเอนไซม์ β -1,3- glucanase [(1,3)- β -D-glucan glucono-hydrolase (EC 3.2.1.39)] Matthieu *et al.* (1989) ได้ศึกษาการสร้าง PR - protein จากใบมะเขือเทศ โดยการปลูกเชื้อจุลินทรีย์ *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulva*) ผลการทดสอบพบว่ามีการสังเคราะห์เอนไซม์ 2 ชนิด คือ เอนไซม์ β -1,3- glucanase และเอนไซม์ chitinase เพิ่มขึ้นเพื่อป้องกันการบุกรุกของเชื้อโรค และจากการทดลองหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้ด้วยการใช้เทคนิคโครมาโตโฟกัสซึ่ง (chromatofocusing) พบว่าเอนไซม์ β -1,3- glucanase มีน้ำหนักโมเลกุล 33 กิโลดาลตัน และเอนไซม์ chitinase มีน้ำหนักโมเลกุล 27, 30 และ 32 กิโลดาลตัน

4. การชักนำให้พืชต้านทาน

Kloepper *et al.* (1992) ได้เสนอคำจำกัดความของ induced resistance ไว้ว่า เป็นการที่สิ่งมีชีวิตหรือไม่มีชีวิต (biotic or abiotic inducers) มาชักนำให้พืชมีการเปลี่ยนแปลงทาง phenotype เช่น การใส่จุลินทรีย์หรือการฉีดสารเคมีแล้วทำให้เกิดความเสียหายเฉพาะจุด (local damage) ส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีและกลไกต่าง ๆ (biochemical and mechanistic changes) เกิดขึ้น จึงเรียกการชักนำที่เกิดขึ้นในลักษณะนี้ว่า induced systemic resistance (ISR)

การชักนำการต้านทานนั้น ได้มีการอธิบายไว้ในพืชหลายชนิด ประกอบด้วยแตงกวา, แตงโม, ถั่ว, ยาสูบ, มันฝรั่ง, องุ่น, กาแฟ, ข้าวบาร์เลย์, ข้าวสาลี, ลูกแพร, แอปเปิ้ล, ลูกพลัม และคาร์เนชั่น การชักนำให้ต้านทานในมะเขือเทศนั้นมีทั้งตัวชักนำที่เป็นสารเคมี (abiotic inducers), และสิ่งมีชีวิต เช่น แบคทีเรีย, และเชื้อรา (biotic inducers) (ตารางที่ 1) ส่วนการชักนำให้มะเขือเทศต้านทานโดยเชื้อรา *Trichoderma* spp. นั้นมีรายงานไว้น้อยมากและยังไม่ค่อยชัดเจน

5. การชักนำให้พืชต้านทานโดยเชื้อรา *Trichoderma* spp.

การชักนำให้พืชต้านทานด้วยเชื้อรา *Trichoderma* spp. อธิบายไว้โดย De Meyer *et al.* (1998) ว่าเชื้อรา *T. harzianum* T39 สามารถควบคุมเชื้อรา *Botrytis cinerea* ได้ หลังจากที่ใช้เชื้อรา T39 ไปแล้ว 7 วัน สามารถชักนำให้พืชหลายชนิดเช่น มะเขือเทศ, ผักกาดหอม, พริก, ถั่วพีและยาสูบต้านทานต่อเชื้อ *B. cinerea* ด้วยการลดอาการโรค grey mold ลงถึง 25-100% รวมทั้งชะลอหรือยับยั้งการแพร่กระจายของโรคได้ ซึ่งเป็นผลสืบเนื่องมาจากการชักนำระบบต้านทาน และพบว่าการใช้ T39 ในถั่ว ได้ผลคล้ายกับการใช้ *Pseudomonas aeruginosa* KMPCH ซึ่งเป็นสายพันธุ์อ้างอิง (reference strain)

การชักนำระบบต้านทานมีทั้งในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและใบเลี้ยงคู่ ตัวอย่างเช่นการใช้ *T. harzianum* T-22 คลุกเมล็ดข้าวโพดก่อนปลูกลงในดินที่อุดมสมบูรณ์ หลังจากปลูก 10 วัน พบว่าข้าวโพด (maize inbred line Mo 17) มีการสร้างใบ ยอดและรากเป็นจำนวนมาก ขนาดของรากหลักและรากรองเพิ่มขึ้นมากกว่าการปลูกในดินที่ไม่มี T22 รวมทั้งความยาวและขนาดของรากขนกี้มากกว่ากรรมวิธีควบคุม (ที่ไม่ใส่ T22) เช่นกัน ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจาก T22 สามารถกระตุ้นการเจริญของพืชโดยตรง และป้องกันการเข้าทำลายจากเชื้อรา *P. ultimum* ที่อยู่ในดินในลักษณะของการควบคุมโดยชีววิถีจากการเป็นปรสิต มีประสิทธิภาพในการควบคุมนี้โรคเทียบเท่ากับการปลูกพืชในดินอบฆ่าเชื้อและการใช้สารเคมี mefenoxam ซึ่งมีผลควบคุมเชื้อรา *P. ultimum* ได้ ดินอ่อนของข้าวโพด Mo 17 ที่เจริญจากดินซึ่งมีการใช้ T22 มีโปรตีนในใบ กิจกรรมของ β -1,3-glucanase, exochitinase และ endochitinase เพิ่มขึ้นทั้งในรากและยอด แม้ว่า T22 จะช่วยรากเจริญได้ดี แต่มีผลต่อการสร้างยอดค่อนข้างน้อย อย่างไรก็ตาม การใช้ T22 ร่วมกับ *P. ultimum* นั้นส่งเสริมให้กิจกรรมของเอนไซม์บางชนิดเพิ่มขึ้นมากกว่าการใช้เชื้อเพียงชนิดเดียว พืชที่เจริญจากเมล็ดที่คลุกด้วย T22 เกิดอาการของโรค anthracnose ลดลง หลังจากการปลูกเชื้อที่ใบด้วยเชื้อรา *Colletotrichum graminicola* จึงเป็นการชี้ให้เห็นว่า T22 สามารถชักนำการต้านทานต่อโรคใน

ข้าวโพดได้ (Harman et al., 2004b) มีตัวอย่างอีกจำนวนมากที่แสดงให้เห็นว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. สามารถชักนำให้พืชเกิดความต้านทานได้ ด้วยปรากฏการณ์ที่สามารถควบคุมโรคในตำแหน่งที่อยู่ห่างจากการใส่เชื้อรา *Trichoderma* spp. ได้ แต่การตรวจสอบบทบาทของการชักนำให้เกิดความต้านทานต่อโรคที่เกิดกับเมล็ดหรือระบบรากก่อนข้างยาก เนื่องจาก *Trichoderma* spp. เป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่อยู่ในดินและมักอยู่บริเวณเดียวกับเชื้อสาเหตุโรค กลไกการต่อสู้จึงเป็นการแข่งขันแย่งอาหารหรือเป็นปรสิตมากกว่า แต่อย่างไรก็ตาม มีการใช้ *T. virens* สายพันธุ์กลาย (mutant strain) ที่ไม่ผลิตสารปฏิชีวนะ (antibiotic) หรือไม่เป็นปรสิต (mycoparasitic) มาทดสอบการควบคุมโรคที่เกิดกับต้นอ่อนของฝ้ายสาเหตุจาก *Rhizoctonia solani* ผลการทดสอบพบว่า *T. virens* สายพันธุ์กลายสามารถยับยั้งโรคที่เกิดกับต้นอ่อนของฝ้าย (*Gossypium hirsutum*) จากการเข้าทำลายโดย *R. solani* ได้ แสดงว่าการผลิตสารปฏิชีวนะหรือการเป็นปรสิตนั้นไม่ใช่กลไกหลักหรือเป็นกลไกเดียวของการควบคุมโรคนี้ ทั้งนี้มีความเป็นไปได้ที่การคลุกเมล็ดด้วย *T. virens* จะไปกระตุ้นให้เกิดความต้านทาน ผลการวิเคราะห์สารสกัดจากรากของฝ้ายและ hypocotyls ของต้นที่คลุกเมล็ดด้วย *T. virens* พบว่ามีการสังเคราะห์ terpenoid และมีกิจกรรมของ peroxidase เพิ่มขึ้น แต่ไม่เพิ่มขึ้นใน hypocotyls ของพืช ในกรรมวิธีควบคุมที่ไม่ได้ใส่ *T. virens* และจากผลการวิเคราะห์ terpenoid ซึ่งเป็นพิษต่อ *R. solani* พบว่าอยู่ใน pathway ของ intermediates desoxyhemigossypol (dHG) และ hemigossypol (HG) สามารถยับยั้งโรคพืชได้ดี ในขณะที่การผลิต gossypol (G) ซึ่งเป็นผลผลิตสุดท้ายมีความเป็นพิษสูงมาก ในขณะที่สายพันธุ์ของ *T. virens* และ *T. koningii* ด้านทานต่อ HG ได้มากกว่า *R. solani* ดังนั้นเชื้อรา *Trichoderma* spp. จึงอาศัยอยู่ในรากของฝ้ายได้ และสามารถชักนำให้เกิดการสังเคราะห์ terpenoid ในรากของฝ้าย (Howell et al., 2000)

ตารางที่ 1 การชักนำให้มะเขือเทศด้านทานโรค

สิ่งที่ใช้ชักนำ	เชื้อสาเหตุโรค	เอกสารอ้างอิง
1.1 จุลินทรีย์	<i>Alternaria solani</i>	Silva <i>et al.</i> , 2004a
	<i>Phytophthora infestans</i> ,	
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Septoria lycopersici</i>	
<i>B. cereus</i>	<i>A. solani</i> ; <i>Corynespora</i>	Silva <i>et al.</i> , 2004b
	<i>cassiicola</i> ; <i>Stemphylium solani</i> ;	
	<i>Oidium lycopersici</i> ;	
	<i>Xanthomonas campestris</i> pv.	
	<i>vesicatoria</i>	
<i>B. amyloliquefaciens</i> ,	Cucumber mosaic cucumovirus	Zehnder <i>et al.</i> , 2000
<i>B. pumilus</i> , <i>B. subtilis</i>		
<i>Phytophthora cryptogea</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp.	Attitalla <i>et al.</i> , 2001
	<i>lycopersici</i>	
<i>Pythium oligandrum</i>		Picard <i>et al.</i> , 2000
	<i>Phytophthora parasitica</i>	
<i>Penicillium oxalicum</i>	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	De Cal <i>et al.</i> , 1997; De Cal <i>et al.</i> , 2000
<i>F. oxysporum</i> Fo47	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	Duijff <i>et al.</i> , 1998
<i>Pseudomonas fluorescens</i>		
WCS 417		
<i>F. oxysporum</i> Fo47	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	Fuch <i>et al.</i> , 1997
<i>T. harzianum</i> T-22	<i>A. solani</i>	Seaman, 2003
<i>T. harzianum</i> T-39	<i>Botrytis cinerea</i>	De Meyer <i>et al.</i> , 1998
1.2 สารเคมี	<i>B. cinerea</i> O. <i>neolycopersici</i>	Achuo <i>et al.</i> , 2004
Benzothiadiazole		
Benzothiadiazole	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-</i> <i>lycopersici</i>	Benhamou and Be'linger, 1998

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาถึงการชักนำระบบความต้านทานในพริกโดย Ahmed *et al.* (2000) ที่พบว่า การใส่สปอร์ของ *T. harzianum* บริเวณรากพริก ทำให้การเกิด necrosis ที่บริเวณลำต้น สาเหตุจาก *Phytophthora capsici* ลดลงเกือบครึ่งหนึ่ง และทำให้มีการสะสมของ capsidiol ในตำแหน่งที่ปลูกเชื้ออีกด้วย การคลุกเมล็ดด้วย *T. harzianum* สามารถลดการเกิด necrosis ในลำต้นได้ เมื่อเปรียบเทียบกับพริกที่ไม่ได้คลุกเมล็ดด้วย *T. harzianum* แม้ว่าจะตรวจไม่พบ *T. harzianum* ในบริเวณใกล้เคียงที่เกิดอาการ necrosis ในพริก แสดงว่าไม่มีการปฏิสัมพันธ์หรือการแข่งขันโดยตรงระหว่าง *T. harzianum* และ *P. capsici* ในบริเวณที่เกิด necrosis หลังจากการปลูกเชื้อเป็นเวลา 9 วัน พบว่ามี *P. capsici* ที่แยกได้จากพืชที่ไม่ได้คลุกเมล็ดด้วย *T. harzianum* มากกว่าในพืชที่มีการคลุกเมล็ดด้วย *T. harzianum* นอกจากนี้ *T. harzianum* ยังสามารถเจริญแทรกไปในบริเวณผิวหนังของรากพริก ซึ่งเป็นการชักนำให้เกิดการตอบสนองที่ต่อต้าน *P. capsici* ได้ จากการวิเคราะห์ capsidiol ในลำต้นของพริกหลังจากการปลูกเชื้อรา *T. harzianum* เป็นเวลา 6 วัน มีความเข้มข้นมากกว่าพืชที่ไม่ได้ปลูกเชื้อรา *T. harzianum* ถึง 7 เท่า

Yedidia, *et al.* (1999) อธิบายว่า *T. harzianum* T-203 มีศักยภาพในการกระตุ้นให้พืชเกิดความต้านทานต่อโรคได้ ตรวจสอบได้โดยการปลูกเชื้อ *T. harzianum* ที่รากของต้นอ่อนแตงกวาใน aseptic hydroponic system ผลการตรวจสอบพบว่าพืชที่ใส่ *T. harzianum* มีการพัฒนามากกว่าพืชที่ไม่ได้ใส่ *T. harzianum* ตลอดการทดลอง เมื่อตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่า *T. harzianum* ส่วนใหญ่จะอยู่ใน epidermis และ outer cortex ของราก การตอบสนองของพืชพบในตำแหน่งที่ไกลออกไปจากตำแหน่งที่มีการใส่เชื้อรา *T. harzianum* โดยมีการเพิ่มกิจกรรมของ peroxidase และ chitinase ภายใน 48 ถึง 72 ชั่วโมง ซึ่งเป็นผลที่ตรวจพบได้ทั้งในรากและใบของพืชที่คลุกเมล็ดด้วย *T. harzianum* และในปี 2000 Yedidia, *et al.* ยังแสดงให้เห็นปฏิสัมพันธ์ระหว่างเชื้อรา *T. harzianum* T-203 กับรากของแตงกวา โดยศึกษาการครอบครองราก PR โปรตีนในพืชและกิจกรรมของเอนไซม์ของเชื้อรา *T. harzianum* ในช่วงเวลา 72 ชั่วโมงหลังจากการปลูกเชื้อ ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แสดงให้เห็นโครงสร้างของเชื้อราที่เป็นปรสิต (mycoparasitism) ต่อเชื้อราสาเหตุโรคพืชต่าง ๆ เช่น การพันรัดของเส้นใยและการสร้าง องค์ประกอบคล้าย appressoria เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่ไม่ได้ใส่ *T. harzianum* ลงไปในรากแตงกวา การใส่ *T. harzianum* T-203 สามารถกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ chitinase, β -1,3-glucanase, cellulase และ peroxidase จนถึง 72 ชั่วโมง หลังจากการปลูกเชื้อ สำหรับพืชที่ใส่ตัวชักนำทางเคมี 2,6-dichloroisonicotinic acid (INA) ก็แสดงการตอบสนองที่คล้ายกัน แต่ไม่เหมือนกันทุกประการกับพืชที่ใส่ *T. harzianum* การทดสอบกิจกรรมของ chitinase ในรากสดที่ใส่ *T. harzianum* T-203

หรือ INA โดยส่วนใหญ่สามารถตรวจการเรืองแสง fluorescent บริเวณ intercellular ของรากที่มี การชักนำให้เกิดความต้านทานในพืชได้ และยังช่วยลดโรคในรากพืชได้ ตลอดจนการกระตุ้นการ ตอบสนองของพืชในการต้านทานต่อโรคพืชอีกด้วย

6. ลักษณะของเชื้อ *Trichoderma* spp.

เชื้อรา *Trichoderma* spp. เป็นเชื้อราชั้นสูงที่จัดอยู่ใน subdivision Deuteromycotina แต่ มี teliomorphs อยู่ใน subdivision Ascomycotina คือ *Hypocreales* spp. เป็นเชื้อราที่อาศัยอยู่ใน ดิน และเศษซากอินทรีย์วัตถุธรรมชาติ (Papavizas, 1985) เชื้อรา *Trichoderma* มีการเจริญสร้าง เส้นใยสีขาวได้รวดเร็วและสร้างส่วนขยายพันธุ์ที่เรียกว่าสปอร์ (spore) ซึ่งเกิดจากการสืบพันธุ์แบบ ไม้อาศัยเพศ สร้างสปอร์ได้เป็นจำนวนมาก รวมกันเป็นกลุ่ม มีสีเขียว สามารถมีชีวิตรอดใน สภาพธรรมชาติได้ดี อาศัยอาหารจากอินทรีย์วัตถุ เศษซากพืช และเชื้อโรค การเจริญบนอาหาร เริ่มแรกโคโลนีไม่มีสี (translucent) หรือสีขาวใส (watery white) เจริญแบบราบติดผิวหน้า อาหารเลี้ยงเชื้อ ต่อมาโคโลนีมีลักษณะเป็นปุยฝ้าย (loosely floccose) หรือเป็นกระจุกแน่น (compactly tuft) มีสีเขียว (green) หรือสีขาวล้วน (pure white) หรือปรากฏลักษณะต่าง ๆ ใน โคโลนีเดียวกัน เส้นใย (mycelium) ของเชื้อรา *Trichoderma* sp. มีผนังกั้นเซลล์ (septate hyphae) ผนังเส้นใยเรียบมีการแตกกิ่งก้านมากมาย (Rifai, 1969) การสร้างสีลงในอาหารอาจเกิดขึ้นทำให้สี ของอาหารเปลี่ยนแปลงไปหรือได้โคโลนีสีเปลี่ยนไป และบางชนิดมีการสร้างกลิ่น เช่น กลิ่น มะพร้าว (ลาวัลย์ และคณะ, 2540) พบว่ามีการสร้าง chlamydospore ขึ้นทั้งระหว่างเส้นใยและ ปลายเส้นใย แต่ส่วนใหญ่พบที่ระหว่างเส้นใยมากกว่า chlamydospore สร้างจากเส้นใยที่แตกกิ่ง ออกมาสั้น ๆ รูปร่างกลม (globose) หรือรูปกระสวย (ellipsoid) ไม่มีสี และผนังเรียบ

จิระเดช และ วรณวิไล (2542) รายงานว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. มีคุณสมบัติและ ศักยภาพในการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์ค่อนข้างสูงต่อการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชใน 3 ลักษณะ คือ การแข่งขันด้านปัจจัยในการดำรงชีวิตกับเชื้อราสาเหตุโรคพืช (competition) การเป็นปรสิต (parasitism) และการสร้างสารปฏิชีวนะ (antibiosis) กลไกในการเข้าทำลายเชื้อราสาเหตุโรคพืช ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. อาศัยการเจริญสร้างเส้นใยเข้าพันรัดรอบเส้นใย แล้วผลิตเอนไซม์ ออกมาหลายชนิด เช่น chitinase cellulase gluconase และสารปฏิชีวนะต่าง ๆ แล้วย่อยสลายหรือ ทำลายผนังเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืช ทำให้เกิดการสลายตัวของผนังเส้นใย นอกจากนี้เชื้อรา *Trichoderma* spp. ยังสามารถใช้เส้นใยแทงผ่านเข้าสู่เส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ เชื้อรา

Trichoderma spp. เจริญได้อย่างรวดเร็ว โดยใช้ส่วนของเหลวในเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคเป็นอาหาร ทำให้ผนังเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืชเกิดการฉีกขาด ส่งผลให้เกิดการรั่วไหลของของเหลวภายในเส้นใย เกิดการตกตะกอนของ organelles และ cytoplasm ทำให้กิจกรรมการเจริญของเส้นใยลดลงเป็นอย่างมาก ส่งผลต่อการขยายพันธุ์ของเชื้อโรค และตายในที่สุด

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. สำหรับปลูกมะเขือเทศและการใส่เชื้อ

กระบะปลูก ขนาด 56 หลุม ต่อ กระบะ

หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)

พีทมอส

เมล็ดมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3

เชื้อรา *Trichoderma harzianum* ชนิดสด สายพันธุ์ CB-Pin-01, T50 และ T152

2. สำหรับตรวจสอบเอนไซม์

โถรงบตัวอย่างพืช

เครื่อง Refrigerated centrifuge

Micro tube, tube, pipette man, beaker

Vortex

Hot plate stirrer

Water bath shaker

เครื่อง spectrophotometer

3. สารเคมี

สารละลาย alkaline copper

สารละลาย Folin-ciocalteu phenol reagent

Bovine serum albumin (BSA)

สารละลาย copper reagent

สารละลาย Nelson's reagent

สารละลาย Laminarin

0.05M sodium acetate buffer pH 5.5

วิธีการ

1. การฟ้นสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* เพื่อลดการเกิดโรคราใบดำของมะเขือเทศในเรือนพลาสติก

1.1 การเตรียมต้นกล้ามะเขือเทศ

นำเมล็ดมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 เพาะในกระดาษเพาะเป็นเวลา 2 วัน หลังจากนั้นนำไปปลูกในกระบะปลูกขนาด 72 หลุมต่อกระบะที่บรรจุวัสดุปลูกพีทมอส (Klasmann – deilmann GmbH) ที่ได้จากการผสมพีท 9 ส่วน ต่อน้ำ 2-3 ส่วน โดยปริมาตรแล้วนำไปผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ ที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เวลา 30 นาที 2 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 24 ชั่วโมง โดยปลูกหลุมละ 1 ต้น รดน้ำแล้วคลุมด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ (เปิดกระดาษหนังสือพิมพ์ในวันที่ 3 หลังจากปลูก) รดน้ำทุกวัน

1.2 การเตรียมวัสดุปลูก

ใช้วัสดุปลูกไร้ดิน ประกอบด้วย กาบมะพร้าวสับ : แกลบดำ : ปุ๋ยหมัก ในอัตราส่วน 80 : 15 : 5 โดยปริมาตร นึ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แต่ละครั้งห่างกัน 24 ชั่วโมง บรรจุลงในกระถางขนาด 8 นิ้ว ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วด้วยการแช่ใน (0.525 % sodium hydrochlorite) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปริมาณวัสดุปลูกกระถางละ 2 ลิตร เพื่อย้ายกล้าจากข้อ 1 มาปลูกในกรรมวิธีต่างๆต่อไป

1.3 การปลูกและการดูแลรักษาต้นมะเขือเทศ

1.3.1 การรดน้ำ

รดน้ำพืชทุกวันเพื่อรักษาความชื้นให้กับต้นพืชและเชื้อราในดิน (กรณีมีการใส่เชื้อเพื่อทดสอบ) โดยรดในเวลาเช้าหรือเย็น หากวัสดุปลูกมีความชื้นมากอยู่แล้วเหลือรดเพียงเวลาใดเวลาหนึ่งก็ได้

1.3.2 การให้ปุ๋ย

ใช้ปุ๋ยน้ำสูตรเฉพาะที่ประกอบด้วย สารละลายธาตุอาหาร stock A และ stock B (ภาคผนวก ก) นำมาผสมกันอย่างละ 200 มิลลิลิตร เติมน้ำ 100 ลิตร ปรับ pH ที่อยู่ในช่วง 5.5-6 รด ต้นมะเขือเทศ กระจ่างละ 150 มิลลิลิตรสัปดาห์ละ 1 ครั้ง ทุกสัปดาห์

ให้ปุ๋ยทางใบโดยการพ่น สูตร 20 – 20 – 20 สัปดาห์ละ 1 ครั้ง ทุกสัปดาห์ จนกระทั่ง ช่วงการเก็บเกี่ยวผลผลิตเปลี่ยนเป็นพ่นปุ๋ยสูตร 15 – 15 – 30

1.3.3 การใช้สารเคมีกำจัดแมลง

พ่นสารเคมี abamectin สัปดาห์ละ 1 ครั้ง ทุกสัปดาห์ เพื่อป้องกันและกำจัดแมลง เพลี้ยแป้ง และเพลี้ยอ่อนที่เป็นพาหะของโรคไวรัส

1.4 เตรียมเชื้อรา *Trichoderma harzianum*

เตรียมสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *T. harzianum* โดยการเลี้ยงเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 T-50 และ T-152 บนข้าวสุกเป็นเวลา 7 วัน (จิระเดช และวรรณวิไล, 2545) จากนั้น นำข้าวสุกที่ได้มาเตรียมเป็นสปอร์แขวนลอยโดยใช้อัตราส่วน ข้าว 10 กรัม ต่อน้ำนิ่งมาเชื้อ 1000 มิลลิลิตร กรองเอาเฉพาะน้ำสปอร์แขวนลอยมาใช้ (ความเข้มข้นประมาณ 10^8 สปอร์/มิลลิลิตร)

1.5 การเตรียมเชื้อรา *Pseudocercospora fuligena*

เตรียมสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *P. fuligena* โดยใช้ฟูกันปิดสปอร์จากใบมะเขือเทศที่เป็นโรคราใบดำ ลงในน้ำนิ่งมาเชื้อแล้วนับปริมาณของสปอร์ด้วย haemocytometer ปรับปริมาณความเข้มข้นของเชื้อให้ได้ 1.0×10^4 สปอร์/มิลลิลิตร

1.6 กรรมวิธีที่ใช้ในการทดลอง

พ่นสปอร์แขวนลอยของ เชื้อรา *T. harzianum* ทั้ง 3 สายพันธุ์ ลงบนต้นมะเขือเทศที่เตรียมไว้ (อายุ 8 สัปดาห์) ทุกๆ 2 สัปดาห์ จำนวน 4 ครั้ง โดยพ่นครั้งละ 10 มิลลิลิตร/ต้น ในการพ่นครั้งสุดท้าย พ่นสารเคมี mancozeb ความเข้มข้น 3,200 ppm ที่เตรียมโดยใช้ สารเคมี 80 กรัม / น้ำ 20 ลิตร ในกรรมวิธีที่มีการฉีดพ่นสารเคมี หลังจากนั้น 24 ชั่วโมง จึงพ่นเชื้อรา *P. fuligena* ปริมาตร 10 มิลลิลิตร/ต้น จำนวน 1 ครั้ง ส่วนกรรมวิธีควบคุม (Uninoculated control) พ่นด้วยน้ำนิ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร/ต้น

1. กรรมวิธีควบคุม (Uninoculated control)
2. กรรมวิธีควบคุมฉีดพ่นเชื้อรา *P. fuligena* (Inoculated control)
3. กรรมวิธีฉีดพ่นเชื้อรา *T. harzianum* (CB-Pin-01)
4. กรรมวิธีฉีดพ่นเชื้อรา *T. harzianum* (T50)
5. กรรมวิธีฉีดพ่นเชื้อรา *P. fuligena* และฉีดพ่นเชื้อรา *T. harzianum* (CB-Pin-01)
6. กรรมวิธีฉีดพ่นเชื้อรา *P. fuligena* และ ฉีดพ่นเชื้อรา *T. harzianum* (T50)
7. กรรมวิธีฉีดพ่นเชื้อรา *P. fuligena* และ ฉีดพ่นเชื้อรา *T. harzianum* (T152)
8. กรรมวิธีฉีดพ่นเชื้อรา *P. fuligena* และ สารเคมี mancozeb

1.7 การประเมินความรุนแรงของโรค

ประเมินความรุนแรงของโรคโดยใช้ดัชนีของการเกิดโรค บันทึกผลหลังจากฉีดพ่นเชื้อรา *P. fuligena* ไปแล้ว 3 สัปดาห์ เปรียบเทียบผลค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (P= 0.05)

ประเมินโรคที่เกิดขึ้น โดยแบ่งระดับการเกิดโรคออกเป็น 6 ระดับ ดังนี้

ระดับ 0 ไม่แสดงอาการของโรค

ระดับ 1 แสดงอาการของโรค 1-20%

ระดับ 2 แสดงอาการของโรค 21-40%

ระดับ 3 แสดงอาการของโรค 41-60%

ระดับ 4 แสดงอาการของโรค 61-80%

ระดับ 5 แสดงอาการของโรค 81-100%

คำนวณเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรค (disease severity) จากสูตร $\frac{\sum(n_i \times x_i)}{n \times 5} \times 100$

โดยที่ n_i = จำนวนใบที่เกิดโรคในระดับความรุนแรงนั้นๆ

i = ระดับความรุนแรงของอาการโรค

n = จำนวนใบที่ใช้ในการทดสอบทั้งหมด

1.8 การตรวจนับปริมาณเชื้อรา *Trichoderma harzianum*

เมื่อเสร็จสิ้นการทดลอง เก็บตัวอย่างวัสดุปลูกจากทุกกรรมวิธีที่มีการทดสอบ ประสิทธิภาพเชื้อรา *T. harzianum* ในการควบคุมโรค กรรมวิธีละ 10 กรัม นำมาผสมกับน้ำกลั่นหนึ่ง หม่าเชื้อปริมาณ 90 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 5 นาที เจือจางให้มีความเข้มข้น 10^2 และ 10^3 เท่า หยด suspension 0.1 มิลลิลิตร แล้วเกลี่ยบนอาหาร Martin's Medium บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3-4 วัน ตรวจนับจำนวนโคโลนีบนอาหารแล้วคำนวณปริมาณเชื้อราเป็นหน่วยโคโลนี (Colony Forming Unit ; CFU) ต่อวัสดุปลูก 1 กรัม

ตรวจนับจำนวนประชากรเชื้อรา *T. harzianum* บนใบโดยตัดใบมะเขือเทศเป็นชิ้นๆ ขนาด 1 ตารางเซนติเมตร จำนวน 10 ชิ้น ผสมน้ำหนึ่งหม่าเชื้อ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าเพื่อให้เชื้อ หลุดจากใบ เป็นเวลา 5 นาที ก่อนนำไปเจือจางให้มีความเข้มข้น 10^1 เท่า ก่อนหยด suspension 0.1 มิลลิลิตร แล้วเกลี่ยที่บนอาหาร Martin's medium

2. การตรวจสอบ specific activity ของเอนไซม์ β -1,3-glucanase และเอนไซม์ chitinase และ วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในต้นกล้ามะเขือเทศ

2.1 การเตรียมตัวอย่างพืชสำหรับวิเคราะห์ specific activity ของเอนไซม์และวิเคราะห์ ปริมาณโปรตีน

เลือกเก็บตัวอย่าง ส่วนยอดและใบของต้นกล้ามะเขือเทศ ภายหลังจากใส่สปอร์แขวน- ลอยของเชื้อรา *T. harzianum* ไปแล้วที่ 0 – 10 วัน นำไปล้างน้ำหน้าใบ ก่อนบดด้วยโกร่ง แล้วเติม สารละลาย 0.05 M sodium acetate buffer pH 5.5 (อัตราส่วนตัวอย่างพืช 1 กรัมต่อ acetate buffer 4 มิลลิลิตร) ผสมสารแขวนลอยพืชใส่ micro tube ขนาดบรรจุ 2 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ

4°C ด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เก็บของเหลวส่วนใส (crude enzymes) ไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C จนกระทั่งนำไปตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์

2.2 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ β -1,3-glucanase

เจือจางสารละลายตัวอย่าง(จากข้อ 2.1) ด้วยน้ำนิ่งฆ่าเชื้อในอัตรา 1:10 ใช้ pipette ดูดสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ใส่ใน Micro tube ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเปรียบเทียบ เติมสารละลาย Laminarin 0.8 มิลลิลิตร ก่อนนำไปป้อนในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิ 37°C (water bath shaker) เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์เป็นเวลา 20 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการนำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 2000 x g นาน 5 นาที ดูดสารละลายใสส่วนบน 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดแก้ว เติมสารละลาย Copper reagent 1 มิลลิลิตร ก่อนนำหลอดแก้วไปต้มในน้ำเดือด 20 นาที ทำให้เย็นโดยแช่ในน้ำเย็นอุณหภูมิ 10-15°C เติมสารละลาย Nelson's reagent 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน วางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที เติมน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร เปรียบเทียบค่าที่ได้เพื่อหาปริมาณของ เอนไซม์ β -1,3-glucanase ในสารละลายตัวอย่างกับกราฟมาตรฐาน โดยใช้สารละลายกลูโคสเป็นสารละลายมาตรฐาน ดังในภาคผนวก

1 หน่วยของกิจกรรมเอนไซม์ (unit ; U) คือ ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถทำให้เกิดน้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครกรัม ใน 1 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

specific activity ของเอนไซม์ คือ ปริมาณ unit ของเอนไซม์ต่อมิลลิกรัม โปรตีน(U/mg protein)

2.3 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ chitinase

เจือจางสารละลายตัวอย่าง (จากข้อ 2.1) ด้วยน้ำนิ่งฆ่าเชื้อในอัตรา 1:10 ใช้ pipette ดูดสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร ใส่ใน Micro tube โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเปรียบเทียบ เติมสารละลาย colloidal chitin 1 มิลลิลิตร ก่อนนำไปป้อนในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิ 50 °C (water bath shaker) เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยการนำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 2000 x g นาน 5 นาที ดูดสารละลายใสส่วนบน 1

มิลลิลิตร ใส่ในหลอดแก้ว เติมสารละลาย Copper reagent 1 มิลลิลิตร นำหลอดแก้วไปต้มในน้ำเดือด 20 นาที ทำให้เย็นโดยแช่ในน้ำเย็นอุณหภูมิ 10-15 °C เติมสารละลาย Nelson's reagent 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน วางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที เติมน้ำกลั่น 9.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร เปรียบเทียบค่าที่ได้เพื่อหาปริมาณของ เอนไซม์ chitinase ในสารละลายตัวอย่างกับกราฟมาตรฐาน โดยใช้สารละลาย N-acetylglucosamine เป็นสารละลายมาตรฐาน ดังในภาคผนวก

1 หน่วยของกิจกรรมเอนไซม์ (unit ; U) คือ ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถทำให้เกิด N-acetylglucosamine 1 ไมโครกรัม ใน 1 นาที ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

specific activity ของเอนไซม์ คือ ปริมาณ unit ของเอนไซม์ต่อมิลลิกรัมโปรตีน (U/mg protein)

2.4 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

เจือจางสารละลายตัวอย่างด้วยน้ำนิ่งมาเชื้อในอัตรา 1:5 ใช้ pipette ดูดสารละลายตัวอย่างปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรใส่ในหลอดแก้ว โดยใช้ น้ำกลั่นเป็นตัวเปรียบเทียบ เติมสารละลาย Alkaline Copper 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 10 นาที แล้วเติม สารละลาย Folin-ciocalteu phenol reagent ที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 แล้ว ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็ว ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์ วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เปรียบเทียบค่าที่ได้เพื่อหาปริมาณโปรตีนในสารละลายตัวอย่างกับกราฟมาตรฐาน โดยใช้ Bovine serum albumin (BSA) เป็นสารมาตรฐาน ดังในภาคผนวก

2.5 การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ β -1,3-glucanase เอนไซม์ chitinase และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในต้นกล้ามะเขือเทศหลังจากใส่เชื้อรา *Trichoderma harzianum* ที่ 0 – 10 วัน

เตรียมต้นกล้ามะเขือเทศเช่นเดียวกับข้อ 1.1 โดยใช้กระบะเพาะกล้าขนาด 32 หลุม แทนกระบะเพาะขนาด 72 หลุม เมื่อต้นมะเขือเทศมีอายุ 15 วัน ใส่สปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *T.*

harzianum แต่ละสายพันธุ์ (ที่เตรียมเช่นเดียวกับข้อ 1.4) ใส่ลงวัสดุปลูกปริมาตร 5 มิลลิลิตร/หลุม ส่วนกรรมวิธีควบคุมใช้น้ำนิ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร/หลุม

การทดลองมีทั้งหมด 4 กรรมวิธี

กรรมวิธีที่ 1 กรรมวิธีควบคุมโดยใช้น้ำนิ่งฆ่าเชื้อ (control)

กรรมวิธีที่ 2 ใส่เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01

กรรมวิธีที่ 3 ใส่เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T50

กรรมวิธีที่ 4 ใส่เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T152

2.6 การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ β -1,3-glucanase เอนไซม์ chitinase และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในต้นกล้ามะเขือเทศหลังจากใส่เชื้อรา *Trichoderma harzianum* และปลูกเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* ที่ 0 – 10 วัน

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.5 โดยเพิ่มกรรมวิธีที่มีการปลูกเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* สาเหตุโรครากเน่าของมะเขือเทศ ใส่ลงวัสดุปลูกปริมาตร 5 มิลลิลิตร/หลุม ส่วนกรรมวิธีควบคุมใช้น้ำนิ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร/หลุม

โดยเตรียมเส้นใยแฉวนลอยเชื้อรา *P. aphanidermatum* โดยเลี้ยงเชื้อรา *P. aphanidermatum* บนอาหาร PDA เป็นเวลา 2 วัน นำมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วใส่ลงไปใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ใช้อัตรา 2 งานเลี้ยงเชื้อ ต่อน้ำนิ่งฆ่าเชื้อ 150 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นด้วยเครื่อง homogenizer จนละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปหยอดลงในกระถางปลูกมะเขือเทศ 5 มิลลิลิตร / กระถาง

ทั้งหมด 8 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 กรรมวิธีควบคุมโดยใช้น้ำนิ่งฆ่าเชื้อ (control)

กรรมวิธีที่ 2 ปลูกเชื้อรา *P. aphanidermatum* เพียงอย่างเดียว

กรรมวิธีที่ 3 ใส่เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 ร่วมกับการปลูกเชื้อรา *P. aphanidermatum*

กรรมวิธีที่ 4 ใส่เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T50 ร่วมกับการปลูกเชื้อรา *P. aphanidermatum*

กรรมวิธีที่ 5 ใส่เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T152 ร่วมกับการปลูกเชื้อรา *P.*

aphanidermatum

กรรมวิธีที่ 6 ใส่เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01

กรรมวิธีที่ 7 ใส่เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T50

กรรมวิธีที่ 8 ใส่เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T152

3. การศึกษาเชื้อรา *Pseudocercospora fuligena* ต่อการเกิดโรคราใบดำ และกิจกรรมของเอนไซม์ β -1,3-glucanase และเอนไซม์ chitinase

3.1 การเตรียมต้นมะเขือเทศ

เตรียมต้นกล้าในวัสดุปลูก และมีการดูแลรักษาต้นมะเขือเทศ เช่นเดียวกับข้อ 1.1 – 1.3 จนมะเขือเทศมีอายุ 4 สัปดาห์หลังการย้ายกล้า จึงนำไปใช้ทดสอบ โดยพ่นสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *P. fuligena* ที่ความเข้มข้น 1.0×10^4 สปอร์/มิลลิลิตร ซึ่งเตรียมเชื้อราด้วยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 1.5

3.2 กรรมวิธีที่ใช้ในการทดลอง

การทดลองมี 2 กรรมวิธี โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD กรรมวิธีละ 4 ซ้ำๆ ละ 15 ต้น ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 กรรมวิธีควบคุมโดยไม่พ่นเชื้อใดๆ

กรรมวิธีที่ 2 กรรมวิธีพ่นเชื้อรา *P. fuligena* ในอัตรา 10 มิลลิลิตร ต่อ ต้น

3.3 การประเมินความรุนแรงของโรค

ประเมินความรุนแรงของโรคโดยใช้ดัชนีของโรค เช่นเดียวกับข้อ 1.7 บันทึกผลหลังจากฉีดพ่นเชื้อรา *P. fuligena* ไปแล้ว 4 สัปดาห์

เปอร์เซ็นต์การลดการเกิดโรค คำนวณได้จากสูตร

$$100 - \left[\frac{\text{ความรุนแรงของโรคที่เกิดจากเชื้อรา } P. \textit{fuligena} \text{ ในกรรมวิธีทดสอบ}}{\text{ความรุนแรงของโรคที่เกิดจากเชื้อรา } P. \textit{fuligena}} \times 100 \right]$$

3.4 การตรวจสอบ กิจกรรมของเอนไซม์ β -1,3-glucanase และเอนไซม์ chitinase

เก็บตัวอย่างพืช หลังการพ่นเชื้อรา *P. fuligena* ไปแล้ว 0 – 14 วัน ตามวิธีการในข้อ

2.1 เพื่อนำไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ β -1,3-glucanase และเอนไซม์ chitinase ตามวิธีการในข้อ 2.2 – 2.3

4. การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ในการลดการเกิดโรค และชักนำให้มะเขือเทศต้านทานต่อการเกิดโรคราใบดำสาเหตุจากเชื้อรา *Pseudocercospora fuligena* ร่วมกับการปลูกเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* ในวัสดุปลูก

4.1 การเตรียมต้นกล้ามะเขือเทศ

เตรียมต้นกล้ามะเขือเทศในวัสดุปลูก และมีการดูแลรักษาต้นมะเขือเทศ เช่นเดียวกับข้อ 1.1 – 1.3 จนต้นมะเขือเทศมีอายุ 4 สัปดาห์กึ่งกลางย้ายกล้า จึงนำไปทดสอบ

4.2 การเตรียมเชื้อทดสอบ

เตรียมเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ในรูปสปอร์แขวนลอยเช่นเดียวกับข้อ 1.4 ส่วนเชื้อรา *Pseudocercospora fuligena* เตรียมเช่นเดียวกับข้อ 1.5 โดยพ่นสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *P. fuligena* ที่ความเข้มข้น 1.0×10^4 สปอร์/มิลลิลิตร เตรียมเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* ด้วยการเลี้ยงเชื้อรา *P. aphanidermatum* บนอาหาร PDA เป็นเวลา 2 วัน นำมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วใส่ลงไปนใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ใช้อัตรา 2 งานเลี้ยงเชื้อ ต่อน้ำนิ่งมาเชื้อ 150 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นด้วยเครื่อง homogenizer จนละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปหยอดลงในกระถางปลูกมะเขือเทศ 5 มิลลิลิตร / กระถาง

4.3 กรรมวิธีที่ใช้ในการทดลอง

ทั้งหมด 10 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 กรรมวิธีควบคุมโดยใส่สำเนาเข้ามาเชื้อ (control)

กรรมวิธีที่ 2 กรรมวิธีควบคุมชนิดพ่นเชื้อรา *P. fuligena* (Inoculated control)

กรรมวิธีที่ 3 ปลูกรูเชื้อรา *P. aphanidermatum*

กรรมวิธีที่ 4 รดเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01

กรรมวิธีที่ 5 รดเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T50

กรรมวิธีที่ 6 รดเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T152

กรรมวิธีที่ 7 พ่นเชื้อรา *P. fuligena* และรดเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01

ร่วมกับการปลูกรูเชื้อรา *P. aphanidermatum*

กรรมวิธีที่ 8 พ่นเชื้อรา *P. fuligena* และรดเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T50 ร่วมกับ

การปลูกรูเชื้อรา *P. aphanidermatum*

กรรมวิธีที่ 9 พ่นเชื้อรา *P. fuligena* และรดเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T152

ร่วมกับการปลูกรูเชื้อรา *P. aphanidermatum*

กรรมวิธีที่ 10 พ่นเชื้อรา *P. fuligena* และ สารเคมี mancozeb

4.4 การประเมินความรุนแรงของโรค

ประเมินความรุนแรงของโรคโดยใช้ดัชนีของโรค เช่นเดียวกับข้อ 1.7 โดยทำการประเมินโรค 3 ครั้ง หลังจากฉีดพ่นเชื้อรา *P. fuligena* ไปแล้ว 6, 8 และ 10 สัปดาห์

เปอร์เซ็นต์การลดการเกิดโรค คำนวณได้จากสูตร (เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธี Inoculated control)

$$100 - \left[\frac{\text{ความรุนแรงของโรคที่เกิดจากเชื้อรา } P. \text{fuligena} \text{ ในกรรมวิธีทดสอบ} \times 100}{\text{ความรุนแรงของโรคที่เกิดจากเชื้อรา } P. \text{fuligena}} \right]$$

4.5 การตรวจนับปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในวัสดุปลูกภายหลังการทดลอง

4.5.1 ตรวจนับปริมาณเชื้อรา *Trichoderma harzianum*

ตรวจนับด้วยวิธีการ เช่นเดียวกับข้อ 1.8

4.5.2 ตรวจนับปริมาณเชื้อรา *Pythium aphanidermatum*

เก็บตัวอย่างวัสดุปลูกจากกระถางที่มีการทดสอบแต่ละกรรมวิธีมาจำนวน 10 กรัม ผสมลงใน 0.1 % WA. ปริมาตร 90 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 10^2 และ 10^3 เท่า หยดสารแขวนลอย 1 มิลลิลิตร บนผิวหน้าอาหาร Modified BNPR (Chamswarnng et al., 1985) แล้วเกลี่ยให้ทั่วโดยใช้แท่งแก้ว กรรมวิธีละ 3 ซ้ำ บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1-2 วัน ตรวจนับจำนวนโคโลนีแล้วคำนวณปริมาณเชื้อราเป็นหน่วยโคโลนี (colony forming unit ; CFU) ต่อวัสดุปลูก 1 กรัม

4.6 การตรวจนับปริมาณการครอบครองรากของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* และเชื้อรา *Pythium aphanidermatum*

นำรากมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ประมาณ 1 เซนติเมตร ล้างด้วย 0.525 % sodium hydrochlorite ประมาณ 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้วจำนวน 2 ครั้ง นำรากมาซบให้แห้งด้วยกระดาษทิชชูอบฆ่าเชื้อ จากนั้นนำรากที่ได้ในแต่ละกรรมวิธีมาวางบนอาหาร Matin's medium และ Modified BNPR กรรมวิธี 3 ซ้ำๆ ละ 5 ชิ้น บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1-2 วัน ตรวจนับปริมาณการครอบครองรากของเชื้อรา *P. aphanidermatum* บนอาหาร Modified BNPR และตรวจนับปริมาณการครอบครองรากของเชื้อรา *T. harzianum* บนอาหาร Matin's medium บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3-4 วัน

4.7 การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ β -1,3-glucanase เอนไซม์ chitinase และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในต้นมะเขือเทศหลังจากใส่เชื้อรา *Trichoderma harzianum* และเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* ลงในวัสดุปลูกและพ่นเชื้อรา *Pseudocercospora fuligena* บนใบ

เลือกเก็บตัวอย่าง ส่วนยอดและใบจากการทดลองข้อ 4.1 – 4.3 โดยเก็บที่ 0 – 72 ชั่วโมง จากนั้นนำไปการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ β -1,3-glucanase เอนไซม์ chitinase และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนตามการทดลองที่ 2.1 – 2.4

สถานที่

1. ห้องปฏิบัติการควบคุมโรคพืชโดยชีวภาพ (Plant Disease Biocontrol Laboratory)
ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน
2. แปลงปลูกพืชทดลอง ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน
3. ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร (Center for Agricultural Biotechnology)

ระยะเวลาทำการทดลอง

ดำเนินการทดลองระหว่างเดือน ตุลาคม 2547 – กุมภาพันธ์ 2550

ผลและวิจารณ์ผล

1. ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ในการลดการเกิดโรคราใบดำของมะเขือเทศในเรือนพลาสติก

พบว่าในกรรมวิธีควบคุมที่ไม่ได้พ่นเชื้อรา *P. fuligena* (uninoculated control) มีโรคเกิดขึ้น 39.01 เปอร์เซ็นต์ ภายหลังจากพ่นเชื้อรา *P. fuligena* ไปแล้ว 3 สัปดาห์ (ตารางที่ 2) ซึ่งนับเป็นการติดเชื้อจากธรรมชาติ (natural infection) แสดงให้เห็นว่าเชื้อสาเหตุโรคราใบดำของมะเขือเทศมีอยู่แล้วในสภาพแวดล้อม และสามารถเกิดการแพร่ระบาดได้ค่อนข้างง่าย ในขณะที่กรรมวิธีที่มีการพ่นสปอร์แขวนลอยของเชื้อ *P. fuligena* ความเข้มข้น 1.0×10^4 สปอร์/มิลลิลิตร (inoculated control) สามารถเพิ่มความรุนแรงของโรคได้เป็น 51.24 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับกรรมวิธีที่พ่นน้ำนิ่งมาเชื้อ การเตรียมสปอร์แขวนลอยของเชื้อราสาเหตุโรคให้เข้มข้นมากกว่า 1.0×10^4 สปอร์/มิลลิลิตร ปฏิบัติได้ค่อนข้างยากเนื่องจากต้องใช้ฟุ้งกันปิดสปอร์ของเชื้อรา *P. fuligena* จากใบมะเขือเทศที่เป็นโรคราใบดำ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีใบที่เป็นโรคและสร้างสปอร์จำนวนมากพอ แม้ว่า Hartman *et. al.* (1991) ได้รายงานไว้ว่าเชื้อรา *P. fuligena* สามารถสร้างสปอร์ได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ tomato-oatmeal agar (TOA) แต่จากการทดลองนี้พบว่ามีการสร้างสปอร์น้อยมาก ไม่เพียงพอที่จะเตรียมสปอร์แขวนลอยให้มีความเข้มข้นตามที่ต้องการได้ ส่วนกรรมวิธีที่พ่นเฉพาะเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 หรือ T50 พบว่าทั้งสองกรรมวิธีมีการเกิดโรคราใบดำบนมะเขือเทศน้อยกว่ากรรมวิธีที่พ่นน้ำนิ่งมาเชื้อ (uninoculated control) อย่างมีนัยสำคัญ แสดงว่าในสภาพที่มีการติดเชื้อจากธรรมชาติ เชื้อรา *T. harzianum* ทั้งสองสายพันธุ์ (CB-Pin-01 และ T50) สามารถลดการเกิดโรคได้ 58.55 และ 60.27 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่พ่นเชื้อรา *P. fuligena* (inoculated control) พบว่าการพ่น CB-Pin-01, T50, T152 และสารเคมี mancozeb สามารถลดความรุนแรงของโรคลงได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยลดการเกิดโรคได้ 50.62, 62.74, 37.51 และ 54.22 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Elad (2000) ที่พบว่า การพ่นด้วยเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T39 สามารถลดการเกิดโรค Powdery mildew (*Sphaerotheca fusca*) ได้ 55 – 64 % ตามลำดับ การฉีดพ่นเชื้อรา *T. harzianum* ช่วยให้ความรุนแรงของโรคไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับการพ่นสารเคมี การพ่นเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 และ T50 ลงบนผิวใบทุกกรรมวิธี ไม่ว่าจะพ่นเชื้อโรคหรือไม่ก็ตาม พบปริมาณเชื้อบนใบระหว่าง $3.0 - 5.9 \times 10^2$ CFU /cm² แต่ไม่พบประชากรของสายพันธุ์ T152 ที่ความเงื้องาง 10^{-1} แสดงให้เห็นว่าเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 และ T50 สามารถอยู่

รอดบนใบและมีกลไกการเป็นปฏิปักษ์โดยตรงต่อเชื้อรา *P. fuligena* ส่วนสายพันธุ์ T152 อาจใช้กลไกอื่นในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *P. fuligena* เช่น การสร้างสารพิษ หรือชักนำให้พืชเกิดความต้านทาน ทดแทนการแข่งขันและการเป็นปรสิตโดยตรงต่อเชื้อโรครา (จิระเดช, 2549) ส่วนการตรวจจำนวนประชากรของเชื้อรา *T. harzianum* ในวัสดุปลูกโดยวิธี dilution spread plate technique บน Martin's medium หลังจากปลูกไปแล้ว 12 สัปดาห์หรือหลังจากการพ่นเชื้อรา *T. harzianum* ครั้งที่ 5 ไปแล้ว 4 สัปดาห์ ตรวจพบเชื้อในวัสดุปลูกระหว่าง 9.0×10^3 - 3.1×10^4 CFU/g การทดลองครั้งนี้ตรวจพบเชื้อรา *T. harzianum* ในวัสดุปลูกทุกกรรมวิธีที่พ่นสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *T. harzianum* แสดงว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. สามารถมีชีวิตรอดอยู่ในวัสดุปลูกและสามารถเข้าครอบครองรากพืชได้ จากผลการทดลองครั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ต่างๆ ที่พ่นให้กับมะเขือเทศไปชักนำให้มะเขือเทศต้านทานต่อโรคราใบดำของมะเขือเทศ เช่น การสร้างเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานในพืช (Harman *et al.* 2004b ; Intana *et al.*, 2003) จึงจำเป็นต้องศึกษาบทบาทการชักนำให้มะเขือเทศต้านทานต่อโรคราใบดำของมะเขือเทศ (Induced resistance) โดยเชื้อรา *T. harzianum* ต่อไป

ตารางที่ 2 ผลของการพ่นสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* บนดินมะเขือเทศ ทุก 2 สัปดาห์เพื่อลดโรคราใบค้ำของมะเขือเทศสาเหตุจากเชื้อรา *Pseudocercospora fuligena* (Pf)

กรรมวิธี	ความรุนแรงของโรค (%)	การลดโรค (%)	ประชากรของเชื้อรา	
			<i>T. harzianum</i>	
			ผิวใบ ^{1/} (CFU /cm ²)	วัสดุปลูก ^{2/} (CFU /g)
uninoculated control	39.01 ab	-	-	-
inoculated control (Pf)	51.24 a	-	-	-
<i>T. harzianum</i> (CB-Pin-01)	21.24 c	45.55 ^{4/}	4.3 x 10 ²	2.3 x 10 ⁴
<i>T. harzianum</i> (T50)	20.36 c	47.81 ^{4/}	5.9 x 10 ²	3.1 x 10 ⁴
Pf + CB-Pin-01	25.30 bc	50.62 ^{5/}	3.0 x 10 ²	2.8 x 10 ⁴
Pf + T50	19.09 c	62.74 ^{5/}	4.6 x 10 ²	2.2 x 10 ⁴
Pf + T152	32.02 bc	37.51 ^{5/}	ไม่พบ	9.0 x 10 ³
Pf + mancozeb	23.46 bc	54.22 ^{5/}	-	-

หมายเหตุ ^{1/} ประชากรเชื้อรา *T. harzianum* บนใบมะเขือเทศ

^{2/} ประชากรเชื้อรา *T. harzianum* ในวัสดุปลูก

^{3/} ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรเดียวกันในแนวตั้งของตารางไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติวิเคราะห์โดย Duncan's Multiple Range Test (P=0.05)

^{4/} การลดการเกิดโรค (%) เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่ไม่ได้พ่นเชื้อใดๆ (uninoculated control)

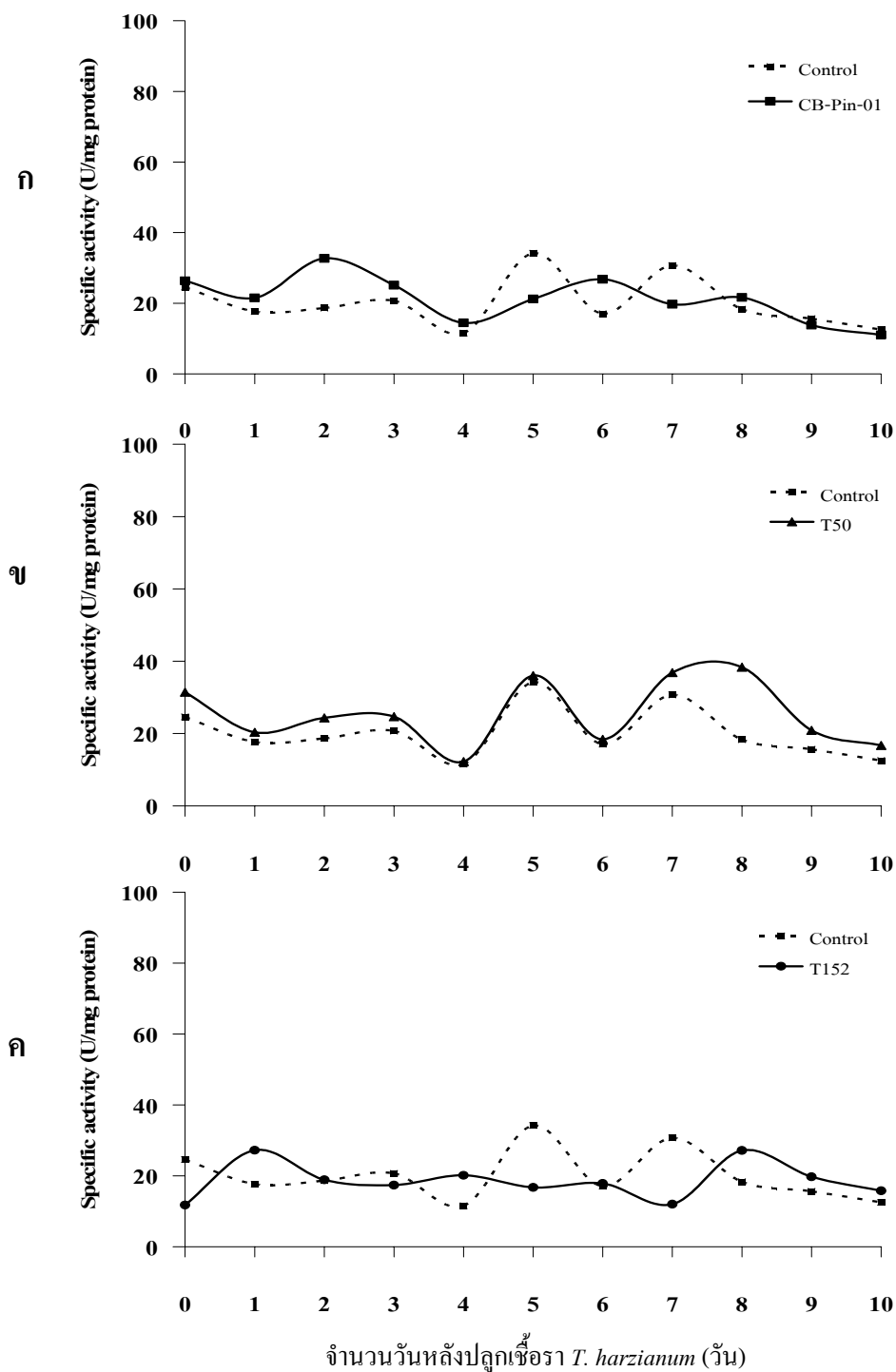
^{5/} การลดการเกิดโรค (%) เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่พ่นเชื้อราสาเหตุโรค (inoculated control)

2. การเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ β -1,3-glucanase และเอนไซม์ chitinase ในใบและยอดของกล้ามะเขือเทศ เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อรา *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 T50 และ T152

2.1 การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ β -1,3-glucanase เอนไซม์ chitinase และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในต้นกล้ามะเขือเทศหลังจากใส่เชื้อรา *Trichoderma harzianum* ที่ 0 – 10 วัน

การเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ β -1,3-glucanase ในตัวอย่างใบและยอดของกล้ามะเขือเทศ หลังจากการควบคุมด้วยเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 พบว่า สามารถกระตุ้นให้พืชสร้างเอนไซม์ β -1,3- glucanase เพิ่มขึ้น ในวันที่ 3 และ 9 โดยวิเคราะห์ specific activity ได้เท่ากับ 24.44 และ 29.32 U/mg protein ตามลำดับ ส่วนกรรมวิธีที่รดด้วยเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T50 พบว่า สามารถกระตุ้นให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ β -1,3- glucanase เพิ่มขึ้นสูงสุดในวันที่ 9 ซึ่งเท่ากับ 48.83 U/mg protein เมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุม และยังพบว่ากรรมวิธีที่รดด้วยเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T152 สามารถกระตุ้นให้พืชสร้างเอนไซม์ β -1,3- glucanase เพิ่มขึ้น ในวันที่ 9 ซึ่งวิเคราะห์ค่า specific activity ได้เท่ากับ 44.97 U/mg protein (ภาพที่1)

ส่วนการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ chitinase ในตัวอย่างใบและยอดของกล้ามะเขือเทศ ในกรรมวิธีที่รดด้วยเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 พบว่า สามารถกระตุ้นให้พืชสร้างเอนไซม์ chitinase เพิ่มสูงขึ้นในวันที่ 2 และ 6 โดยวิเคราะห์ specific activity ได้เท่ากับ 32.72 และ 26.82 U/mg protein ตามลำดับ ส่วนกรรมวิธีที่รดด้วยเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T50 พบว่า สามารถกระตุ้นให้พืชสร้างเอนไซม์ chitinase เพิ่มขึ้นสูงสุดในวันที่ 8 ซึ่งวิเคราะห์ค่า specific activity ได้เท่ากับ 38.34 U/mg protein เมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุม และยังพบว่ากรรมวิธีที่รดด้วยเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T152 สามารถกระตุ้นให้พืชสร้างเอนไซม์ chitinase เพิ่มขึ้นในวันที่ 1 ซึ่งวิเคราะห์ค่า specific activity ได้เท่ากับ 27.23 U/mg protein (ภาพที่2)

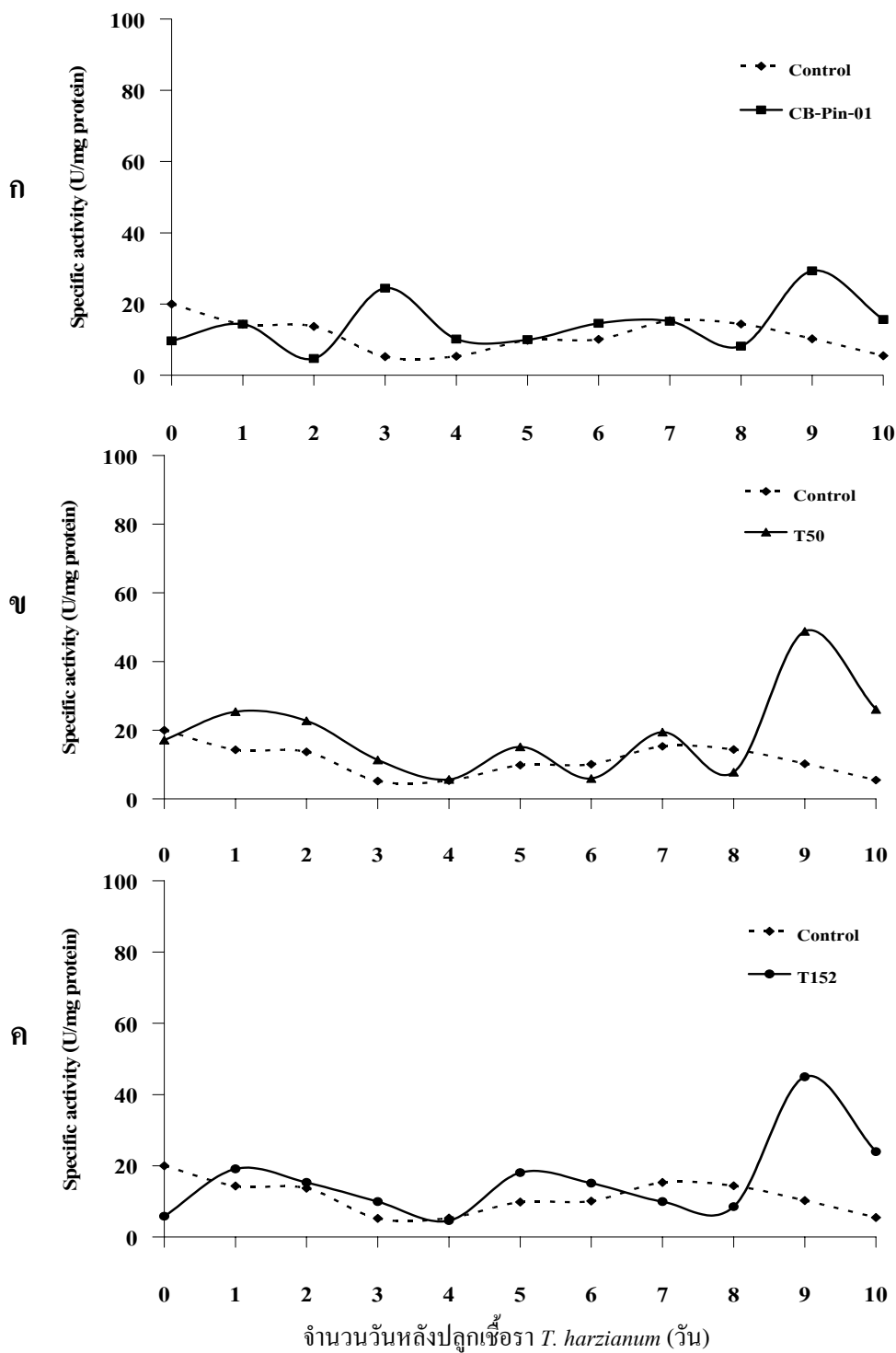


ภาพที่ 1 แสดงค่า specific activity ของเอนไซม์ β -1,3-glucanase ในใบและยอดของกล้ามะเขือเทศ

ก. กรรมวิธีที่ใส่เชื้อรา *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม

ข. กรรมวิธีใส่เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T50 เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม

ค. กรรมวิธีใส่เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T152 เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม



ภาพที่ 2 แสดงค่า specific activity ของเอนไซม์ chitinase ในใบและยอดของกล้ามะเขือเทศ
 ก. กรรมวิธีที่ใส่เชื้อรา *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม
 ข. กรรมวิธีใส่เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T50 เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม
 ค. กรรมวิธีใส่เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T152 เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม

2.2 การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ β -1,3-glucanase เอนไซม์ chitinase และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในต้นกล้ามะเขือเทศหลังจากใส่เชื้อรา *Trichoderma harzianum* และปลูกเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* ที่ 0 – 10 วัน

การเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ β -1,3-glucanase ในใบและยอดของมะเขือเทศ หลังจากรดวัสดุปลูกด้วยเชื้อรา *P. aphanidermatum* เพียงชนิดเดียวพบว่า มีค่า specific activity ของเอนไซม์ β -1,3-glucanase เพิ่มขึ้นในวันที่ 3 และ 7 เท่ากับ 44.80 และ 36.53 U/mg protein ตามลำดับ (ภาพที่ 3 ก) ส่วนกรรมวิธีที่รดด้วยเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 ร่วมกับการปลูกเชื้อรา *P. aphanidermatum* มีค่า specific activity ของเอนไซม์ β -1,3-glucanase สูงมากกว่ากรรมวิธีที่รดด้วยเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 เพียงชนิดเดียว โดยมีค่า specific activity ของเอนไซม์สูงสุดในวันที่ 3 เท่ากับ 48.61 U/mg protein และเพิ่มขึ้นสูงอีกในวันที่ 5 และ 9 เท่ากับ 34.90 35.40 และ 23.43 U/mg protein ตามลำดับ (ภาพที่ 3 ข)

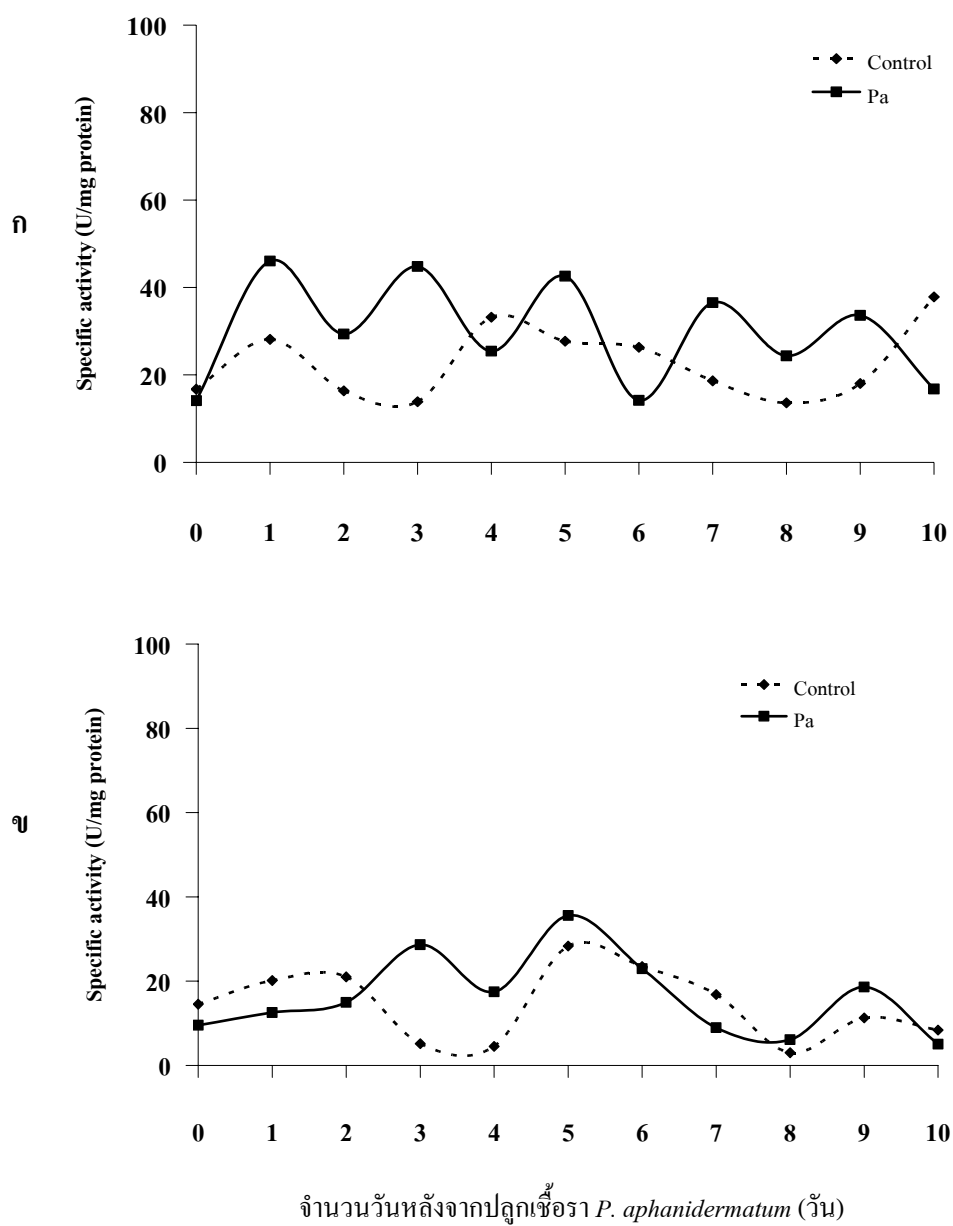
กรรมวิธีที่รดด้วยเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T50 (ภาพที่ 4 ก) มีค่า specific activity ของเอนไซม์ β -1,3-glucanase เพิ่มขึ้นในวันที่ 3 และ 7 เท่ากับ 50.99 และ 26.73 U/mg protein ตามลำดับ ซึ่งมีค่า specific activity ของเอนไซม์ β -1,3-glucanase สูงมากกว่ากรรมวิธีที่รดด้วยเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T50 ร่วมกับการปลูกเชื้อรา *P. aphanidermatum* ที่มีค่า specific activity ของเอนไซม์ β -1,3-glucanase ไม่แตกต่างจากกรรมวิธีควบคุม และยังพบว่า กรรมวิธีที่รดด้วยเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T152 ร่วมกับการปลูกเชื้อรา *P. aphanidermatum* สามารถกระตุ้นให้ค่า specific activity ของเอนไซม์ β -1,3-glucanase เพิ่มขึ้นสูงสุดในวันที่ 7 ซึ่งเท่ากับ 49.43 U/mg protein เมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุม ในขณะที่กรรมวิธีที่รดด้วยเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T152 มีค่า specific activity ของเอนไซม์ β -1,3-glucanase เพิ่มขึ้นในวันที่ 3 และ 9 เท่ากับ 38.51 และ 32.52 U/mg protein ตามลำดับ (ภาพที่ 4 ข)

การเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ chitinase ในใบและยอดของมะเขือเทศ หลังจากรดวัสดุปลูกด้วยเชื้อรา *P. aphanidermatum* เพียงชนิดเดียวพบว่า สามารถกระตุ้นให้พืชสร้างเอนไซม์ chitinase เพิ่มขึ้นในวันที่ 3 5 และ 9 โดยวิเคราะห์ค่า specific activity ได้เท่ากับ 28.65 35.56 และ 18.61 U/mg protein ตามลำดับ (ภาพที่ 5 ก) ส่วนกรรมวิธีที่รดด้วยเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 ร่วมกับการปลูกเชื้อรา *P. aphanidermatum* มีค่า specific activity ของเอนไซม์ chitinase สูงกว่ากรรมวิธีที่รดด้วยเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 เพียงชนิดเดียว

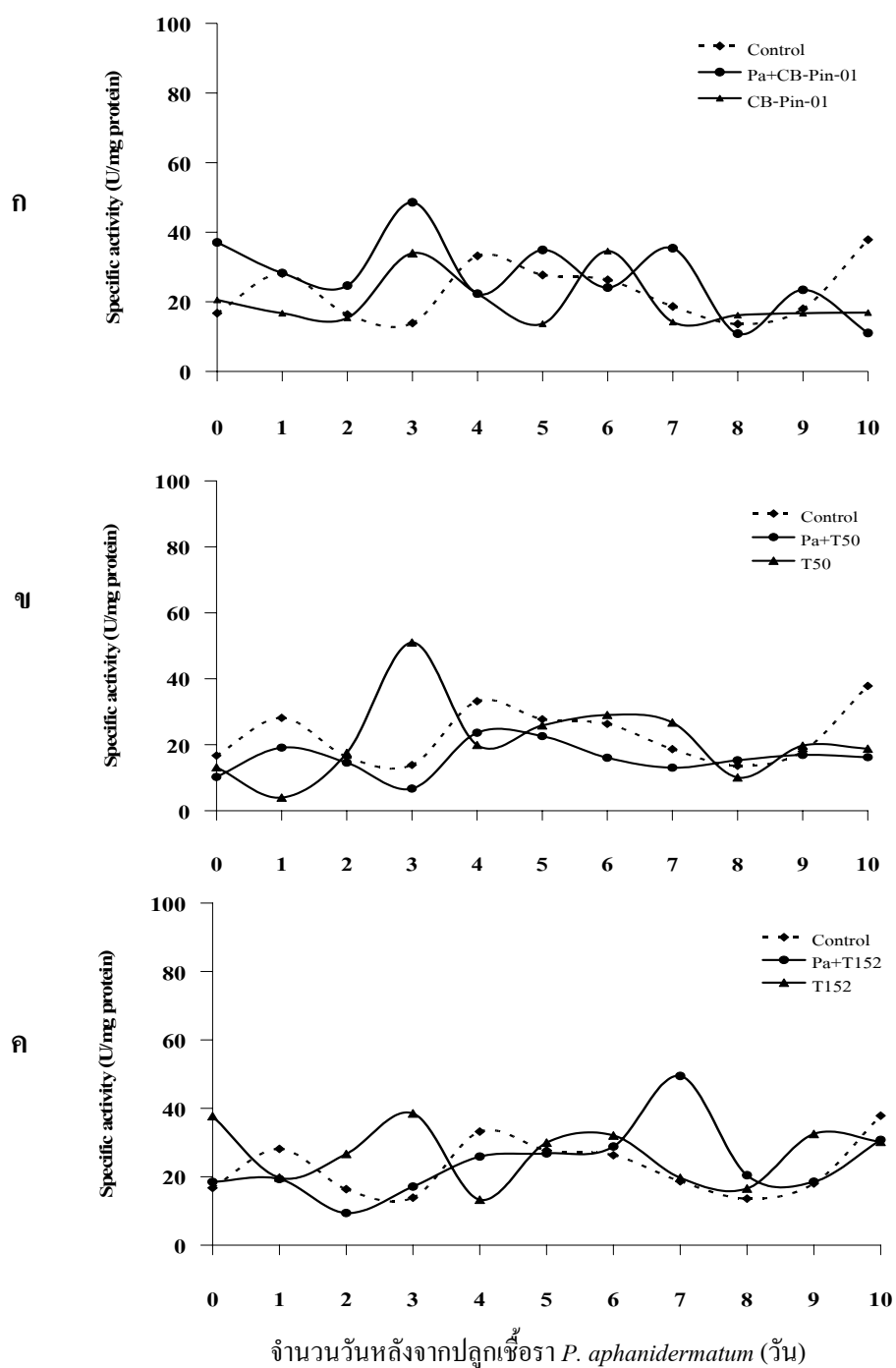
โดยเพิ่มขึ้นในช่วงวันที่ 3 และ 4 ซึ่งวิเคราะห์ค่า specific activity ได้เท่ากับ 14.19 และ 16.41 U/mg protein ตามลำดับ และเพิ่มขึ้นอีกครั้งในวันที่ 8 และ 9 ซึ่งเท่ากับ 14.44 และ 20.35 U/mg protein ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุม ในขณะที่กรรมวิธีที่รดด้วยเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 เพียงชนิดเดียว มีค่า specific activity ของเอนไซม์ chitinase เพิ่มขึ้นในวันที่ 4 และ 9 ซึ่งวิเคราะห์ค่า specific activity ได้เท่ากับ 13.15 และ 16.82 U/mg protein ตามลำดับ (ภาพที่ 5 ข)

นอกจากนี้ กรรมวิธีที่รดด้วยเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T50 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ chitinase เพิ่มขึ้นในวันที่ 2 และ 9 โดยวิเคราะห์ค่า specific activity ได้เท่ากับ 40.35 และ 21.35 U/mg protein ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุม ซึ่งมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ chitinase สูงมากกว่ากรรมวิธีที่รดด้วยเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T50 ร่วมกับการปลูกเชื้อรา *P. aphanidermatum* ที่มีค่า specific activity ของเอนไซม์ chitinase ไม่แตกต่างจากกรรมวิธีควบคุม (ภาพที่ 6 ก) และยังพบว่า กรรมวิธีที่รดด้วยเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T152 ร่วมกับการปลูกเชื้อรา *P. aphanidermatum* สามารถกระตุ้นให้พืชสร้างเอนไซม์ chitinase เพิ่มขึ้นในวันที่ 7 และ 9 ซึ่งวิเคราะห์ค่า specific activity ได้เท่ากับ 28.44 และ 22.05 U/mg protein ตามลำดับเมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุม ในขณะที่กรรมวิธีที่รดด้วยเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T152 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ chitinase เพิ่มขึ้นสูงสุดในวันที่ 3 เท่ากับ 15.14 U/mg protein เมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (ภาพที่ 6 ข)

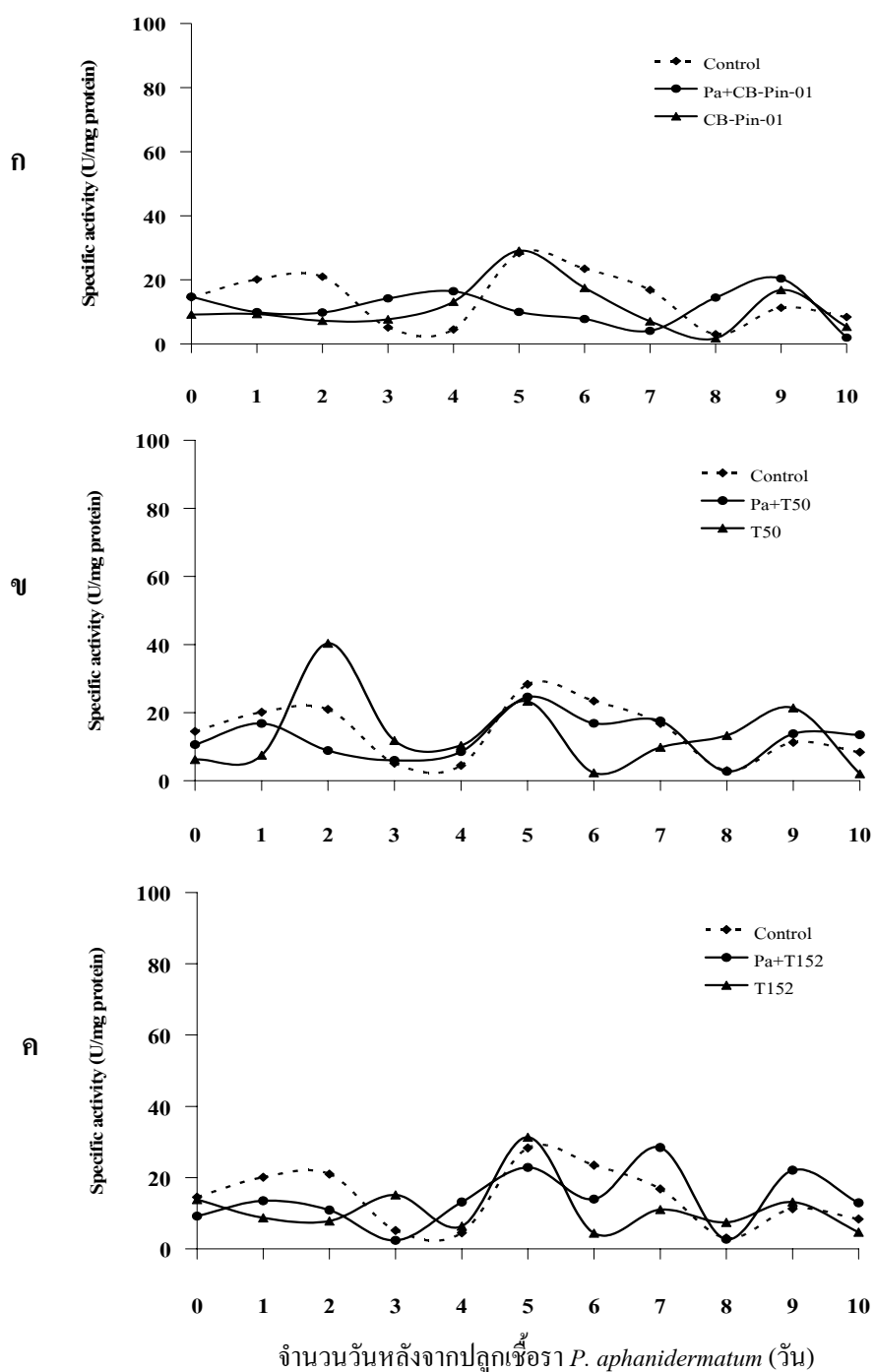
การเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ β -1,3- glucanase และเอนไซม์ chitinase ในการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Hrmova and Fincher (1993) ; Joosten and Dewit (1989) ; Benhamou *et. al.* (1998) ; Leah *et. al.* (1991) ที่พบว่ามะเขือเทศพันธุ์ต้านทานต่อโรคมมีการสร้างเอนไซม์ β -1,3- glucanase และเอนไซม์ chitinase เพิ่มขึ้นเมื่อกระตุ้นด้วยเชื้อรา *Cladosporium fulvum* และเชื้อรา *Fusarium oxysporum* นอกจากนี้เอนไซม์ chitinase และเอนไซม์ β -1,3- glucanase ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น PR - protein ยังสามารถทำงานร่วมกันแบบ synergistic ในการยับยั้งเชื้อรา *F. solani* f. sp. *phaseoli* ได้ (Mauch, 1989) เนื่องจากเชื้อราส่วนใหญ่จะมี chitin และ β -1,3- glucan เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ ดังนั้นการกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ทั้งสองจึงมีความสำคัญต่อปฏิกิริยาตอบสนองเพื่อป้องกันตัวเองของพืช และอาจเป็นกลไกหนึ่งในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคได้



ภาพที่ 3 แสดงค่า specific activity ของเอนไซม์ β -1,3-glucanase ในใบและยอดของกล้ามะเขือเทศ เมื่อปลูกเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* (Pa)
 ก. เอนไซม์ β -1,3-glucanase
 ข. เอนไซม์ chitinase



ภาพที่ 4 แสดงค่า specific activity ของเอนไซม์ β -1,3-glucanase ในใบและยอดมะเขือเทศ เมื่อรดด้วยเชื้อรา *Trichoderma harzianum* และปลวกเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* (Pa)
 ก. กรรมวิธีที่ใส่ เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม
 ข. กรรมวิธีที่ใส่ เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T50 เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม
 ค. กรรมวิธีที่ใส่ เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T152 เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม



ภาพที่ 5 แสดงค่า specific activity ของเอนไซม์ chitinase ในใบและยอดมะเขือเทศ เมื่อรดด้วย เชื้อรา *Trichoderma harzianum* และปลุกเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* (Pa)
 ก. กรรมวิธีที่ใส่ เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 เปรียบเทียบกับกรรมวิธี ควบคุม
 ข. กรรมวิธีที่ใส่ เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T50 เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม
 ค. กรรมวิธีที่ใส่ เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T152 เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม

3. ผลของเชื้อรา *Pseudocercospora fuligena* ต่อการเกิดโรคและกิจกรรมของเอนไซม์ β -1,3-glucanase และเอนไซม์ chitinase

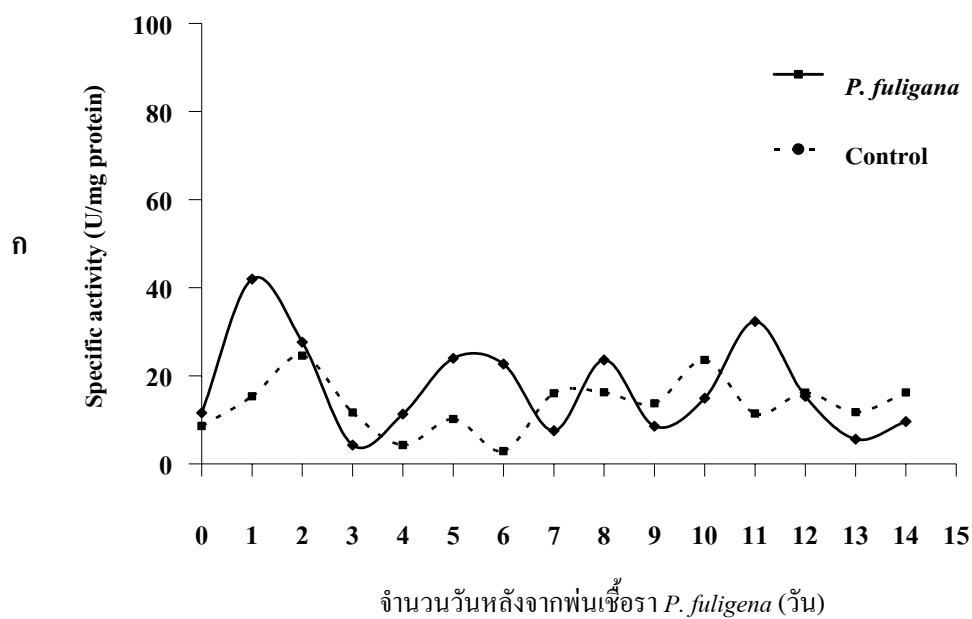
เมื่อประเมินโรคหลังจากการพ่นเชื้อรา *P. fuligena* ความเข้มข้น 1.0×10^4 สปอร์/มิลลิลิตร บนใบมะเขือเทศ 4 สัปดาห์หลังย้ายกล้า พบว่ามีความรุนแรงของโรค 15.92 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3) ซึ่งให้ผลแตกต่างจากกรรมวิธีควบคุม และการทดสอบของ Hartman *et al.* (1991) ที่รายงานว่ เมื่อพ่นสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *P. fuligena* ความเข้มข้น 5×10^3 โคนิเดีย/มิลลิลิตร เกิดโรคได้มากถึง 96 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบ หลังจากปลูกเชื้อไปแล้ว 14 วัน แต่ในการทดลองครั้งนี้แม้ว่าเวลาจะผ่านไป ถึง 4 สัปดาห์ ก็มีการเกิดโรคค่อนข้างน้อย อาจเนื่องจากช่วงเวลาที่ทดลอง คือ ช่วงเดือนธันวาคม – มกราคม ที่มีสภาพอากาศค่อนข้างแห้ง มีความชื้นน้อย ลมพัดแรง เป็นสภาพที่ไม่มีความเหมาะสมต่อการเกิดโรค

ตารางที่ 3 ความรุนแรงของโรคราใบดำของมะเขือเทศ หลังจากพ่นเชื้อรา *Pseudocercospora fuligena* ไปแล้ว 4 สัปดาห์

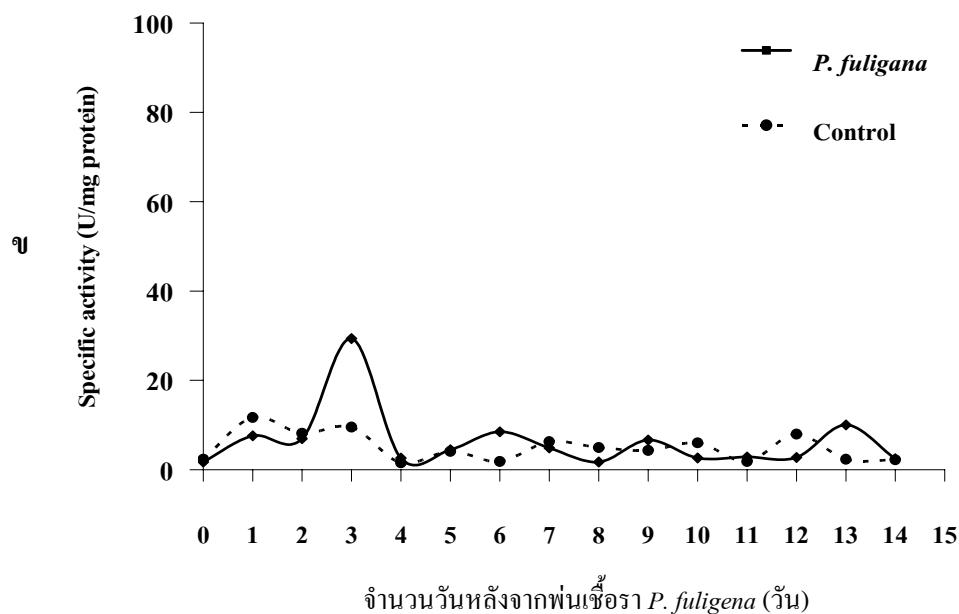
กรรมวิธี	ความรุนแรงของโรค (%)
Control	3.32 b ^{1/}
<i>P. fuligena</i>	15.92 a

หมายเหตุ ^{1/} ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรเดียวกันในแนวตั้งของตารางไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เปรียบเทียบทางสถิติโดย Duncan's Multiple Range Test (P=0.05)

ตัวอย่างใบและยอดของมะเขือเทศ เมื่อพ่นด้วยเชื้อรา *P. fuligena* สามารถกระตุ้นให้ค่า specific activity ของเอนไซม์ β -1,3- glucanase เพิ่มขึ้น ในวันที่ 1 5 6 และ 11 เท่ากับ 45.47 24.93 23.58 และ 33.60 U/mg protein ตามลำดับ (ภาพที่ 6) ส่วน specific activity ของเอนไซม์ chitinase ในวันที่ 3 6 และ 12 มีค่ากิจกรรมเท่ากับ 29.36 8.48 และ 10.04 U/mg protein ตามลำดับ (ภาพที่ 7) จากการที่เอนไซม์ β -1,3- glucanase และ chitinase จัดเป็น PR – protein ดังนั้นพืชจึงสร้างขึ้นมาเมื่ออยู่ในสภาวะไม่ปกติ เช่น มีการรุกรานจากเชื้อสาเหตุโรค (Ginnakis *et al.*, 1998) โดยที่ β -1, 3- glucanase ถูกกระตุ้นให้สร้างขึ้นเพื่อการตอบสนองทั้งต่อการเข้าทำลายโดยเชื้อราและความเครียดที่เกิดจากสภาพแวดล้อม (environmental stress) ในพืชปกติสามารถพบ β -1, 3 - glucanase ได้ใน



ภาพที่ 6 แสดงค่า specific activity ของเอนไซม์ β -1,3-glucanase ในใบและยอดมะเขือเทศ เมื่อพ่นด้วยเชื้อรา *Pseudocercospora fuligana*



ภาพที่ 7 แสดงค่า specific activity ของเอนไซม์ chitinase ในใบและยอดมะเขือเทศ เมื่อพ่นด้วยเชื้อรา *Pseudocercospora fuligana*

เนื้อเยื่อพืชหลายชนิด โดยมีค่า specific activity ของเอนไซม์ β -1, 3-glucanase เพิ่มขึ้นหรือลดลงตอบสนองต่อ phytohormones หลายชนิด (Ko *et al.*, 2003) ที่พบในพืช เช่นมันฝรั่งที่ถูกเข้าทำลายโดยเชื้อรา *P. infestans* พบว่ามีการสะสมของ β -1, 3 - glucanase ในส่วนของ vacuoles และบางครั้งก็มีการปล่อยสาร β -1, 3 - glucanase บางส่วนออกมาในบริเวณช่องว่างระหว่างเซลล์ เพื่อย่อยผนังเซลล์ของเชื้อราและเป็นตัวกระตุ้นการเกิดกระบวนการ hypersensitive cell death และการสังเคราะห์สาร phytoalexin ตลอดจน PR – protein ที่เกิดจากการแสดงออกของ PR - gene มีการสะสมอยู่หลายวันในพืชที่ได้รับการกระตุ้นและจะมีค่าสูงสุดประมาณวันที่ 7 ถึงวันที่ 10 หลังจากเชื้อโรคเข้าทำลาย (Rattarasarn, 2003)

4. การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ในการลดการเกิดโรค และการชักนำให้มะเขือเทศต้านทานต่อการเกิดโรคราใบดำจากเชื้อรา *Pseudocercospora fuligena* ร่วมกับการปลูกเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* สาเหตุโรครากเน่าของมะเขือเทศในวัสดุปลูก

จากการประเมินโรคราใบดำของมะเขือเทศที่อายุ 10, 12 และ 14 สัปดาห์ หลังย้ายกล้า หรือหลังจากการพ่นเชื้อรา *P. fuligena* ไปแล้ว 6, 8 และ 10 สัปดาห์ พบว่าในกรรมวิธีควบคุมที่ไม่ได้พ่นเชื้อรา *P. fuligena* (uninoculated control) มีการเกิดโรค 0.10 , 4.58 และ 34.28 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4) ในขณะที่การพ่นเชื้อรา *P. fuligena* ความเข้มข้น 1.0×10^4 สปอร์/มิลลิลิตร (inoculated control) สามารถเพิ่มความรุนแรงของโรคได้เป็น 13.11, 36.45 และ 60.12 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในกรรมวิธีที่มีการพ่นเชื้อรา *P. fuligena* ร่วมกับ กรรมวิธีที่ปลูกเชื้อรา *P. aphanidermatum* (Pf+ Pa) พบว่า มีความรุนแรงของโรค สอดคล้องกับผลของการเจริญเติบโตของส่วนต่างๆ และผลผลิตของมะเขือเทศ และมีความแตกต่างจากกรรมวิธีควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4) ส่วนกรรมวิธีที่ใช้สารเคมี mancozeb (Pf + mancozeb) มีความรุนแรงของโรคน้อยที่สุดคือ 3.13 , 12.17 และ 41.39 เปอร์เซ็นต์ จากการประเมินทั้ง 3 ครั้ง ตามลำดับ

ตารางที่ 4 ความรุนแรงของโรค และเปอร์เซ็นต์การลดการเกิดโรคราใบดำของมะเขือเทศของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 T50 และ T152 หลังจากการพ่นเชื้อรา *Pseudocercospora fuligena* (Pf) ไปแล้ว 6, 8 และ 10 สัปดาห์

กรรมวิธี	ความรุนแรงของโรค			เปอร์เซ็นต์การลดการเกิดโรค		
	(%)			(%)		
	ครั้งที่ 1 ^{1/}	ครั้งที่ 2 ^{2/}	ครั้งที่ 3 ^{3/}	ครั้งที่ 1 ^{1/}	ครั้งที่ 2 ^{2/}	ครั้งที่ 3 ^{3/}
uninoculated control	0.10 d ^{6/}	4.58 d	34.28 d	-	-	-
inoculated control (Pf)	13.11 a	36.45 a	60.12 a	-	-	-
Pf + <i>Pythium aphanidermatum</i> (Pa) ^{4/}	7.29 b	22.64 b	54.55 ab	44.39	37.89	9.26
Pf + CB-Pin-01 + Pa	4.32 bc	17.36 bc	48.88 a-c	67.05	52.37	18.70
Pf + T50 + Pa	4.46 bc	15.74 bc	47.75 bc	65.98	56.82	20.58
Pf + T152 + Pa	4.40 bc	15.63 bc	43.66 b-d	66.44	57.12	27.38
Pf + CB-Pin-01	6.66 bc	18.78 bc	44.54 b-d	49.20	48.48	25.91
Pf + T50	5.61 bc	16.29 bc	47.34 bc	57.21	55.31	21.26
Pf + T152	5.12 bc	18.08 bc	45.80 b-d	60.95	50.40	23.82
Pf + mancozeb ^{5/}	3.13 cd	12.17 c	41.39 cd	76.13	66.61	31.15

หมายเหตุ ^{1/} การประเมินโรคครั้งที่ 1 หลังจากการพ่นเชื้อรา *P. fuligena* ไปแล้ว 6 สัปดาห์

^{2/} การประเมินโรคครั้งที่ 2 หลังจากการพ่นเชื้อรา *P. fuligena* ไปแล้ว 8 สัปดาห์

^{3/} การประเมินโรคครั้งที่ 3 หลังจากการพ่นเชื้อรา *P. fuligena* ไปแล้ว 10 สัปดาห์

^{4/} ปลูกเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* จำนวน 2 ครั้งหลังจากย้ายกล้ามะเขือเทศไปแล้ว 4 และ 6 สัปดาห์

^{5/} พ่นสารเคมี mancozeb จำนวน 2 ครั้งหลังจากย้ายกล้ามะเขือเทศไปแล้ว 4 และ 6 สัปดาห์

^{6/} ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรเดียวกันในแนวตั้งของตารางไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติวิเคราะห์โดย Duncan's Multiple Range Test (P=0.05)

เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 T50 และ T152 สามารถลดความรุนแรงของโรคได้ โดยพบว่า จากการประเมินโรคทั้ง 3 ครั้ง ในทุกกรรมวิธีที่รดเชื้อรา *T. harzianum* และ กรรมวิธีที่รดเชื้อรา *T. harzianum* ร่วมกับการปลูกเชื้อรา *P. aphanidermatum* มีเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรค แตกต่างจากกรรมวิธีควบคุมที่มีการพ่นเชื้อรา *P. fuligena* (inoculated control) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยสามารถลดการเกิดโรคราใบดำของมะเขือเทศได้ 18.70 – 67.05 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีที่ใช้สารเคมี mancozeb (ตารางที่ 4) ส่วนทางด้านกรเจริญเติบโตของมะเขือเทศพบว่า กรรมวิธีที่รดด้วยเชื้อรา *T. harzianum* มีน้ำหนักต้นแห้งและสด อยู่ระหว่าง 31.99 - 92.47 กรัม และในกรรมวิธีที่รดด้วยเชื้อรา *T. harzianum* ร่วมกับการปลูกเชื้อรา *P. aphanidermatum* ซึ่งมีน้ำหนักต้นแห้งและสดอยู่ระหว่าง 35.04 - 103.10 กรัม โดยไม่มีความแตกต่างจากกรรมวิธีใช้สารเคมี mancozeb (Pf + mancozeb) และกรรมวิธีควบคุม (uninoculated control) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ กรรมวิธีที่รดด้วยเชื้อรา *T. harzianum* มีน้ำหนักรากแห้งและสดอยู่ระหว่าง 1.02 - 11.30 กรัม ซึ่งมีน้ำหนักมากกว่าในทุกกรรมวิธีที่รดด้วยเชื้อรา *T. harzianum* ร่วมกับการปลูกเชื้อรา *P. aphanidermatum* ซึ่งมีน้ำหนักรากแห้งและสดอยู่ระหว่าง 0.96- 7.64 กรัม อาจเพราะเชื้อรา *P. aphanidermatum* เข้าทำลายรากของมะเขือเทศให้เกิดความเสียหาย โดยไม่มีความแตกต่างจากกรรมวิธีควบคุม (uninoculated control) และกรรมวิธีที่ปลูกเชื้อรา *P. aphanidermatum* (Pf + Pa) เพียงอย่างเดียว (ตารางที่ 5)

กรรมวิธีที่รดเชื้อรา *T. harzianum* และ กรรมวิธีที่รดเชื้อรา *T. harzianum* ร่วมกับการปลูกเชื้อรา *P. aphanidermatum* พบว่า เชื้อรา *T. harzianum* สามารถช่วยส่งเสริมให้ลำต้นมีความสูงเพิ่มขึ้นและรากมีความยาวมากขึ้นด้วย เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (uninoculated control) กรรมวิธีที่ใช้สารเคมี mancozeb (Pf + mancozeb) และกรรมวิธีที่ปลูกเชื้อรา *P. aphanidermatum* (Pf + Pa) ในกรณีของน้ำหนักผลผลิตของมะเขือเทศนั้น พบว่า ทุกกรรมวิธีที่มีการรดด้วยเชื้อรา *T. harzianum* เพื่อชักนำให้มะเขือเทศต้านทานต่อโรคราใบดำของมะเขือเทศสาเหตุจากเชื้อรา *P. fuligena* นั้น ให้ผลผลิตสูงกว่ากรรมวิธีที่มีการพ่นเชื้อรา *P. fuligena* (Pf) และในกรรมวิธีที่มีการพ่นเชื้อรา *P. fuligena* ร่วมกับ กรรมวิธีที่ปลูกเชื้อรา *P. aphanidermatum* (Pf + Pa) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยกรรมวิธีที่รดด้วยเชื้อรา *T. harzianum* ให้ผลผลิตอยู่ระหว่าง 395.65 - 440.21 กรัม/ต้น (ตารางที่ 6)

ในการทดลองครั้งนี้พบว่า มีความสอดคล้องกับการทดลองของ Seaman (2003) ที่ใส่เชื้อรา *Trichoderma* สายพันธุ์ T- 22 ที่รากกล้ามะเขือเทศขณะย้ายกล้า หลังจากนั้น 90 – 120 วัน พบอาการของโรคใบไหม้ของมะเขือเทศ (early blight) สาเหตุจากเชื้อรา *Alternaria solani* แต่ในแปลงที่ทำมากกว่า 2 ปีแล้ว พบว่าโรคลดลง 80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับแปลงที่ไม่ได้ใส่เชื้อถึงแม้ว่าจะพบเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T- 22 แต่เพียงบนรากเท่านั้น นอกจากนี้จากการศึกษาของ De Meyer ในปี 1998 พบว่า การรดเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T39 สามารถลดการเกิดโรค Grey mould (*Botrytis cinerea*) ในมะเขือเทศ ผักกาดหอม และพริกได้

นอกจากนี้ยังมีรายงานเกี่ยวกับการชักนำความต้านทานโรคโดยการใช้เชื้อรา *Trichoderma* sp. กับพืชชนิดอื่นอีก เช่น การทดลองของ Ahmed *et al.* (2000) พบว่า *T. harzianum* สามารถลดขนาดของแผลที่ต้นพริก ที่เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora capsici* ได้ประมาณ 40% ในถั่วก็พบว่าเมื่อรดด้วยเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T- 22 สามารถที่จะปกป้องใบถั่วจากเชื้อรา *B. cinerea* และเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* ได้

ตารางที่ 5 ค่าเฉลี่ยน้ำหนักลำต้น และน้ำหนักรากของมะเขือเทศ เมื่อสิ้นสุดการทดลองที่มีการรดเชื้อรา *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01, T50 และ T152 ร่วมกับการปลูกเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* (Pa) และพินเชื้อรา *Pseudocercospora fuligena* (Pf)

กรรมวิธี	น้ำหนักต้น (กรัม)		น้ำหนักราก (กรัม)	
	น้ำหนักสด	น้ำหนักแห้ง	น้ำหนักสด	น้ำหนักแห้ง
	uninoculated control	96.29 a ^{1/}	33.63 ab	9.68 ab
inoculated control (Pf)	84.03 ab	32.78 ab	11.62 a	1.11 a-c
Pf + <i>Pythium aphanidermatum</i> (Pa)	74.87 b	26.20 b	6.32 c	0.81 d
Pf + CB-Pin-01 + Pa	90.61 ab	31.99 ab	7.13 bc	0.96 cd
Pf + T50 + Pa	92.47 ab	33.63 ab	7.64 bc	0.99 b-d
Pf + T152 + Pa	86.36 ab	32.44 ab	7.56 bc	1.01 a-d
Pf + CB-Pin-01	99.56 a	35.04 ab	11.19 a	1.23 ab
Pf + T50	103.10 a	35.40 ab	11.30 a	1.13 a-c
Pf + T152	101.38 a	37.04 a	9.73 ab	1.02 a-d
Pf + mancozeb	103.00 a	38.38 a	12.52 a	1.25 a

หมายเหตุ ^{1/} ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan' Multiple Range Test (DMRT) (P=0.05)

ตารางที่ 6 ค่าเฉลี่ยความสูงลำต้น ความยาวราก และน้ำหนักผลผลิตของมะเขือเทศ เมื่อสิ้นสุดการทดลองที่มีการรดเชื้อรา *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01, T50 และ T152 ร่วมกับการปลูกเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* (Pa) และฟันเชื้อรา *Pseudocercospora fuligena* (Pf)

กรรมวิธี	ความสูงต้น (ซม.)	ความยาวราก (ซม.)	น้ำหนักผลผลิต (กรัม/ต้น)
uninoculated control	129.81 ab ^{1/}	34.07 a-c	451.13 a
inoculated control (Pf)	136.71 a	39.06 ab	375.32 ab
Pf + <i>Pythium aphanidermatum</i> (Pa)	116.44 ab	20.55 d	265.98 b
Pf + CB-Pin-01 + Pa	131.19 a	25.51 cd	357.43 ab
Pf + T50 + Pa	128.02 ab	25.44 cd	347.20 ab
Pf + T152 + Pa	127.81 ab	23.14 cd	345.66 ab
Pf + CB-Pin-01	134.58 a	42.85 a	395.65 a
Pf + T50	135.10 a	39.37 ab	413.99 a
Pf + T152	137.81 a	29.54 b-d	440.21 a
Pf + mancozeb	130.56 ab	41.73 a	420.75 a

หมายเหตุ ^{1/} ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan' Multiple Range Test (DMRT) (P=0.05)

ปริมาณประชากรในวัสดุปลูกของเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01, T50 และ T152 และเชื้อรา *P. aphanidermatum* มีความสัมพันธ์ไปในทางเดียวกันกับเปอร์เซ็นต์การลดการเกิดโรค กล่าวคือ ในทุกกรรมวิธีที่รดด้วยเชื้อรา *T. harzianum* ร่วมกับการปลูกเชื้อรา *P. aphanidermatum* มีปริมาณเชื้อรา *T. harzianum* อยู่ระหว่าง $13.5 - 42.3 \times 10^4$ CFU/g ซึ่งมากกว่าในกรรมวิธีที่รดด้วยเชื้อรา *T. harzianum* ที่มีปริมาณเชื้ออยู่ระหว่าง $6.5 - 36.0 \times 10^4$ CFU/g ในขณะที่ทุกกรรมวิธีที่รดด้วยเชื้อรา *T. harzianum* ร่วมกับการปลูกเชื้อรา *P. aphanidermatum* พบว่า มีปริมาณประชากรในวัสดุปลูกของเชื้อรา *P. aphanidermatum* อยู่ระหว่าง $6.5 - 10.4 \times 10^2$ CFU/g โดยมีปริมาณประชากรของเชื้อรา *P. aphanidermatum* เพิ่มขึ้นมากเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ปลูกเชื้อรา *P. aphanidermatum* (Pf + Pa) เพียงอย่างเดียวที่มีประชากรในวัสดุปลูกเท่ากับ 5.6×10^2 CFU/g ส่วนเปอร์เซ็นต์การครองครองรากมะเขือเทศของเชื้อรา *T. harzianum* ในทุกกรรมวิธีที่รดด้วยเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01, T50 และ T152 ร่วมกับการปลูกเชื้อรา *P. aphanidermatum* พบว่า เชื้อรา *T. harzianum* สามารถเข้าครอบครองรากได้ 72.5 , 70 และ 60 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งมีความสามารถในการเข้าครอบครองรากมากกว่าในกรรมวิธีที่รดด้วยเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01, T50 และ T152 ซึ่งเท่ากับ 61.3 , 45 และ 45 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่เดียวกันการเข้าครอบครองรากของเชื้อรา *P. aphanidermatum* ทุกกรรมวิธีที่รดด้วยเชื้อรา *T. harzianum* ร่วมกับการปลูกเชื้อรา *P. aphanidermatum* พบว่า เชื้อรา *P. aphanidermatum* มีความสามารถในการเข้าครอบครองรากลดลงอย่างมาก ซึ่งเท่ากับ 32 , 30 และ 34.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ปลูกเชื้อรา *P. aphanidermatum* (Pf + Pa) เพียงอย่างเดียวที่เชื้อโรคสามารถเข้าครอบครองรากของมะเขือเทศได้สูงถึง 95 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 7)

ทั้งนี้เชื้อรา *T. harzianum* ทั้ง 3 สายพันธุ์ มีปริมาณเพิ่มขึ้นในกรรมวิธีที่มีการปลูกเชื้อรา *P. aphanidermatum* ร่วมด้วย โดยมีประชากรในวัสดุปลูกมากกว่า ในกรรมวิธีที่รดด้วยเชื้อรา *T. harzianum* และกรรมวิธีที่ปลูกเชื้อรา *P. aphanidermatum* เพียงชนิดเดียว อาจเกิดจากการที่เชื้อรา *T. harzianum* และเชื้อรา *P. aphanidermatum* พยายามแข่งขันกัน เพื่อครอบครองพื้นที่ราก และแก่งแย่งอาหารในวัสดุปลูก จึงมีประชากรของเชื้อราทั้งสองค่อนข้างมากในวัสดุปลูก

นอกจากนี้การชักนำความต้านทานต่อโรครากเน่าหรือโรคราใบดำของมะเขือเทศด้วยเชื้อรา *T. harzianum* อาจเกี่ยวข้องกับความสามารถของเชื้อรา *T. harzianum* ในการเจริญบนผิวรากมะเขือเทศ ซึ่งอธิบายได้จากการทดลองของดวงใจ (2548) พบว่าเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์

T-50 สามารถคงทนอยู่ในรากได้แม้จะผ่านการล้างด้วยสารละลาย 0.525 % sodium hydrochlorite นาน 5 นาที และสามารถพบการเจริญของเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T-50 ได้ แสดงว่าเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T-50 มีความสามารถในการเจริญครอบครองรากแตงกวาได้ดี เช่นเดียวกับ รายงานของ Intana (2003) และแสดงให้เห็นว่าเส้นใยของเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T-50 สามารถเจริญอยู่ภายในเซลล์ของฝักรากแตงกวาได้เช่นเดียวกับงานทดลองของ Harman *et al.* (2004a) ตามรายงานของ Yedidia *et al.* (1999) และ Yedidia *et al.* (2000) ที่กล่าวถึงการเจริญ ครอบครองฝักรากแตงกวาด้วยเชื้อรา *T. harzianum* สามารถกระตุ้นลักษณะ electron dense และการสร้าง callose ที่ช่วยในผนังเซลล์พืชแข็งแรงต้านทานต่อการเข้าทำลายโดยเชื้อสาเหตุโรคหรือ กระตุ้นให้พืชมีการผลิต PR-protein ชนิด chitinase และ β -1,3 glucanase ที่เกี่ยวข้องกับการ ยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคในแตงกวาได้ และการเปลี่ยนแปลงของ PR-protein ในพืชมีการ ผลิตมาเพื่อตอบสนองต่อการเข้าทำลายโดยเชื้อรา ไวรัส ไวรอยด์ และเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาร antipathogenic มีบทบาทในความต้านทานแบบ acquired resistance ป้องกันการเข้าทำลายโดยเชื้อ สาเหตุโรคในครั้งต่อไป (Veit *et al.*, 2001)

ตารางที่ 7 แสดงปริมาณประชากร เพอร์เซ็นต์การครอบครองรากเมื่อสิ้นสุดการทดลองที่มีการรดเชื้อรา *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01, และ T50 และปลูกเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* (Pa) และพ่นเชื้อรา *Pseudocercospora fuligena* (Pf)

กรรมวิธี	ประชากรในวัสดุปลูก		การครอบครองราก	
	(CFU/g)		(%)	
	<i>T. harzianum</i> (x10 ⁴)	<i>Pythium</i> (x10 ²)	<i>T. harzianum</i>	<i>Pythium</i>
Uninoculated control	-	-	-	-
Inoculated control (Pf)	-	-	-	-
Pf + <i>Pythium aphanidermatum</i> (Pa)	-	5.6	-	95.0
Pf + CB-Pin-01 + Pa	42.3	6.5	72.5	32.0
Pf + T50 + Pa	13.5	7.0	70.0	30.0
Pf + T152 + Pa	14.9	10.4	60.0	34.2
Pf + CB-Pin-01	36.0	-	61.3	-
Pf + T50	6.5	-	45.0	-
Pf + T152	13.5	-	45.0	-
Pf + mancozeb	-	-	-	-

หมายเหตุ ^{1/} ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan' Multiple Range Test (DMRT) (P=0.05)

การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลง specific activity ของเอนไซม์ β -1,3-glucanase ในยอดและใบของมะเขือเทศ จากกรรมวิธีที่พ่นเชื้อรา *P. fuligena* บนใบเพียงอย่างเดียว (Pf) พบว่า สามารถกระตุ้นให้พืชสร้างเอนไซม์ β -1,3-glucanase เพิ่มขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง ซึ่งวิเคราะห์ค่า specific activity ได้เท่ากับ 43.84 U/mg protein เมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุม และในกรรมวิธีที่พ่นเชื้อรา *P. fuligena* บนใบและรดวัสดุปลูกด้วยเชื้อรา *P. aphanidermatum* (Pa + Pf) มีค่า specific activity ของเอนไซม์ β -1,3-glucanase เพิ่มขึ้นสูงสุดเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง ซึ่งวิเคราะห์ค่า specific activity ได้เท่ากับ 50.42 U/mg protein เมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (ภาพที่ 8 ก) ส่วนกรรมวิธีที่รดด้วยสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 และพ่นเชื้อรา *P.*

fuligena บนใบ (CB-Pin-01 + Pf) มีค่า specific activity ของเอนไซม์ β -1,3-glucanase เพิ่มขึ้นสูงสุดเมื่อเวลาผ่านไป 72 ชั่วโมง เท่ากับ 28.95 U/mg protein ซึ่งมีค่า specific activity ของเอนไซม์ β -1,3-glucanase สูงมากกว่ากรรมวิธีที่รดด้วยเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 ร่วมกับการปลูกเชื้อรา *P. aphanidermatum* และพ่นเชื้อรา *P. fuligena* บนใบ (CB-Pin-01 + Pa + Pf) (ภาพที่ 9 ก)

นอกจากนี้ยังพบว่า ในกรรมวิธีที่รดด้วยเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T50 และพ่นเชื้อรา *P. fuligena* บนใบ (T50 + Pf) มีค่า specific activity ของเอนไซม์ β -1,3-glucanase เพิ่มขึ้นสูงสุดเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง เท่ากับ 52.29 U/mg protein เมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุม ในขณะที่ กรรมวิธีที่รดด้วยเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T50 ร่วมกับการปลูกเชื้อรา *P. aphanidermatum* และพ่นเชื้อรา *P. fuligena* บนใบ (T50 + Pa + Pf) มีค่า specific activity ของเอนไซม์ β -1,3-glucanase เพิ่มขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง ซึ่งวิเคราะห์ค่า specific activity ได้เท่ากับ 21.85 U/mg protein เมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (ภาพที่ 9 ข) และยังพบว่า กรรมวิธีที่รดด้วยเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T152 และพ่นเชื้อรา *P. fuligena* บนใบ (T152 + Pf) สามารถกระตุ้นให้ค่า specific activity ของเอนไซม์ β -1,3-glucanase เพิ่มขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป 24 และ 72 ชั่วโมง ซึ่งวิเคราะห์ค่า specific activity ได้เท่ากับ 45.78 และ 53.08 U/mg protein ตามลำดับเมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุม ในขณะที่ กรรมวิธีที่รดด้วยเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T152 ร่วมกับการปลูกเชื้อรา *P. aphanidermatum* และพ่นเชื้อรา *P. fuligena* บนใบ (T152 + Pa + Pf) มีค่า specific activity ของเอนไซม์ β -1,3-glucanase ไม่แตกต่างกับกรรมวิธีควบคุม (ภาพที่ 9 ค)

การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ chitinase ในยอดและใบของมะเขือเทศ ในกรรมวิธีที่พ่นเชื้อรา *P. fuligena* บนใบเพียงอย่างเดียว (Pf) พบว่า สามารถกระตุ้นให้ค่า specific activity ของเอนไซม์ chitinase เพิ่มขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง ซึ่งวิเคราะห์ค่า specific activity ได้เท่ากับ 10.79 U/mg protein เมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุม และ ในกรรมวิธีที่พ่นเชื้อรา *P. fuligena* บนใบ และรดวัสดุปลูกด้วยเชื้อรา *P. aphanidermatum* (Pa + Pf) มีค่า specific activity ของเอนไซม์ chitinase เพิ่มขึ้นสูงสุดเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง ซึ่งวิเคราะห์ค่า specific activity ได้เท่ากับ 14.80 U/mg protein เมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (ภาพที่ 8 ข) ส่วนกรรมวิธีที่รดด้วยเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 และพ่นเชื้อรา *P. fuligena* บนใบ (CB-Pin-01 + Pf) มีค่า specific activity ของเอนไซม์ chitinase เพิ่มขึ้นสูงสุดเมื่อเวลาผ่านไป 72 ชั่วโมง เท่ากับ 12.48 U/mg protein ในขณะที่ กรรมวิธีที่รดด้วยเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 ร่วมกับการปลูกเชื้อรา *P.*

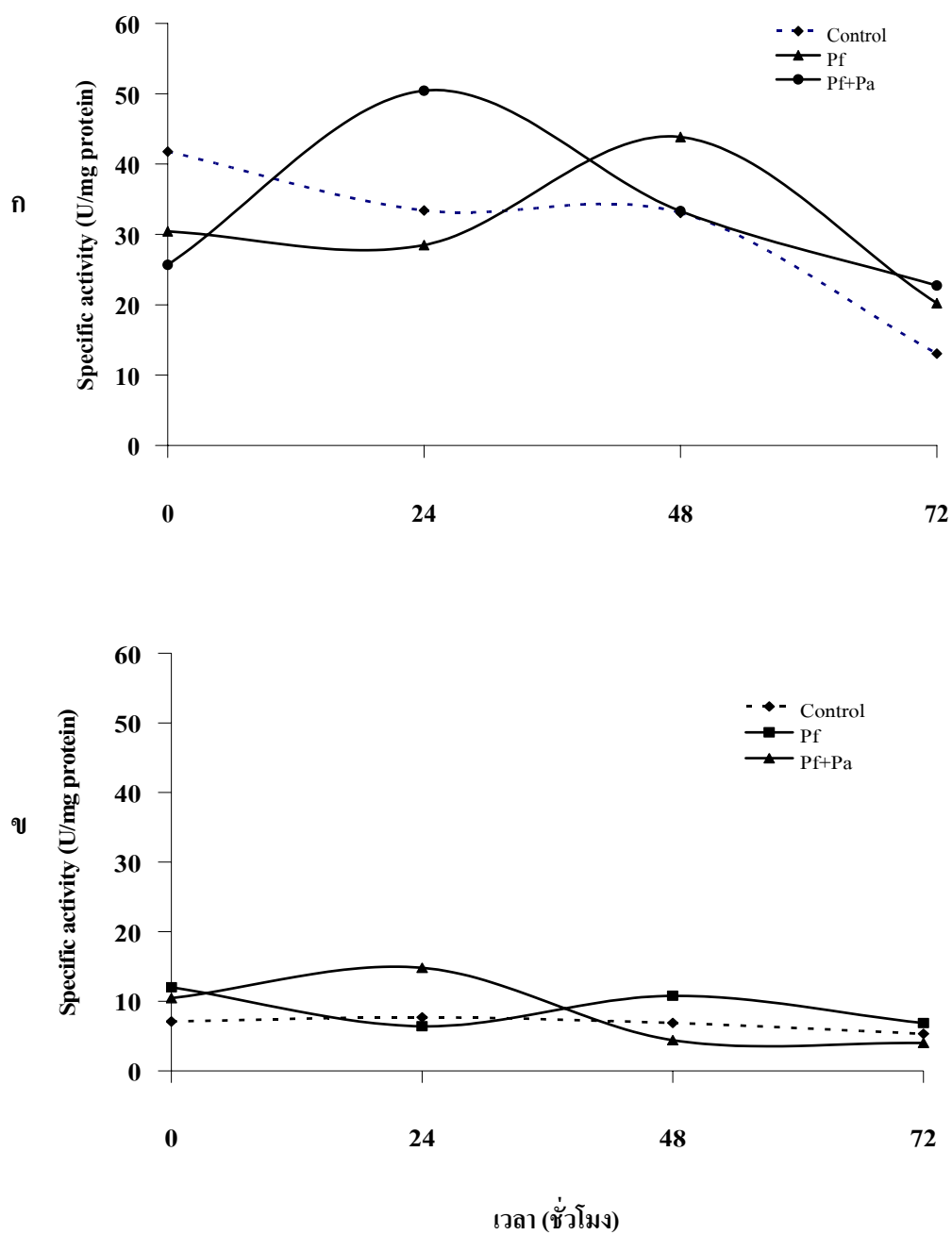
aphanidermatum และฟันทูรา *P. fuligena* บนใบ (CB-Pin-01 + Pa + Pf) มีแนวโน้มของค่า specific activity ของเอนไซม์ chitinase เพิ่มขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง เท่ากับ 12.80 U/mg protein เมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (ภาพที่ 10 ก)

นอกจากนี้ ในกรรมวิธีที่รดด้วยเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T50 และฟันทูรา *P. fuligena* บนใบ (T50 + Pf) และกรรมวิธีที่รดด้วยเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T50 ร่วมกับการปลูกเชื้อรา *P. aphanidermatum* และฟันทูรา *P. fuligena* บนใบ (T50 + Pa + Pf) มีค่า specific activity ของเอนไซม์ chitinase เพิ่มขึ้นสูงสุดเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง เท่ากับ 24.05 และ 12.70 U/mg protein ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (ภาพที่ 10 ข) และยังพบว่า กรรมวิธีที่รดด้วยเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T152 และฟันทูรา *P. fuligena* บนใบ (T152 + Pf) สามารถกระตุ้นให้ค่า specific activity ของเอนไซม์ chitinase เพิ่มขึ้นสูงสุดเมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง ซึ่งเท่ากับ 16.76 U/mg protein เมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุม ในขณะที่กรรมวิธีที่รดด้วยเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T152 ร่วมกับการปลูกเชื้อรา *P. aphanidermatum* และฟันทูรา *P. fuligena* บนใบ (T152 + Pa + Pf) มีค่า specific activity ของเอนไซม์ chitinase สูงสุดที่ 0 ชั่วโมง เท่ากับ 11.43 U/mg protein เมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุม หลังจากนั้นก็ลดลงและไม่มีความแตกต่างกับกรรมวิธีควบคุม (ภาพที่ 10 ค)

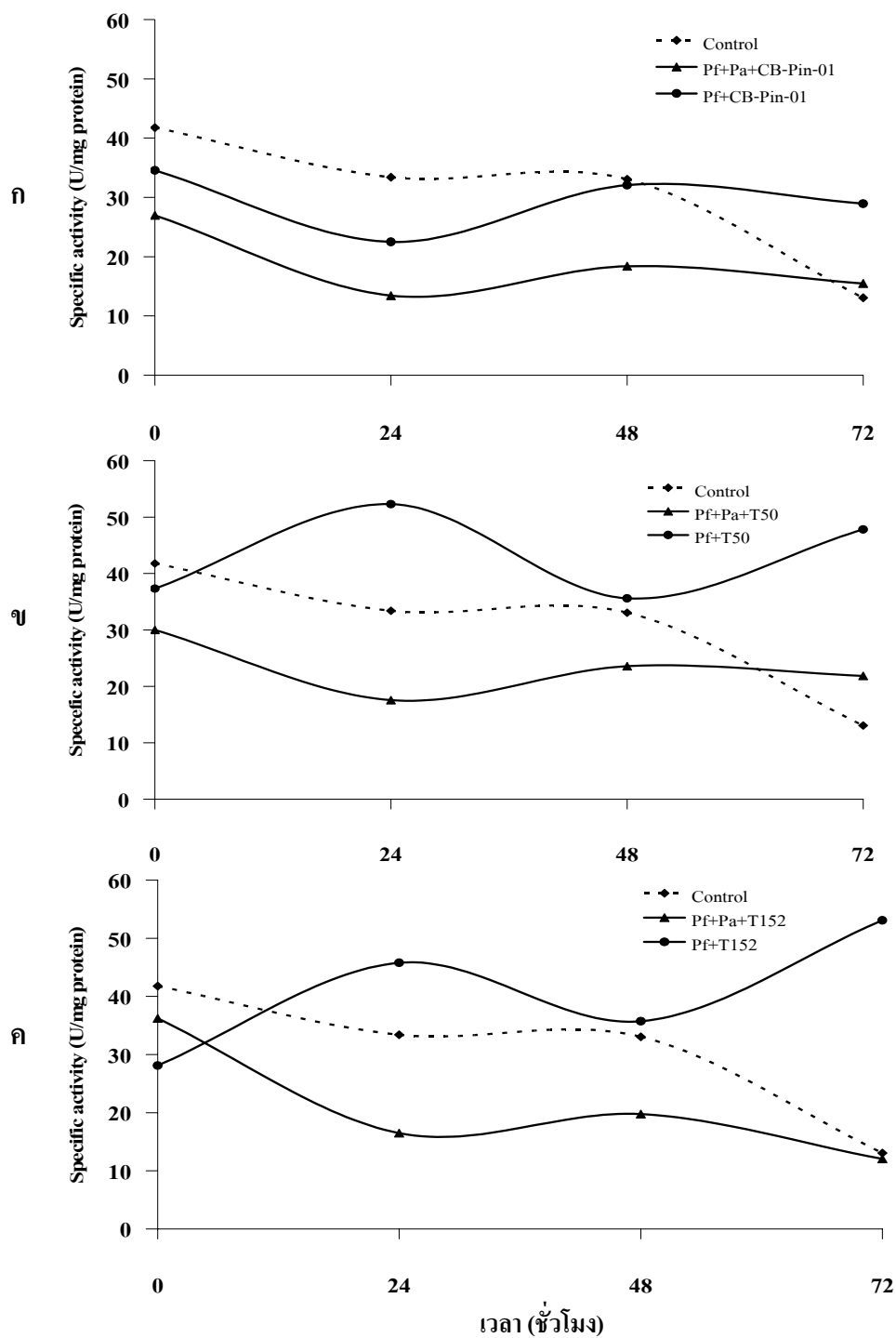
ทั้งนี้การเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ β -1,3-glucanase และเอนไซม์ chitinase อาจจะไปต้านทานการรุกรานของเชื้อรา *P. fuligena* เป็นผลให้สามารถลดความรุนแรงของโรคดำใบมะเขือเทศได้ และเมื่อมีการปลูกเชื้อรา *P. aphanidermatum* ลงไปด้วย ทำให้ปริมาณของเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 T50 และ T152 และเชื้อรา *P. aphanidermatum* เพิ่มมากขึ้นซึ่งอาจเกิดจากการที่เชื้อราทั้งสอง พยายามแข่งขันกัน เพื่อครอบครองพื้นที่ราก นั้นแสดงให้เห็นว่าเชื้อรา *T. harzianum* สามารถชักนำให้เกิดความต้านทานได้ เช่นเดียวกับรายงานของ Harman (2004b) ที่ว่า เชื้อรา *T. harzianum* T22 มีความสามารถในการเข้าครอบครองราก รวมทั้งส่งเสริมการเจริญเติบโตของรากข้าวโพด Mo17 และกระตุ้นให้ข้าวโพดสร้างเอนไซม์ chitinase และ β -1,3-glucanase เพิ่มขึ้น ทั้งยังลดการเกิดโรคแอนแทรคโนสได้ด้วย

นอกจากนี้ จากงานทดลองของเกศนรี (2544) พบว่า เอนไซม์ chitinase และ β -1,3-glucanase ถูกกระตุ้นด้วยสารละลายไคโตแซนและทำงานร่วมกันแบบ Synergistic เพื่อป้องกันตนเองจากเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคแอนแทรคโนส โดยพบเอนไซม์ทั้งสองชนิดและมีการสะสมของ

สาร Phytoalexin เพิ่มขึ้นเพื่อต่อต้านการบุกรุกของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุ
โรคแอนแทรคโนสในองุ่น

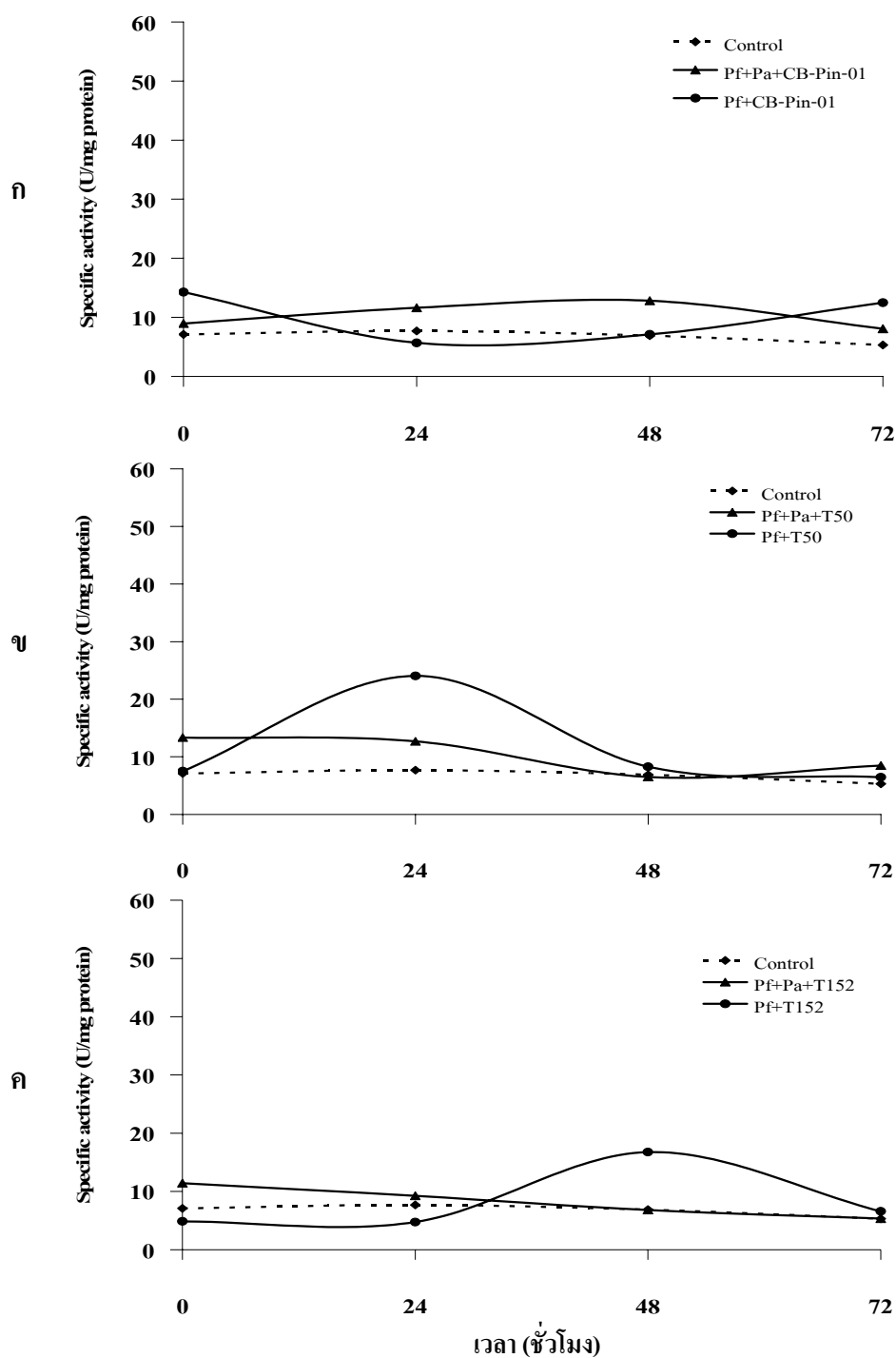


ภาพที่ 8 แสดงค่า specific activity ของเอนไซม์ ในใบและยอดมะเขือเทศ เมื่อพ่นด้วยเชื้อรา *Pseudocercospora fuligena* (Pf) และปลุกเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* (Pa)
 ก. เอนไซม์ β -1,3-glucanase
 ข. เอนไซม์ chitinase



ภาพที่ 9 แสดงค่า specific activity ของเอนไซม์ β -1,3-glucanase ในใบและขอดมะเขือเทศ เมื่อ ฟันด้วยเชื้อรา *Pseudocercospora fuligena* (Pf) และรดด้วยเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ร่วมกับการปลูกเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* (Pa)

ก. เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01
 ข. เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T50
 ค. เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T152



ภาพที่ 10 แสดงค่า specific activity ของเอนไซม์ chitinase ในใบและยอดมะเขือเทศ เมื่อพ่นด้วยเชื้อรา *Pseudocercospora fuligena* (Pf) และโรคด้วยเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ร่วมกับการปลูกเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* (Pa)
 ก. เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01
 ข. เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T50
 ค. เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T152

จากการทดลองที่ผ่านมา มีรายงานการใช้เชื้อรา *Trichoderma* spp. ชักนำให้เกิดความต้านทานต่อโรคพืชทั้งใบเลี้ยงคู่และใบเลี้ยงเดี่ยว โดยพบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับ ความต้านทานของพืชเพิ่มมากขึ้น ในขณะที่อาการ โรคลดลง ความต้านทานที่เกิดขึ้นนี้อาจเป็นทั้งความต้านทานเฉพาะที่และความต้านทานทั้งต้น รวมทั้งมี proteinaceous หรือ elicitors ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำอย่างน้อย 3 จำพวกที่ได้จาก *Trichoderma* spp. เป็นตัวชักนำให้พืชเกิดความต้านทานได้ Yedidia *et al.* (2000) ได้รายงานว่า *T. asperellum* สายพันธุ์ T-203 ที่สามารถเข้าครอบครองรากแตงกวาได้นั้นมีการสร้าง PR – protein ขึ้นมา ภายใน 2 – 3 วันแล้วปฏิกิริยาก็หยุดลง แต่ยังสามารถตรวจพบ PR – protein และสารอื่นๆ ที่มีคุณสมบัติต่อต้านเชื้อสาเหตุโรคพืชได้ในทุกส่วนของพืช รวมทั้งในใบพืชด้วย จากการทดลองในครั้งนี้ร่วมกับงานวิจัยที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่า *Trichoderma* spp. มีความสามารถในการควบคุมโดยชีววิธีด้วยการยับยั้งการงอกของสปอร์ การยับยั้งการเจริญของเส้นใย ตลอดจนการเป็นปรสิตต่อเส้นใยเชื้อโรคโดยตรงและทำให้การพัฒนาของ germ tube ผิดปกติไป (ขวัญเนตร และคณะ, 2548) สามารถติดตามและครอบครองรากพืชได้สูง สามารถเพิ่มการเจริญของรากและยอดพืชได้ ทั้งนี้อาจเป็นผลจากความสามารถของเชื้อในการกระตุ้นพืชโดยตรงให้พืชต้านทานต่อโรค (จิระเดช, 2549; Intana, 2003; Yedidia *et al.*, 2001) นอกจากนี้แล้วยังสามารถช่วยในการสลายแร่ธาตุอาหารในดินวัสดุปลูกหรือแม้แต่ในสารละลายธาตุอาหาร ทำให้พืชสามารถดูดสารอาหารไปใช้ได้มากขึ้น (จิระเดช, 2549 แพรทอง, 2549; Altomare *et al.*, 1999; Yedidia *et al.*, 2001)

สรุป

จากการศึกษาเชื้อรา *Trichoderma harzianum* เพื่อลดการเกิดโรคราใบดำของมะเขือเทศในเรือนพลาสติก พบว่า การทดลองมีการติดเชื้อตามธรรมชาติ (natural infection) ก่อนข้างสูง และการปนสปอร์แขวนลอยของ *Pseudocercospora fuligena* (inoculated control) สามารถเพิ่มความรุนแรงของโรคได้ 12.23 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในกรรมวิธีที่ปนเฉพาะเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 หรือ T50 ในสภาพที่เกิดการแพร่ระบาดของโรคตามธรรมชาติ พบว่าทั้งสองสายพันธุ์สามารถลดการเกิดโรคราใบดำได้ 45.55 และ 47.81 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การฉีดพ่นเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01, T50, T152 ในกรรมวิธีการปลูกเชื้อรา *P. fuligena* ช่วยลดความรุนแรงของโรคราใบดำของมะเขือเทศไม่แตกต่างจากการฉีดพ่นสารเคมี mancozeb

การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ β -1,3-glucanase และ chitinase ในใบและยอดของกล้ามะเขือเทศที่ได้รับการกระตุ้นโดยเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01, T50, T152 มีค่า specific activity ของเอนไซม์ β -1,3-glucanase และ chitinase เพิ่มขึ้นในช่วง 0-10 วัน

การศึกษาเชื้อรา *P. fuligena* ต่อการลดการเกิดโรคและ specific activity ของเอนไซม์ พบว่า เมื่อปนสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *P. fuligena* ที่ความเข้มข้น 1.0×10^4 สปอร์/มิลลิลิตร มีความรุนแรงของโรคเพิ่มขึ้น 12.60 เปอร์เซ็นต์ และมี specific activity ของเอนไซม์ β -1,3-glucanase และ chitinase เพิ่มขึ้นสูง

การทดสอบการชักนำให้มะเขือเทศต้านทานต่อโรคราใบดำด้วยการรดด้วยสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01, T50 และ T152 ร่วมกับการปลูกเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* สาเหตุของโรครากเน่าของมะเขือเทศ พบว่า สามารถลดการเกิดโรคราใบดำสาเหตุจากเชื้อรา *P. fuligena* ได้ 18.70 – 67.05 เปอร์เซ็นต์ โดยมี specific activity ของเอนไซม์ β -1,3-glucanase และ chitinase เพิ่มขึ้นสูง เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01, T50 และ T152 สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของมะเขือเทศได้ โดยมีน้ำหนักและความสูงของต้น ปริมาณของน้ำหนักราก ความยาวราก และผลผลิตของมะเขือเทศเพิ่มมากขึ้น

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- เกศนรี จงโชติศิริกุล. 2544. การศึกษาผลของไคโตแซนต่อเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคแอนแทรกโนส และการชักนำการสร้างเอนไซม์ไคตินเนสและเบต้า-1,3-กลูคาเนสในองุ่น. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- ขวัญเนตร หินอ่อน, วรรณวิไล อินทนู, จิระเดช แจ่มสว่าง และ วิชชุพร จันทร์ศรี. 2548. การฉีดพ่นเชื้อรา *Trichoderma harzianum* เพื่อลดการเกิดโรคราดำของใบมะเขือเทศ ซึ่งเกิดจากเชื้อรา *Pseudocercospora fuligena* ภายใต้สภาพเรือนพลาสติก. น. 35 ใน บทคัดย่อ การประชุมวิชาการอรัทกาแห่งชาติ ครั้งที่ 7. โรงแรมโลตัสปางสวนแก้ว, เชียงใหม่.
- จิระเดช แจ่มสว่าง. 2549. การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม. 323น.
- _____ และ วรรณวิไล อินทนู. 2542. การใช้เชื้อราไตรโคเดอร์มาควบคุมโรคพืชโครงการเกษตรสู่ชาติ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม. 90 น.
- _____ และ วรรณวิไล อินทนู. 2545. การผลิตเชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดสดด้วยเทคนิคอย่างง่ายเพื่อใช้ควบคุมโรคเน่าระดับดินของถั่วฝักยาวที่เกิดจากเชื้อรา *Sclerotium rolfsii*. น. 114-122. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการสาขาพืช ครั้งที่ 40, 4-7 กุมภาพันธ์ 2545. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- ณรงค์ สิงห์บุระอุดม. 2529. เอกสารการสอนความสัมพันธ์ทางพันธุศาสตร์ระหว่างพืชกับเชื้อโรคกลไกและพันธุกรรมการเกิดโรคพืช ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 251 น.

ดวงใจ เสรีไพบูลย์ทรัพย์. 2548. การตรวจสอบเอนไซม์บางชนิดในต้นแตงกวาที่ได้รับการชักนำด้วยเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ให้ต้านทานต่อเชื้อรา *Pythium aphanidermatum*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

แพรทอง ละมุล. 2549. การใช้เชื้อรา *Trichoderma harzianum* ในการควบคุมโรครากเน่าของผักกาดหอมที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์ สาเหตุจากเชื้อรา *Pythium aphanidermatum*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ลาวัลย์ วีระพงษ์, แสงมณี ชิงดวง และสุอาภา ดิสถาพร. 2540. เอกสารวิชาการเชื้อราไตรโคเดออร์มา. กรมส่งเสริมการเกษตร และกรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ 37 น.

ศุภลักษณ์ ฮอกะวัด. 2536. โรคผักตระกูลพริกและมะเขือเทศ. สำนักพิมพ์ หจก. ขอนแก่นการพิมพ์, ขอนแก่น. 249 น.

ศศิธร วุฒิวาณิชย์. 2545. โรคของผักและการควบคุมโรค. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 173 น.

ศักดิ์ สุนทรสิงห์. 2537. โรคผักและการป้องกันกำจัด. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 198 น.

Achuo, E. A., K. Audenaert, H. Meziane and M. Höfte. 2004. The salicylic acid-dependent defence pathway is effective against different pathogens in tomato and tobacco. **Plant Pathol.** 53: 65–72.

Ahmed, A. S, C. P. Sanchez and M. E., Candela. 2000. Evaluation of induction of systemic resistance in pepper plants (*Capsicum annuum*) to *Phytophthora capsici* using *Trichoderma harzianum* and its relation with capsidiol accumulation. **Eur. J. Plant Pathol.** 106: 817–824.

- Altomare, C., W. A. Norvell, T. Björkman, and G. E. Harman. 1999. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growthpromoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. **Appl. Environ. Microbiol.** 65: 2926-2933.
- Attitalla, I. H., P. Johnson, S. Brishammar and P. Quintanilla. 2001. Systemic Resistance to Fusarium Wilt in Tomato Induced by *Phytophthora cryptogea*. **J. Phytopathol.** 149: 373-380.
- Benhamou N. and R. R. Be'langer. 1998. Benzothiadiazole-Mediated Induced Resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in Tomato. **Plant Physiol.** 118: 1203 – 1212.
- CAB international. 2003. **Crop Protection Compendium 2003 edition.** (Computer Program). CAB international. Wallingford, UK.
- Chamswarn, C., P. Leeprasert and S. Chantana - o - tan. 1985. Population assessments of soil – borne plant pathogens, *Sclerotium rolfsii*, *Pythium* spp., *Phytophthora* spp. in soil and their correlation to disease incidence on intercropping system. **In Cropping Programmes KU – ACNARP.** Fact. of Agri., Kasetsart Univ., Bangkok, Thailand. 80 p.
- Cooper, A. J. 1979. **The ABC of NFT: Nutrient Film Technique.** Grower Books, London, UK. 170 p.
- De Cal, A. S. Pascual And P. Melgarejo. 1997. Involvement of resistance induction by *Penicillium oxalicum* in the biocontrol of tomato wilt. **Plant Physiol.** 46: 72-79.
- _____, R. Garcia-Lepe And P. Melgarejo. 2000. Induced resistance by *Penicillium oxalicum* against *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* : Histological studies of infected and induced tomato stems. **Phytopathology.** 90: 260-268.

- De Meyer, G., J. Bigirimana, Y. Elad, and M. Hofte. 1998. Induced systemic resistance in *Trichoderma harzianum* T39 biocontrol of *Botrytis cinerea*. **Eur. J. Plant Pathol.** 104: 279–286.
- Duijff, B. J. D. Pouhair, C. Olivain, C. Alabouvette and P. Lemanceau. 1998. Implication of systemic induced resistance in the suppression of fusarium wilt of tomato by *Pseudomonas fluorescens* WCS 417 and by non-pathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47. **Eur. J. Plant Pathol.** 104: 903-910.
- Fuch, J-G, Y. Moëgne-Loccoz and G. Défago. 1997. Non-Pathogenic *Fusarium oxysporum* strain Fo47 induce resistance to *Fusarium* wilt in tomato. **Plants Dis.** 81: 492-496.
- Fujisawa, Y. and H. Masago. 1975. Investigation on the selective medium for isolation of *Phytophthora* spp. (Abstr.) **Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.** 41: 267.
- Ginnakis, C., C. S. Bucheli, K. G. M. Skene, S. P. Robinson and S. N. Scott. 1998. Chitinase and beta-1,3-glucanase in grapevine leaves : a possible defense against powdery mildew infection. **Aus. J. of Grape and Wine Res.** 4 : 14 – 22.
- Harman, G. E., C. R. Howell, A. Viterbo, I. Chet and M. Lorito. 2004a. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Rev. Microbiol.** 2: 43-56.
- _____, R. Petzoldt, A. Comis and J. Chen. 2004b. Interactions between *Trichoderma harzianum* strain T22 and maize inbred line Mo17 and effects of this interaction on diseases caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. **Phytopathology.** 94: 147-153.

- Hartman, G. L., S. C. Chen and T. C. Wang. 1991. Cultural studies and pathogenicity of *Pseudocercospora fuligena*, the causal agent of black leaf mold of tomato. **Plant Dis.** 75(10): 1060-1063.
- _____, and T. C. Wang. 1992. Black leaf mold development and its effect on tomato yield. **Plant Dis.** 76(5): 462-465.
- Howell, C. R., L. E. Hanson, R. D. Stipanovic and L. S. Puckhaber. 2000. Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*. **Phytopathology.** 90: 248–252.
- Hrmova, M. and G. B. Fincher. 1993. Purification and properties of three (1,3) –beta-D-glucanase isoenzymes from young leaves of barley (*Hordeum vulgare*). **Biochem. J.** 289 : 453 – 461.
- Intana, W., C. Chamswarng, W. Intanoo, K. Sivasithaparam and C. Hongprayoon. 2003. Potential of *Trichoderma harzianum* isolates for growth promotion and biocontrol of damping-off of cucumber. **Thai J. Agric. Sci.** 36(36): 305-318.
- _____, 2003. **Selection and development of *Trichoderma* sp. for high glucanase, antifungal metabolite producing and plant growth promoting isolates for biological control of cucumber damping -off caused by *Pythium* spp.** Ph.D. Thesis. Kasetsart University
- Johnson, L.F. and E. A. Curl. 1972. Methods for research on the ecology of soilborne Plant Pathogens. **Burgess Publishing Company**, Minnesota. 247 p.
- Joosten, M. H. A. J. and P. J. M. Dewit. 1989. Identification of several pathogenesis – related protein in tomato leaves inoculated with *Cladosporium fulvum* as 1,3 –beta-glucanase and chitinase. **Plant Physiol.** 89 : 945 – 951.

- Kloepper J, S. Tuzun and J. Kuc. 1992. Proposed definitions related to induced disease resistance. **Biocon. Sci. techno.** 2: 347-349.
- Ko, T.-S., S. Lee, S. C. Schaefer and S. C. S. Korban. 2003. Characterization of tissue-specific and developmentally regulated β -1, 3 glucanase gene family in *Prunus persica*. **Plant Physiol. Biochem.** 41: 955-963.
- Leah, R., H. Tommerup, I. Svendsen and J. Mundy. 1991. Biochemical and Molecular characterization of three barley seed proteins with antifungal properties. **J. Biol. Chem.** 226 : 1564 – 1573.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. **J. Biol. Chem.** 193: 265-275.
- Mathieu, H. A., J. Joosten and J. G. M. De Pierrewit. 1989. Identification of several pathogenesis-related proteins in tomato leaves inoculated with *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulva*) as 1,3-beta-glucanases and chitinases. **Plant Physiol.** 89: 945-951.
- Mauch, F. 1989. Antifungal hydrolases in pea tissue : I Purification and characterization of two chitinase and two 1,3-beta-glucanases differentially regulated during development and in response to fungal infection. **Plant Physiol.** 87 : 325 – 333.
- Migheli Q., L. Gonzalez-Gandelas, A. Camponogara and D. Ramon-Vidal. 1998. Transformants of *Trichoderma longibarchitum* over expressing the β -1,4 endoglucanase gene eg 11 show enhanced biocontrol of *Pythium ultimum* on cucumber. **Phytopathology.** 88: 673-677.
- Mohanty, U. N. and N. N. Mohanty. 1955. Cercospora leaf mold of tomato. **Sci. Cult.** 21 : 269 - 270.

- Nelson, N. 1944. A Photometric adaptation of the Somogyi Method for the determination of glucose. **J. Biol. Chem.** 153: 375-380.
- Papavizas, G. E. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium* : biology, ecology and potential for biocontrol. **Ann. Rev. Phytopathol.** 23: 23-54.
- Picard K., M Ponchet, J. Blein, P. Rey, Y. Tirilly, and N. Benhamou. 2000. Oligandrin, A Proteinaceous Molecule Produced by the Mycoparasite *Pythium oligandrum* Induces Resistance to *Phytophthora parasitica* Infection in Tomato Plants. **Plant Physiol.** 124: 379–395.
- Rattarasarn, M. 2003. **Defense responses of *Hevea brasiliensis* against zoospores and Elicitin from *Phytophthora palmivora*.** Ph.D. Thesis. Prince of Songkla, Songkla Uni., Thailand.
- Rifai, M. A. 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. **Mycol. Papers.** C. M. I. 116: 1-56.
- Seaman, A. 2003. Efficacy of OMRI-approved products for tomato foliar disease control. **New York State Integrated Pest Management Program publication.** 129: 164–167.
- Sherf, A. F. and A. A. Macneb. 1986. **Cercospora leaf mold**, pp. 668-669. *in* Vegetable Diseases and Their Control. John Wiley & Sons, New York.
- Silva, H. S. A, R. S. Romeiro, R. C. Filho, J. L. A. Pereira, E. S. G. Mizubuti and A. Mounter. 2004a. Induction of Systemic Resistance by *Bacillus cereus* Against Tomato Foliar Diseases Under Field Conditions. **J. Phytopathol.** 152: 371–375.

- _____, R. S. Romeiro, D. Macagnan, J. B. A Halfeld-Vieira L. A. Pereira, E. and A. Mounter. 2004b. Rhizobacterial induction of systemic resistance in tomato plants: non-specific protection and increase in enzyme activities. **Biological Control**. 29: 288–295.
- Veit, S., J. M. Wörle, T. Nürnberger., W. Koch and H. U. Seitz. 2001. A novel protein elicitor (PaNie) from *Pythium aphanidermatum* induces multiple defense response in carrot, arabidopsis, and tobacco. **Plant physiol.** 127: 832-841.
- Wang, T. C., G. L. Hartman, W. H. Hsieh and L. L. Black. 1995. Reaction of solanaceous species to *Pseudocercospora fuligena*, the causal agent of tomato black leaf mold. **Plant Dis.** 79 (7): 661-665.
- Whipps, J. M. 2001. Microbial interaction and biocontrol in the rhizosphere. **J. Exper. Bot.** 52: 487-511.
- Yamada S. 1951. New disease of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) caused by *Cercospora* sp. **Ann. Phytopathol Soc Jap.** 15: 13-18
- Yedidia, I., N. Benhamou and I. Chet. 1999. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. **Appl. Environ. Microbiol.** 65: 1061–1070.
- _____, N. Benhamou, Y. Kapulnik and I. Chet. 2000. Induction and accumulation of PR protein activity during early stages of root colonization by the mycoparasite *Trichoderma harzianum* strain T-203. **Plant Physiol. Biochem.** 38: 863–873.
- _____, A. K. Srivastva, Y. Kapulnik, and I. Chet. 2001. Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. **Plant Soil** 235: 235-242.

Zehnder, G., C. Yao, J. F. Murphy, E. R. Sikora and J. Kloepper. 2000. Induction of resistance in tomato against cucumber mosaic cucumovirus by plant growth-promoting rhizobacteria. **Biocontrol**. 45: 127-137.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์และการผลิตเชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดสด

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์และการผลิตเชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดสด

PDA (Potato Dextrose Agar)

Distilled water	1000 มิลลิลิตร
Potato	1.0 กิโลกรัม
Agar	12.0 กรัม
Dextrose	20 กรัม

Martin's Medium (Johnson and Curl, 1972)

KH_2PO_4	1	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5	กรัม
Bacto Peptone	5	กรัม
Dextrose	10	กรัม
Rose bengal	0.032	กรัม
Agar	12	กรัม
Water	1	ลิตร
Streptomycin	1	กรัม

Rose bengal ใส่ก่อนที่จะนำอาหารไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอน้ำเท่ากับ 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เติม Streptomycin ก่อนที่จะเทอาหาร Martin's Medium ที่อุณหภูมิ 40-50 องศาเซลเซียส

modified BNPR (Fujisawa and Masago, 1975)

Mycostatin (100,000 units)	0.5 มิลลิลิตร*
Ampicillin	0.5 กรัม*
Benlate (50 w.p.)	20.0 มิลลิกรัม*
PCNB (75 w.p.)	25.0 มิลลิกรัม*
Rifampicin	10.0 มิลลิกรัม*
Rose Bengal	5.0 มิลลิกรัม**
Distilled water	1000 มิลลิลิตร

PDA (basal medium) : BNPR, 9:1

* เติมหหลังจาก Autoclave

** เป็นสูตรที่ได้รับการปรับปรุงจาก Chamswarnng *et al.* (1985) โดยการเพิ่ม rose bengal ลงไปในอาหาร

Water Agar (WA 0.1%)

Distilled water	1000 มิลลิลิตร
Agar	1.0 กรัม

การผลิตเชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดสด**อุปกรณ์**

- เชื้อรา *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01, T-50 และ T-152 ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA
- เครื่อง Autoclave
- ถังพลาสติกทนร้อน (8 x 12 นิ้ว)
- เครื่องชั่ง
- ปลายข้าว 100 กรัม ต่อน้ำ 50 ml
- Cork borer
- คอขวดพลาสติก
- สำลี, ขางวง

วิธีการ

- ตักปลายข้าว 100 กรัม ใส่ถุงพลาสติกเติมน้ำ 50 ml
- นึ่งที่ความดันไอน้ำเท่ากับ 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา

20 นาที

- ใช้ Cork borer เจาะเชื้อแต่ละสายพันธุ์ นำมาใส่ลงถุงข้าวที่นึ่งจนเย็นแล้วถุงละ 3-5 ชิ้น
- เขย่าให้หัวเชื้อกระจายทั่วถุง
- กดข้าวในถุงให้แผ่กระจาย ดึงบริเวณกลางถุงให้มีอากาศเข้า
- บ่มเชื้อ 2 วัน ในบริเวณที่อากาศไม่ร้อน ให้ได้รับแสงสว่าง 6-10 ชั่วโมงต่อวัน
- เมื่อครบ 2 วัน บีบขยัก่อนข้าวให้แตก บ่มเชื้อต่อ 4-5 วัน

การเตรียมน้ำปุ๋ยเพื่อรดต้นมะเขือเทศที่ใช้ในการทดสอบ

สูตรสารละลายธาตุอาหาร

ดัดแปลงจาก Cooper (1979) โดยอาจารย์ยังยุทธ เกียมไชยศรี (2546)

Stock A

ส่วนผสม

Calcium nitrate	1120 กรัม
เหล็ก EDDHA	100 กรัม
น้ำ	5 ลิตร

Stock B

ส่วนผสม

Potassium nitrate	590 กรัม
Magnesium sulfate	590 กรัม
Potassium phosphate(mono)	270 กรัม
Nicspray	30 กรัม
น้ำ	5 ลิตร

* นำสารละลายธาตุอาหาร Stock A และ Stock B มาอย่างละ 200 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน (ควรคนไปด้วยขณะทำการผสม)

** ปรับ pH ของน้ำปุ๋ยให้อยู่ประมาณ 5.5-6 โดยเติมกรด HCl 50% ลงไป ครั้งละ 1 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข
สารเคมีและวิธีวิเคราะห์ทางเคมี

สารเคมีและวิธีวิเคราะห์ทางเคมี

1. การเตรียม 0.1 M Sodium acetate buffer pH 5.5

เตรียมโดยผสมสาร A จำนวน 14.8 มิลลิลิตร กับสาร B จำนวน 35.2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อ ให้ได้ 200 มิลลิลิตร และปรับค่า pH ด้วย 6N HCl ให้ได้ pH เท่ากับ 5.5

สาร A

0.2 M Glacial acetic acid	11.55	กรัม
Distill water	1	ลิตร

สาร B

0.2 M Sodium acetate	27.2	กรัม
Distill water	1	ลิตร

การเตรียม 0.05 M Sodium acetate buffer pH 5.5 โดยทำการเจือจาง 0.1 M Sodium acetate buffer pH 5.5 ในน้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อในอัตราส่วน 1 : 1 โดยปริมาตร และปรับค่า pH ด้วย 6N HCl ให้ได้ pH เท่ากับ 5.5

2. การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน

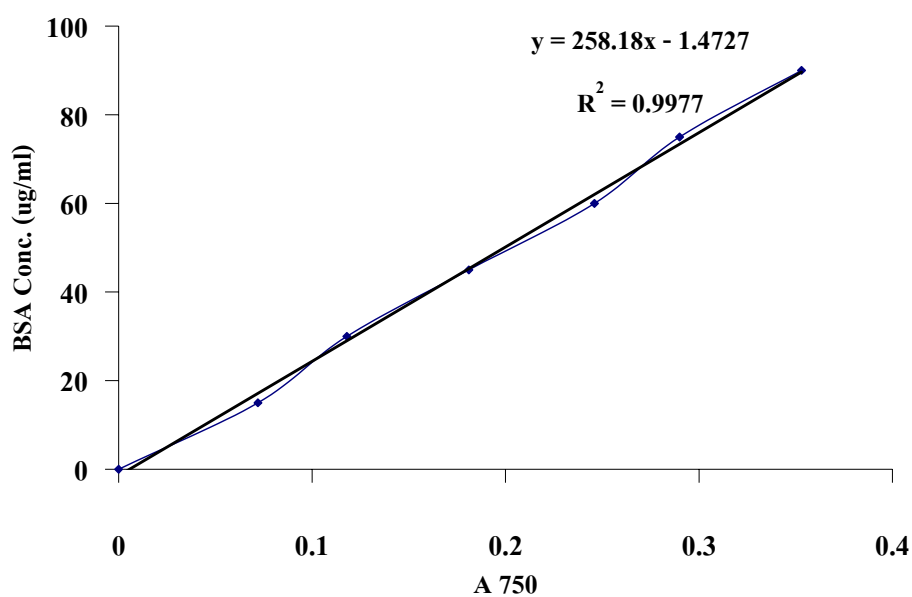
2.1 สารเคมีที่ใช้

สารละลาย Alkaline Copper

เตรียมโดยผสม 4 % (W/V) Na_2CO_3 , 0.2 M NaOH, 1 % (W/V) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ และ 2% (W/V) Sodium Potassium tartrate ในอัตราส่วน 49:49:1:1 โดยเตรียมก่อนนำไปใช้ทุกครั้ง

2.2 การเตรียม standard curve ของ Bovine Serum Albumin (BSA)

เตรียมสารละลาย BSA ที่ความเข้มข้น 15, 30, 45, 60, 75, และ 90 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในน้ำกลั่นบรรจุหลอดทดสอบหลอดละ 0.5 มิลลิลิตร โดยใช้ น้ำกลั่นเป็นตัวเปรียบเทียบ เติมสารละลาย Alkaline Copper จำนวน 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่ อุณหภูมิห้องเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 10 นาที เติมสารละลาย folin-ciocalteu phenol reagent (Lowry *et al.* 1951) เตรียมโดยเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร จำนวน 0.25 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์ วัดการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร (Absorbance 750 nm = A 750 nm) เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างโปรตีนและค่า A 750



ภาพผนวกที่ 1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ BSA กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร (A 750 nm)

3. การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กลูโคส) โดยดัดแปลงวิธีวิเคราะห์ของ Nelson Somogyi (Nelson, 1944)

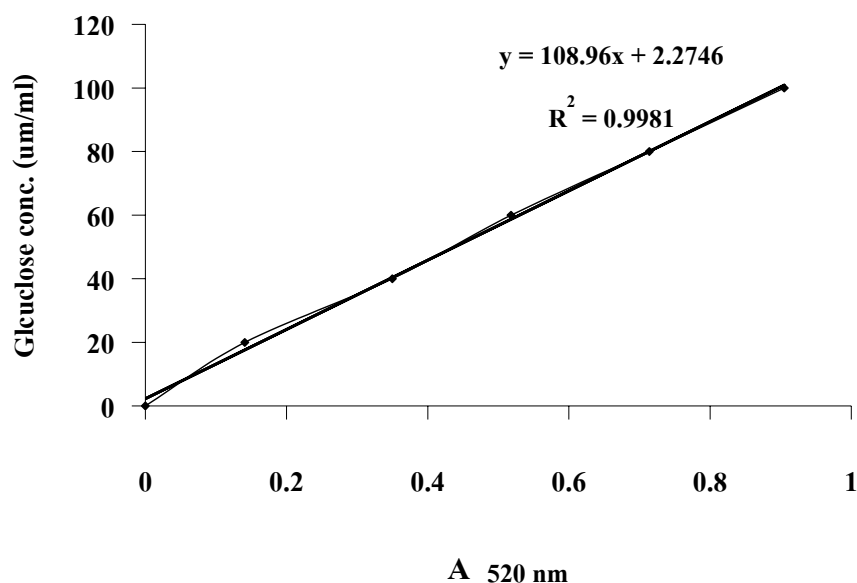
3.1 สารเคมีที่ใช้

3.1.1 copper reagent เตรียมสารละลาย Cu reagent (Alkaline Copper Solution) โดยละลาย Na_2CO_3 24 กรัมในน้ำ 250 มิลลิลิตร ให้เป็นสารละลายแล้วเติม Potassium Sodium Tartrate 12 กรัม คนให้ละลายจึงเติมสารละลาย $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ความเข้มข้น 10% ลงไป 40 มิลลิลิตร (เวลาเติมค่อยๆ เติมลงไปช้าๆ และคนไปด้วย) จากนั้นจึงเติม NaHCO_3 16 กรัม คนให้ละลาย เติมสารละลาย Na_2SO_4 (Na_2SO_4 180 กรัมในน้ำ 500 มิลลิลิตร) ปรับปริมาตรให้ได้เท่ากับ 1 ลิตร เก็บในที่มืด 1 สัปดาห์ กรองเอาตะกอนออก

3.1.2 Nelson reagent เตรียมสารละลาย Nelson reagent (Nelson Solution) โดยละลาย ammonium molybdate 50 กรัมในน้ำ 900 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 42 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย sodium arsenate (sodium arsenate 6 กรัมในน้ำ 50 มิลลิลิตร) แล้วปรับปริมาตรให้ได้เท่ากับ 1 ลิตร เก็บในที่มืด 1 คืน กรองเอาตะกอนออก

3.2 การเตรียม standard curve ของน้ำตาลกลูโคส

เตรียมสารละลายกลูโคสเข้มข้น 20, 40, 60, 80, 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในน้ำกลั่นบรรจุในหลอดทดสอบหลอดละ 1 มิลลิลิตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเปรียบเทียบ เติม copper reagent 1 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 20 นาที ทำให้เย็นโดยทันที โดยแช่น้ำเย็นจัด เติม Nelson reagent 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที เติมน้ำ 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร (Absorbance 520 nm = A 520 nm) เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณน้ำตาลและค่า A 520



ภาพผนวกที่ 2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกลูโคสกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร (A 520 nm)

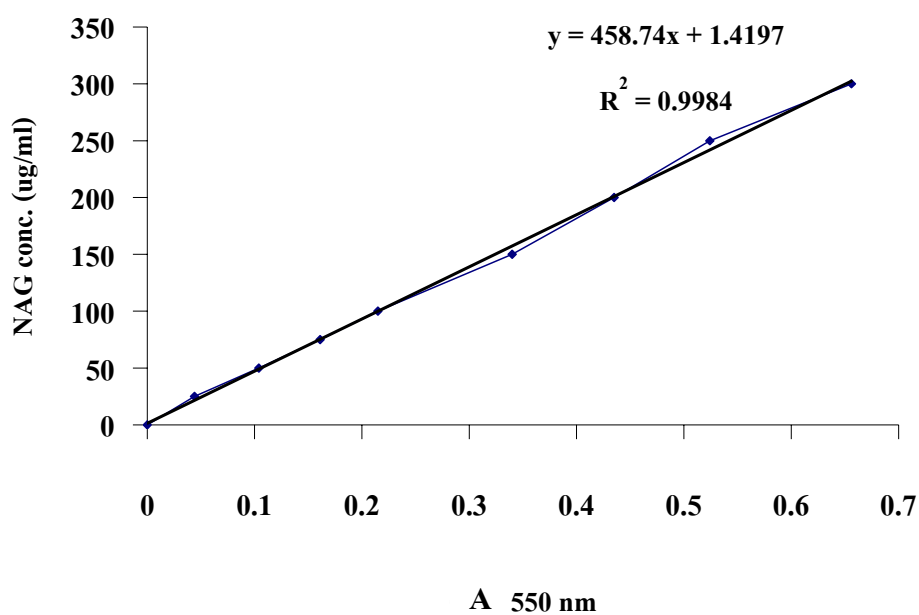
4. การวิเคราะห์ปริมาณ N-acetylglucosamine

4.1 สารเคมีที่ใช้ เหมือนกับสารเคมีที่ใช้หาปริมาณน้ำตาล glucose (ข้อ 3.1.1 และ 3.1.2)

4.2 การเตรียม standard curve ของ N-acetylglucosamine

4.2.1 เตรียมสารละลาย N-acetylglucosamine เข้มข้น 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 และ 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในน้ำกลั่น บรรจุในหลอดทดสอบหลอดละ 1 มิลลิลิตร โดยใช้ น้ำกลั่นเป็นตัวเปรียบเทียบ เติม copper reagent 1 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ทำเย็นทันทีโดยแช่น้ำเย็นจัด เติม nelson reagent 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมน้ำ 9.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร (Absorbance 550 nm = A 550 nm) เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณ N-acetylglucosamine และค่า A 550

4.2.2 การวิเคราะห์ตัวอย่าง ใช้ปิเปตต์ดูดตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลอย่างเหมาะสมจำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดสอบ แล้วนำไปวิเคราะห์ตามวิธีการเตรียมกราฟมาตรฐานของน้ำตาล N-acetylglucosamine ข้างต้น คำนวณปริมาณน้ำตาลในตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานนั้น

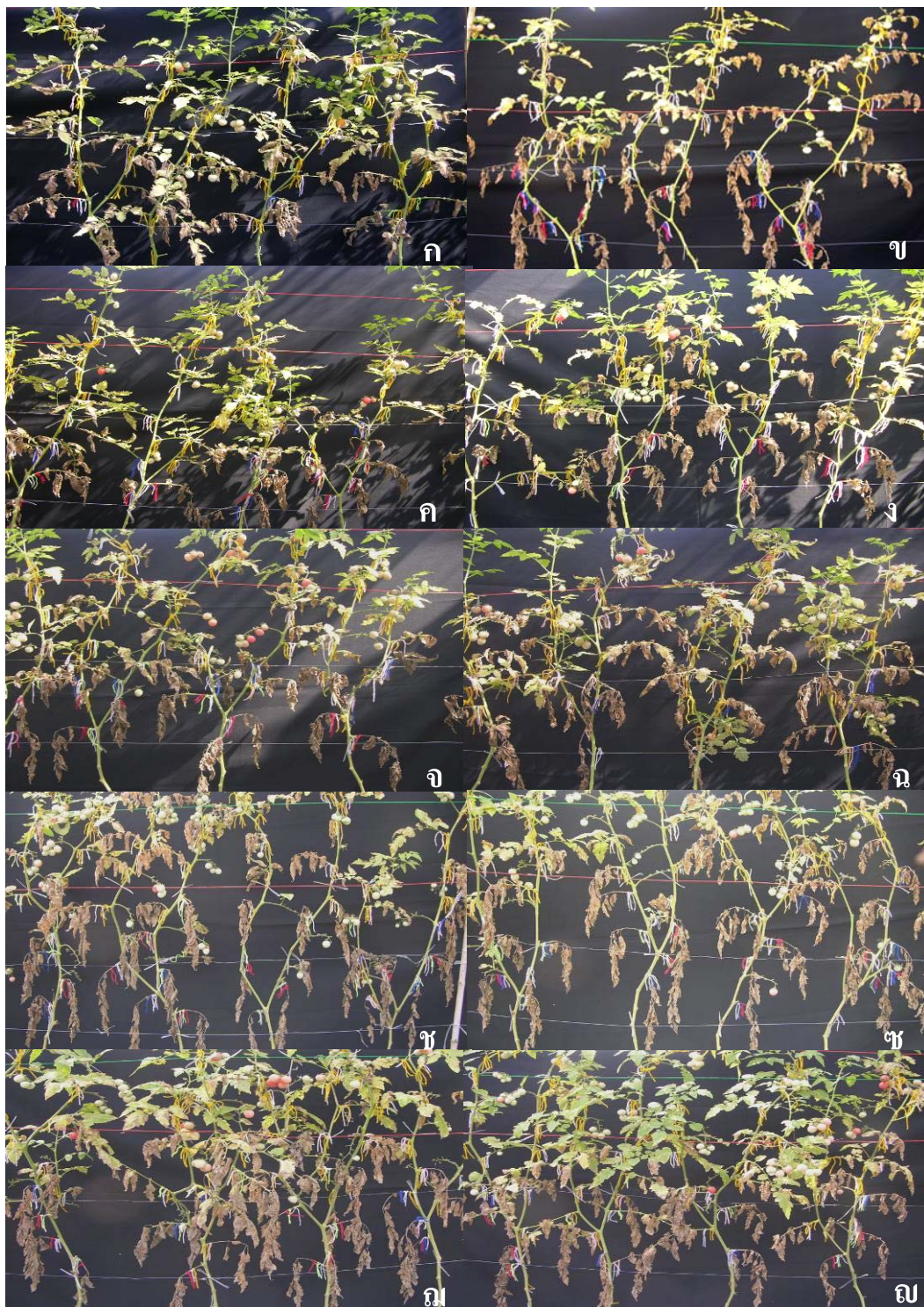


ภาพผนวกที่ 3 แสดงกราฟมาตรฐานระหว่าง N-acetylglucosamine กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร (A 550 nm)

ภาคผนวก ค
ภาพประกอบผลการทดลอง

ภาพผนวกที่ 4 ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ต่างๆ หลังจกการรดสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *T. harzianum* ร่วมกับการปลูกเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* และชักนำให้ต้านทานต่อโรคราใบดำของมะเขือเทศสาเหตุจากเชื้อรา *Pseudocercospora fuligena* (ในโรงเรือน)

- ก. กรรมวิธีควบคุมโดยใส่น้ำนิ่งมาเชื้อ (control)
- ข. กรรมวิธีที่ปนเชื้อรา *P. fuligena*
- ค. กรรมวิธีที่ปลูกเชื้อรา *P. aphanidermatum* และปนเชื้อรา *P. fuligena*
- ง. กรรมวิธีที่รดสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB Pin 01 และปลูกเชื้อรา *P. aphanidermatum*
- จ. กรรมวิธีที่รดสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T50 และปลูกเชื้อรา *P. aphanidermatum*
- ฉ. กรรมวิธีที่รดสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T152 และปลูกเชื้อรา *P. aphanidermatum*
- ช. กรรมวิธีที่รดสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB Pin 01
- ซ. กรรมวิธีที่รดสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T50
- ฌ. กรรมวิธีที่รดสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T152
- ณ. กรรมวิธีที่ปนเชื้อรา *P. fuligena* และสารเคมี mancozeb

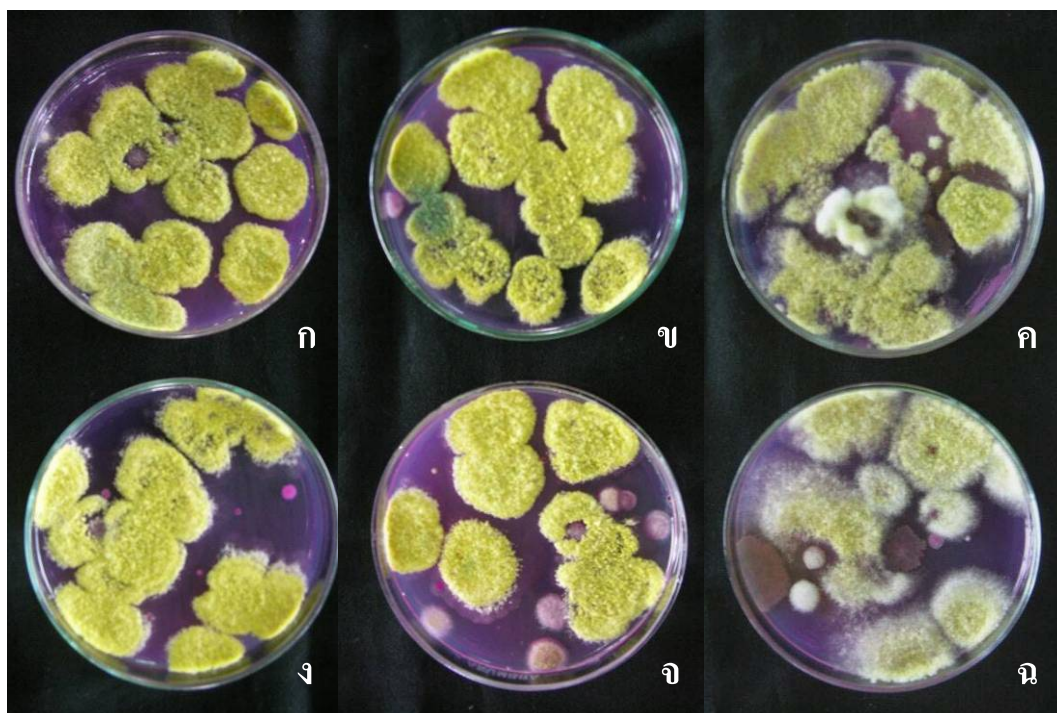


ภาพผนวกที่ 5 ขนาดและความยาวของราก หลังจากการรดสปอร์แขวนลอยเชื้อรา

Trichoderma harzianum ร่วมกับการปลูกเชื้อรา *Pythium aphanidermatum*
และชักนำให้ต้านทานต่อโรคราใบดำของมะเขือเทศสาเหตุจากเชื้อรา
Pseudocercospora fuligena

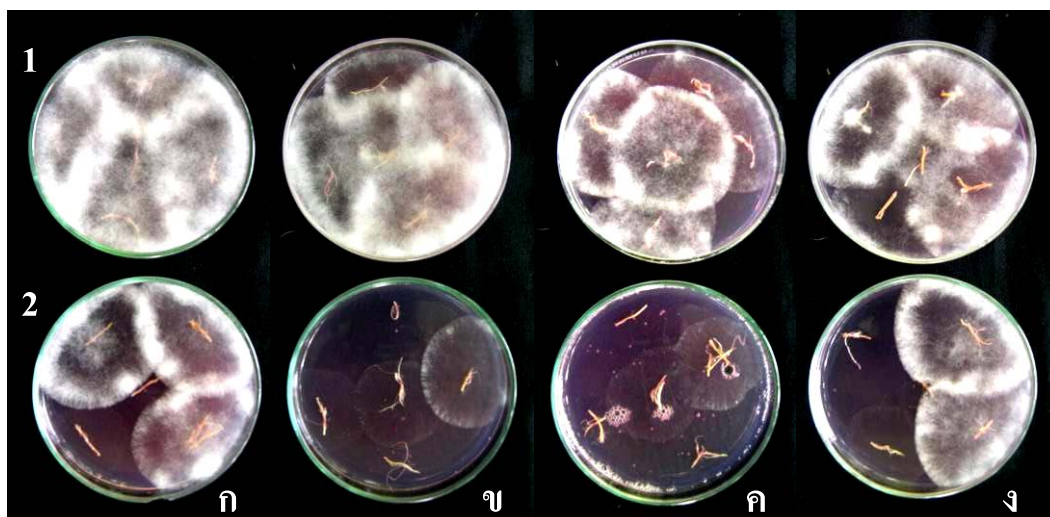
- ก. กรรมวิธีควบคุมโดยใส่น้ำนิ่งฆ่าเชื้อ (control)
- ข. กรรมวิธีที่ปนเชื้อรา *P. fuligena*
- ค. กรรมวิธีที่ปลูกเชื้อรา *P. aphanidermatum* และปนเชื้อรา *P. fuligena*
- ง. กรรมวิธีที่รดสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB Pin 01
และปลูกเชื้อรา *P. aphanidermatum*
- จ. กรรมวิธีที่รดสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T50
และปลูกเชื้อรา *P. aphanidermatum*
- ฉ. กรรมวิธีที่รดสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T152
และปลูกเชื้อรา *P. aphanidermatum*
- ช. กรรมวิธีที่รดสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB Pin 01
- ซ. กรรมวิธีที่รดสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T50
- ฌ. กรรมวิธีที่รดสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T152
- ฎ. กรรมวิธีที่ปนเชื้อรา *P. fuligena* และสารเคมี mancozeb





ภาพผนวกที่ 6 การเจริญของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ต่างๆ ในวัสดุปลูก หลังจากการทำ dilution spread plate ที่ระดับความเข้มข้น 10^4 หน่วยโคโลนี(CFU) / กรัม

- ก. กรรมวิธีที่รดสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB Pin 01 ร่วมกับการปลูกเชื้อรา *Pythium aphanidermatum*
- ข. กรรมวิธีที่รดสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T50 ร่วมกับการปลูกเชื้อรา *P. aphanidermatum*
- ค. กรรมวิธีที่รดสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T152 ร่วมกับการปลูกเชื้อรา *P. aphanidermatum*
- ง. กรรมวิธีที่รดสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB Pin 01
- จ. กรรมวิธีที่รดสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T50
- ฉ. กรรมวิธีที่รดสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T152



ภาพผนวกที่ 7 การเจริญของเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* ที่เจริญครอบครองรากมะเขือเทศ หลังจาก ล้างด้วยน้ำนิ่งฆ่าเชื้อ (1) และล้างด้วยสารละลาย 0.525 % sodium hydrochlorite (2)

- ก. กรรมวิธีที่ปลูกเชื้อรา *P. aphanidermatum* และพ่นเชื้อรา *Pseudocercospora fuligena*
- ข. กรรมวิธีที่รดสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ CB Pin 01 ร่วมกับปลูกเชื้อรา *P. aphanidermatum* และพ่นเชื้อรา *P. fuligena*
- ค. กรรมวิธีที่รดสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T50 ร่วมกับปลูกเชื้อรา *P. aphanidermatum* และพ่นเชื้อรา *P. fuligena*
- ง. กรรมวิธีที่รดสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T152 ร่วมกับปลูกเชื้อรา *P. aphanidermatum* และพ่นเชื้อรา *P. fuligena*

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นายขวัญเนตร หินอ่อน
วัน เดือน ปี ที่เกิด	10 สิงหาคม 2523
สถานที่เกิด	อ. อุ้มทอง จ. สุพรรณบุรี
ประวัติการศึกษา	วท. บ. (วิทยาศาสตร์ทั่วไป) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140 (พ.ศ. 2546)
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์เทคโนโลยี ชีวภาพเกษตรโดยงบประมาณของโครงการย่อยบัณฑิต ศึกษาและวิจัยสาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรภายใต้ โครงการบัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขาวิทยาศาสตร์และ เทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยา เขตกำแพงแสน จังหวัด นครปฐม 73140 (พ.ศ. 2546- 2549)