การตรวจเอกสาร

1. ภูมิต้านทานของพืช

โดยธรรมชาติพืชมีการตอบสนองต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคพืชและแมลง รวมไปถึงศัตรูพืชชนิดอื่นๆ โดยระบบภูมิต้านทานของพืชจะคล้ายกับระบบภูมิต้านของสัตว์ เมื่อพืชถูกทำลายโดยศัตรูพืช พืชจะเปลี่ยนแปลงตัวเองเพื่อต่อต้าน แต่พืชจะไม่มีระบบการจดจำลักษณะของเชื้อสาเหตุ ดังนั้นการต้านทานของพืชจะเป็นแบบกว้าง (broad spectrum) (Barker, 2000) โดยยีนที่ควบคุมการต้านทานเรียก *R* gene (resistance gene) (Parker, 2000) ซึ่งยีนนี้จะไม่แสดงออกในสภาพปกติจนกว่าจะได้รับการกระตุ้นจากสิ่งแปลกปลอม เช่น เมื่อเซลล์พืชถูกทำลายโดยเชื้อสาเหตุโรค เซลล์ที่อยู่บริเวณรอบๆ นั้นจะมีการเปลี่ยนแปลงเพื่อป้องกันตัวโดยการสร้างสารลิกนินและซูเบอรินขึ้น ทำให้ผนังเซลล์ที่อยู่บริเวณรอบๆ นั้น หนาและแข็งแรงขึ้น (lignifications) เพื่อป้องกันไม่ให้เชื้อลุกลามไปยังเซลล์อื่นหรือสร้างสาร phytoalexins ขึ้นเพื่อต้านทานเชื้อสาเหตุโรค ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความสามารถในการตอบสนองต่อการเข้ารุกรานของเชื้อโรค ซึ่งในพืชแต่ละต้นนั้นมีไม่เท่ากัน ถึงแม้ส่วนใหญ่ของการเข้ารุกรานพืชนั้น จะเป็นชัยชนะของเชื้อโรคแต่ก็มีบ่อยครั้งที่พืชปลอดภัยจากการถูกรุกราน กระบวนการป้องกันตัวของพืชจะถูกเปิดใช้งานแทบทุกครั้งที่พืชรู้ตัวว่ามีสิ่งแปลกปลอมรุกล้ำเข้ามา และกระบวนการนี้อาจแบ่งได้เป็น 3 ขั้นตอนตามช่วงเวลาและรูปแบบของกระบวนการ (Kombrink and Somissich, 1995) ดังนี้

ขั้นที่ 1 เป็นการตอบสนองเฉพาะที่ (local) ซึ่งพืชจะยับยั้งเชื้อโรคโดยตรง เมื่อเชื้อเข้าสู่เซลล์พืช เซลล์พืชนั้นจะเกิดการถ่ายเทกระแสประจุ (ion fluxes) ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ และเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นอย่างรุนแรง (oxidative birst) เป็นผลให้เกิดการสังเคราะห์สารจำพวก active oxygen species ขึ้นมาหลายชนิด เช่น H_2O_2 peroxidase เป็นต้น (Atkinson, 1993; Mehdy, 1994; Neuenschwander et al., 1995) ส่งผลให้เกิดการตายของเซลล์ที่เรียกว่า hypersensitive response (HR) มีลักษณะคือเซลล์พืชจะตายอย่างรวดเร็ว เพื่อเป็นการกักเชื้อโรคให้อยู่เฉพาะบริเวณที่เนื้อเยื่อตายนั้นไม่สามารถรุกลามไปยังบริเวณข้างเคียงได้ (Klement, 1982) HR ถือว่าเป็นกระบวนการหลักอย่างหนึ่งในการป้องกันตัวเองจากเชื้อโรค ซึ่งสาร active oxygen species ที่ถูกสร้างขึ้นนี้ยังมีบทบาทที่สำคัญต่อระบบการป้องกันตัวของพืช สารเหล่านี้สามารถเป็นสารฆ่าเชื้อโรคได้โดยตรง หรือไปกระตุ้นให้เกิดกระบวนการอื่นๆ ตามมา เช่น การเพิ่มปริมาณของ H_2O_2 จะไปชักนำให้เกิดการแลกเปลี่ยนโปรตีนระหว่างเซลล์พืช ส่งเสริมให้เกิดการสังเคราะห์ลิกนิน (lignin) ขึ้นที่ผนังเซลล์ ทำให้ผนังเซลล์แข็งแรงขึ้นเพื่อป้องกันไม่ให้เชื้อลุกลาม (Dixon and Harrison, 1992)

ขั้นที่ 2 เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นจากการสั่งการของยีนเฉพาะที่ (local) ซึ่งจะเกิดเฉพาะบริเวณที่ถูกเชื้อโรคเข้าทำลาย ให้มีการสร้างสาร secondary metabolite ขึ้นมาหลายชนิดสารเหล่านี้สารเหล่านี้บางชนิดคุณสมบัติเป็นสารฆ่าเชื้อโรค เช่นสาร phytoalexin ที่เป็นพิษกับเชื้อโรคและศัตรูพืช

อื่นๆ บางชนิดทำหน้าที่เป็นสารที่เกี่ยวข้องกับการส่งเสริมการทำงานของระบบป้องกันตัวของพืช (Darvill and Albersheim, 1994) และยังมีการสร้างสารลิกนิน (lignin) และชั้นของ polysaccharide ขึ้นที่ผนังเซลล์ทำให้ผนังเซลล์หนาและเหนียวขึ้น แม้กระทั่งการป้องกันทางอ้อมอื่นๆ เช่นสร้างไข (wax) ขึ้นบนผิวใบทำให้เชื้อสาเหตุเข้าทำลายได้ยากขึ้น (Hahn et al., 1989)

ขั้นที่ 3 เป็นการตอบสนองทั้งระบบของต้นพืช (systemic) เป็นผลต่อเนื่องจากกระบวนการต่างๆ ในขั้นที่ 1 และ 2 ซึ่งจะเกี่ยวโยงกับโปรตีนที่พืชสร้างขึ้นเนื่องจากการตอบสนองต่อเชื้อโรค เรียกว่า "pathogenesis related protein" หรือ PR-protein ถูกสร้างจากยีนทั่วทั้งต้นพืชที่ถูกกระตุ้นการทำงานโดยกลไกที่ซับซ้อนและโปรตีนเหล่านี้จะไปทำหน้าที่ในการยับยั้งเชื้อโรคซึ่งปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นนี้เรียกว่า systemic acquire resistance (SAR) มักพบเสมอเมื่อพืชถูกรุกรานโดยเชื้อโรค (Hahlbrock et al.,1995; Somssich and Hahlbrock, 1998)

2. Systemic acquire resistance (SAR)

กลไกเปิดการทำงานของระบบป้องกันตัวของพืชเริ่มต้นจากกระบวนการจดจำ (recognition) ระหว่างพืชกับเชื้อโรคซึ่งทำให้การต่อต้านเฉพาะที่ในขั้นที่ 1 เริ่มทำงาน เมื่อเกิด HR ขึ้น หรือเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นอย่างรุนแรง (oxidative birst) เซลล์พืชในบริเวณนั้นจะสังเคราะห์ กรดซาลิไซลิค (salicylic acid; SA) ขึ้นมาซึ่ง SA นี้จะไปกระตุ้นให้ PR gene สร้าง mRNA ขึ้นมาปริมาณมากเพื่อนำไปสังเคราะห์ PR-protein (Silverman et al., 2005)

สารส่งสัญญาณถือเป็นตัวกลางสำคัญที่ทำให้เกิดกระบวนการต้านทานโรคโดยทำหน้าที่เป็นตัวนำสัญญาณเมื่อเกิดการรุกรานของเชื้อโรค แมลง หรือแม้กระทั่งการเกิดภาวะแห้งแล้ง หนาวเย็น หรือความเครียดทางสภาพแวดล้อมอื่นๆ พืชจะสร้างสารควบคุมการเจริญเติบโต (growth regulator)จำพวก SA, jasmonic acid (JA) และ ethylene เป็นต้น สารต่างๆ เหล่านี้ล้วนมีบทบาทต่อการเป็นสารนำสัญญาณของพืช (Wang and Shao, 2006) การเกิด SAR จำเป็นต้องมี SA ทำหน้าที่เป็นสัญญาณลำเลียงไปยังส่วนต่างๆ ของพืชเพื่อเปิดการทำงานของยีน ซึ่ง 69% ของ SA ที่พบทั้งหมดถูกสร้างและลำเลียงจากส่วนของพืชที่ถูกเชื้อโรคเข้ารุกราน (Shulaev et al., 1994) Gaffney และคณะ (1993) ทำการทดสอบหาความสัมพันธ์ระหว่าง SA และ SAR โดยการถ่ายยีน *nahG* เข้าสู่ต้นยาสูบและ *Arabidopsis* ซึ่ง *nahG* นี้ทำหน้าที่สร้างสาร salicylate hydroxylase โดยสารนี้จะไปทำลาย SA และเมื่อปลูกเชื้อโรคพืชให้แก่ต้นพืชทั้งสองชนิด พบว่าพืชมีการสร้าง SA ในปริมาณที่น้อยมาก และไม่พบการแสดงออกของ PR gene

Salicylic acid (SA) มีบทบาทสำคัญในการสร้างความต้านทานทั้งในส่วนเฉพาะที่และทั้งระบบ หลังจากที่พืชถูกเข้าทำลายโดยเชื้อสาเหตุโรคโดยเฉพาะเชื้อซึ่งก่อให้เกิดอาการเนื้อเยื่อตาย (necrosis) พืชจะสร้าง SA ขึ้นมาในปริมาณมากจากกระบวนการ Shikimate pathway และ phenylpropanoid pathway และจะถูกลำเลียงไปยังส่วนต่าง ๆ ของพืชทาง phloem แต่หลังจากเกิด SAR แล้ว SA ที่ต้องใช้จะถูกสร้างจาก isochorismate pathway (Hurtado, 2004)

Jasmonic acid (JA) เป็นสารสัญญาณอีกชนิดหนึ่งที่พืชสร้างขึ้นเมื่อถูกแมลงศัตรูพืชเข้าทำลายซึ่งการทำให้เกิดการแตกแยกของผนังเซลล์พืช หรือการเกิดบาดแผลต่างๆ linolinic acid จะถูกสร้างขึ้นจากชั้น lipid membrane ของเยื่อหุ้มเซลล์จากนั้นจะถูกถูกเปลี่ยนให้เป็น JA ซึ่งจะถูกลำเลียงไปยังส่วนต่างๆ ของพืชทาง phloem จากนั้น JA จะไปกระตุ้นการทำงานของ *R* gene (Wasternack et al., 2006)

3. Pathogenesis Related protein (PR-protein)

PR-protein ถูกพบครั้งแรกโดย Van Loon และ Van Kamen, (1970) ซึ่งพบโปรตีนเหล่านี้ถูกสร้างขึ้นในปริมาณมากในยาสูบหลังจากถูกเชื้อไวรัส tobacco mosaic virus (TMV) เข้าทำลายใบยาสูบ โปรตีนเหล่านี้สามารถจำแนกออกได้มากกว่า 40 ชนิด แบ่งออกเป็นกลุ่ม (family) ได้อย่างน้อย 14 กลุ่ม ซึ่งบางชนิดยังจำแนกไม่ได้ การจำแนกโดยเทคนิคทางชีวโมเลกุล (molecular) ทำให้พบว่า PR-protein เป็นสารประเภทต่างๆ และควบคุมโดยยีนที่ต่างกัน (Van Loon and Van Strien, 1999)

PR-protein มีขนาดโมเลกุลที่หลากหลาย สามารถสกัดและเก็บรักษาได้ภายใต้สภาพอุณหภูมิต่ำ (< 3°C) พบได้ทุกส่วนของต้นพืช ทั้ง ใบลำต้น ผล หรือดอก (Van Loon, 1999) และหน้าที่หลากหลาย สันนิษฐานว่าหลายชนิดเป็นสารที่ทำให้พืชสามารถต่อต้านเชื้อสาเหตุโรคพืชได้ บางครั้งจะถูกสร้างเมื่อได้รับปัจจัยที่จำเพาะเจาะจง และในส่วนของพืชที่จำเพาะเจาะจงเท่านั้น การแสดงออกของ PR-protein ถูกควบคุมโดยยีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการป้องกันตัวเองของพืช PR-protein จึงเสมือนเป็นเครื่องหมายของปรากฏการณ์ SAR PR-protein มี 2 แบบ คือ acidic PR-protein และ basic PR-protein ซึ่ง acidic PR-protein นี้พบว่ามีการสะสมมากในช่องว่างระหว่างเซลล์พืช (intercellular) ภายใน apoplast และภายในเซลล์พืช (intracellular) ในส่วนของแวคคิวโอล (vacuole) (Buchel and Linthorst, 1999) ส่วน basic PR-protein พบในส่วนของแวคคิวโอล (vacuole) (Bol et al.,1990) PR-protein ทั้งสองแบบมีหน้าที่คล้ายกันแต่แตกต่างกันที่ขนาดของโมเลกุลและโครงสร้างของกรดอะมิโน เนื่องจากยีนที่สร้าง PR-protein ทั้งสองแบบตอบสนองต่อสารสัญญาณต่างกันโดย acidic PR-protein จะสนองต่อ SA ส่วน basic PR-protein สนองต่อ JA สำหรับ PR-protein นั้นพบได้ทุกส่วนของต้นพืช ทั้ง ใบลำต้น ผล หรือดอก (Van Loon, 1999) แต่ที่ใบจะมีการสะสมมากกว่าส่วนอื่นๆ โดยจะพบ PR-protein ประมาณ 5-10% ของโปรตีนที่พบที่ใบ PR-protein สามารถถูกกระตุ้นให้สร้างขึ้นได้โดยตัวกระตุ้นหลายชนิด ไม่ว่าจะเป็น เชื้อโรค แมลง ไส้เดือนฝอย สัตว์ที่กินพืช แม้กระทั่งสารต่างๆ ที่ได้จากเชื้อโรคก็สามารถเป็นตัวกระตุ้นได้ เช่น chitin และ β-1,3-glucan ที่ได้จากผนังเซลล์เชื้อรา โปรตีน ไกลโคโปรตีน หรือ เปปไทด์ ต่างๆ ที่เชื้อราปลดปล่อยออกมา (Zhou 1999; Kombrink et al., 2001; Edvera et al., 2002) หรือโปรตีนที่สร้างจาก avirulence gene ของเชื้อราและแบคทีเรีย ก็มามารถเป็นตัวกระตุ้น PR-protein ได้ (Staskawicz et al., 1995; Hennin et al., 2001) นอกจากนี้สารเคมีต่างๆ เช่น SA, JA, benzothiadiazole (BTH), mefenoxam เป็นต้น และ

ความเครียดเนื่องจากสิ่งแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ, ค่า pH, แสง UV ที่มีความเปลี่ยนแปลงในระดับวิกฤต สามารถไปกระตุ้นให้พืชสร้าง PR-protein ได้

จากการศึกษาของ Van Loon และคณะ (1994) พบว่า PR-protein 11 ใน 14 กลุ่ม คือ PR-1 ถึง PR-11 พบในยาสูบและมะเขือเทศโดยที่ PR-8 และ PR-10 ยังสามารถพบในแตงและผักชีฝรั่ง(parsley) ตามลำดับ และ PR-12, PR-13 และ PR-14 พบในผักกาดหัว, *Arabidopsis,* และ ข้าวบาร์เลย์ ตามลำดับ (Van Loon and Van Strien 1999) ซึ่ง PR-protein ที่ถูกสร้างขึ้นนี้มีบางชนิดที่เป็นเอนไซม์ ตัวอย่างเช่น chitinase และ β-1,3 glucanase (PR-3, PR-4, PR-8, PR-11 และ PR-2) ซึ่งทั้งสองชนิดนี้สามารถย่อยสลาย chitin และ β-1,3-glucan ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของเส้นใยเชื้อรา การที่พืชสามารถสร้างเอนไซม์เหล่านี้ขึ้นจะช่วยป้องกันไม่ให้เชื้อโรคทำความเสียหายให้แก่ต้นพืช

4. ลักษณะของเชื้อ *Trichoderma* spp.

Trichoderma spp. เป็นเชื้อราที่พบทั่วไปในดินและไม่พบว่ามีการเจริญบนพืชที่มีชีวิต จัดจำแนกอยู่ใน sub-division Deuteromycota, form-class Hyphomycetes, form-family Moniliaceae มี teleomorph (perfect stage) อยู่ใน genus *Hypocrea* ซึ่งเป็นเชื้อราใน Phylum Ascomycota, Order Hypocreales (Samuels, 1996) ลักษณะทาง anamorph (imperfect stage) ของเชื้อราชนิดนี้สร้างconidiophores มีสีจางหรือไม่มีสีแตกแขนงมากพบ phialides เกิดเดี่ยวๆ หรือเป็นกลุ่ม conidia (phialospore) เป็นแบบเซลล์เดียวรูปไข่ไม่มีสี เกิดเป็นกลุ่มเล็กๆ ที่ปลาย phialides โคโลนีสามารถเจริญบนอาหารเทียมได้อย่างรวดเร็ว ลักษณะของเส้นใยที่เจริญออกมาเริ่มแรกจะมีสีขาว เมื่อเชื้อรามีอายุมากขึ้นจะเปลี่ยนเป็นสีเขียวเข้ม เนื่องจากมีการสร้างสปอร์มากขึ้นก้านชูสปอร์จะแตกกิ่งก้านเป็นช่อ สปอร์ส่วนใหญ่จะมีสีเขียวมี 1 เซลล์เดียวรูปไข่ ผิวเรียบ หรือขรุขระเจริญออกมาจากส่วนปลายของเส้นใย มีขนาดเฉลี่ย 3.2 x 2.7ไมครอน สามารถเจริญ ได้อย่างรวดเร็ว chlamydospore จะเจริญระหว่างหรือปลายของเส้นใย มีลักษณะกลมใส เส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ย 6.9 ไมครอน (Homer et al., 1972) เชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่พบทั่วไปในดินสามารถที่จะเจริญแข่งขันกับเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 15-21 องศาเซลเซียส และสามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้ในที่มีอุณหภูมิเย็นจัดประมาณ 10-12 องศาเซลเซียส (Johnson et al.,1987) เชื้อรา *Trichoderma* spp. มีรายงานในการจัดจำแนกไว้โดย Domsch และคณะ (1980) ทั้งหมด 11 ชนิด (species) และ Rifai(1996) (อ้างตาม Samuels, 2001) ซึ่งได้จัดจำแนกเชื้อราสกุล *Trichoderma* spp. ออกเป็น 9 ชนิด โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้จากลักษณะของโคโลนี conidia และ conidiophore ปัจจุบันพบว่าเชื้อราชนิดนี้มีจำนวน 33 ชนิด (Samuels, 2001) เชื้อรา *Trichoderma* spp. เจริญได้ดีในดิน เศษซากพืช ซากสิ่งมีชีวิต รวมทั้งจุลินทรีย์และอินทรีย์วัตถุตามธรรมชาติ เชื้อบางสายพันธุ์สามารถเป็นปรสิต (parasite) โดยการพันรัดเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคพืชแล้วสร้างเอนไซม์ เช่น ไคติเนส (chitinase) เบตา-1,3-กลูคาเนส (β-1,3-glucanase) และเซลลูเลส (cellulase) ซึ่งมีคุณสมบัติในการย่อยสลายผนังเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืช

5. บทบาทของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการชักนำให้พืชสร้างความต้านทานโรค

เชื้อรา *Trichoderma* spp. บางสายพันธุ์อาศัยเพียงบริเวณรอบ ๆ รากพืช บางสายพันธุ์เข้าไปอยู่ร่วมกับรากพืชโดยการแทงเส้นใยเข้าไปในชั้นเซลล์ epidermis ชั้นที่ 1 หรือ 2 เท่านั้น และ *Trichoderma* spp. บางสายพันธุ์เป็นเชื้อ endophyte เข้าไปอาศัยในท่อลำเลียงน้ำของพืชโดยไม่ก่อความเสียหายแก่พืช ซึ่งมีความสำคัญกับกลไกการชักนำให้พืชสร้างความต้านทานโรค โดยเฉพาะการเป็น endophyte ของเชื้อจะมีผลมากกับการชักนำพืช ซึ่งพบว่าการที่เชื้อ *Trichoderma* spp. อาศัยและมีปฏิสัมพันธ์กับพืชอย่างใกล้ชิดทำให้เกิดการสร้างสารส่งสัญญาณ คือ SA และ JA ดังที่กล่าวไปแล้ว ทำให้พืชเกิดความต้านทานและเกิดอย่างต่อเนื่องตลอดเวลาที่เชื้ออาศัยอยู่กับพืช (Hurtado, 2004)

การครอบครองรากพืชของเชื้อ *Trichoderma* sp. ยังส่งผลต่อการกระบวนการ metabolism ของพืช เห็นได้จากการนำต้นกล้าข้าวโพดอายุ 5 วัน ซึ่งใส่เชื้อ *Trichoderma hazianum* T-22 ในการเพาะกล้า นำไปตรวจหาโปรตีนด้วยวิธี gel electrophoresis พบว่า มีประมาณ 40% ของโปรตีนที่พบเป็นชนิดเดียวกับที่พบในเชื้อ T-22 แต่กลับไม่พบในต้นกล้าข้าวโพดที่ไม่ได้ใส่เชื้อ T-22 แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *Trichoderma* spp. มีผลต่อกระบวนการ metabolism ของพืช และพบว่าเชื้อ T-22 กระตุ้นให้รากของต้นกล้าข้าวโพดยาวได้ถึง 25-27 cm. และน้ำหนักสดของต้นกล้าข้าวโพดที่ใส่เชื้อ T-22 ก็พบว่ามากกว่าต้นกล้าที่ไม่ได้ใส่ ทั้งยังช่วยให้พืชสามารถดูดซึมแร่ธาตุ ทองแดง, ฟอสฟอรัส, เหล็ก, แมงกานีส และ โซเดียม ได้ดีขึ้น (Harman et al., 2004) และในงานทดลองของ Yedidia และคณะ (2000) พบว่าหลังปลูกเชื้อรา *Trichoderma* T-203 แก่ต้นกล้าแตงเป็นเวลา 72 ชั่วโมงแล้วตัดเอาเนื้อเยื่อบริเวณรากมาย้อมด้วยสารเรืองแสงที่มีส่วนผสมของ 4-MU-(GlNAc) ซึ่งเป็น substrate ของเอนไซม์ chitinase เมื่อนำเนื้อเยื่อนั้นไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบว่าเนื้อเยื่อที่ปลูกเชื้อรา *Trichoderma* มีกิจกรรมของเอนไซม์ chitinase เกิดขึ้นเช่นเดียวกับการใช้ 2,6-dichloroisonicotinic acid เป็นตัวชักนำ และไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ในกรรมวิธีควบคุม (ใช้น้ำกลั่นแทนการปลูกเชื้อจริง)

Yedidia และคณะ (1999) ได้ศึกษาการชักนำให้แตงกวาเกิดความต้านทานโรคใบจุดเหลี่ยม ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *P. syringae* pv. *lachrymans* โดยปลูกเชื้อรา *T. harzianum* T-203 ที่รากของต้นกล้าแตงกวา เมื่อตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนเป็นเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง หลังจากปลูกเชื้อ พบเส้นใยของเชื้อรา *T. harzianum* T-203 เจริญอยู่บริเวณชั้น epidermis และบริเวณภายนอกของชั้น cortex อีกทั้งมีกิจกรรมของเอนไซม์ peroxidase และ chitinase เพิ่มมากขึ้นทั้งในรากและใบ นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถลดอาการของโรคได้มากถึง 80 เปอร์เซ็นต์ มีการสะสมของ mRNA ที่เป็นรหัสในการสังเคราะห์ PR-protein คือ ยีนที่สังเคราะห์ phenylalanine ammonia lyase (*PAL*) และ hydroxyperoxide lyase (*HPL*) และพบการสะสมของสาร secondary metabolite ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้มากถึง 6 เท่า ในห้องปฏิบัติการ (Yedidia et al., 2003) ส่วนรายงานของ Khan และคณะ (2004) ซึ่งได้ใช้เชื้อรา *T. hamatum* 382 ชักนำให้แตงกวาสร้างความต้านทานต่อโรค Phytophthora leaf blight ที่เกิดจากเชื้อรา

Phytopthora capsici โดยใส่เชื้อรา T382 ลงในวัสดุปลูก (ปุ๋ยคอกผสมกับพีทมอส) ก่อนการย้ายปลูกแตงกวา หลังจากปลูกเชื้อสาเหตุโรคที่ใบแตงกวา พบว่าสามารถชักนำให้แตงกวามีความต้านทานต่อโรคได้ โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 0.47 เปอร์เซ็นต์ ความรุนแรงของโรคเท่ากับ 1.6 โดยไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สารเคมี benzothiadiazole (BTH) ควบคุมโรค และพบว่าสามารถยับยั้งการเกิดโรค Botrytis blight ที่เกิดจากเชื้อรา *Botrutis cinerea* ของต้น บีโกเนีย ได้ในระดับเรือนทดลอง ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สารเคมี chlorothalonil นอกจากนี้ต้นบีโกเนียยังมีน้ำหนักแห้งเพิ่มมากขึ้น ออกดอกได้ดีขึ้นอีกด้วย (Horst et al., 2005) การชักนำให้พืชเกิดความต้านทานโดยเชื้อรา *Trichoderma* นั้น เกิดขึ้นได้อย่างต่อเนื่องและตลอดเวลาที่เชื้อราอาศัยอยู่กับรากพืช จากการศึกษาของ Stasz และคณะ (1988) พบว่าเมื่อนำเชื้อรา *T. harzianum* T22 ผสมลงไปในดินก่อนทำการย้ายปลูกมะเขือเทศ จะพบอาการของโรค late blight ปรากฏขึ้นบนใบในช่วง 90-120 วัน แต่เมื่อทำการทดลองมากกว่า 2 ปี อาการของโรคลดลงถึง 80 เปอร์เซ็นต์ ในดินที่ใส่เชื้อรา *T. harzianum* T22 ลงไปเปรียบเทียบกับดินที่ไม่ได้ใส่ ถึงแม้ว่าเชื้อรา *T. harzianum* T22 จะมีการเจริญเติบโตอยู่เฉพาะที่บริเวณรากก็ตาม อีกทั้งเชื้อรา *Trichoderma* แต่ละสายพันธุ์สามารถชักนำให้พืชทั้งใบเลี้ยงเดี่ยวและใบเลี้ยงคู่สร้างความต้านทานต่อโรคได้แตกต่างกันไป

เนื่องจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. มีคุณสมบัติในการครอบครองรากพืชได้ดี และยังเป็นเชื้อที่เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อสาเหตุโรคพืชอื่น ๆ จึงทำให้เชื้อรา *Trichoderma* spp. ได้นำไปศึกษามาก เช่น การทดลองของ Khan และคณะ (2004) ที่ได้ทดสอบประสิทธิภาพในการชักนำให้แตงกวา (*Cucumis sativas*) สร้างความต้านทานโรค Phytophthora crown rot ซึ่งเกิดจากเชื้อรา *Phytophthora capsici* และ leaf blight โดยใช้เชื้อ *T. hamatum* 382 (T382) ซึ่งได้ผลการทดลองที่แสดงให้เห็นว่าความรุนแรงของโรคลดลงเมื่อใช้ T382 ผสมลงในวัสดุปลูกก่อนที่จะย้ายต้นกล้า การศึกษาเหล่านี้แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของเชื้อราในดินที่เป็น biocontrol agent ที่นอกจากจะเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อสาเหตุโรคพืชโดยตรงแล้ว ยังสามารถกระตุ้นความต้านทานโรคที่เกิดกับใบได้อีกด้วย

6. รูปแบบในการเพิ่มปริมาณเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่นำมาใช้ประโยชน์

การเพิ่มปริมาณเชื้อ *Trichoderma* spp. ในวัสดุต่างๆ ให้เชื้อสามารถเจริญเติบโตและมีชีวิตอยู่รอดได้ดี Sivan et al (1984) พบว่าหากทำการผสม peat และ รำข้าวสาลี อัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร pH 5.5 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เชื้อสามารถมีชีวิตอยู่รอดได้นานถึง 1 ปี

มีการพัฒนารูปแบบการผลิตเชื้อ *Trichoderma* spp. ให้อยู่ในรูปผงเชื้อแห้ง ซึ่งจะนำไปใช้ประโยชน์ได้สะดวก มีความเหมาะสมในการเก็บรักษาและการขนส่ง จิระเดช และคณะ (2535) การใช้ผงไดอะตอมไมท์ (diatomite) เป็นสารพาหรือสารไม่ออกฤทธิ์ ในการเจือจางปริมาณของเชื้อของการผลิตผงเชื้อ การเตรียมหัวเชื้อมี 2 ขั้นตอน ประกอบด้วยการเลี้ยงเชื้อราไตรโคเดอร์มาบนเมล็ดข้าวฟ่างที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เมื่อเชื้อเจริญปกคลุมเมล็ดข้างฟ่างแล้ว (7-10 วัน) เก็บไว้ในตู้เย็น จนกว่าจะนำไปใช้เตรียมผงเชื้อต่อไป อีกวิธี คือ การเลี้ยงเชื้อบนส่วนผสมของกากน้ำตาลทราย (molass) ยีสต์สกัด (yeast extract)

5 กรัม ผสมน้ำ 1 ลิตร และผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อเป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบกำหนด 10-14 วัน กรองเอาเฉพาะสปอร์และเส้นใยของเชื้อรา ที่เรียกว่า “มวลชีวภาพ” แล้วเก็บไว้ในตู้เย็น สำหรับใช้เตรียมผงเชื้อต่อไป ขั้นตอนต่อไปคือ ผลิตผงเชื้อ โดยนำมวลชีวภาพของเชื้อที่ผลิตแล้วทั้ง 2 วิธีการมาบดให้ละเอียด แล้วสผมคลุกเคล้ากับผงไดอะตอมไมท์ในอัตราส่วน 1:1 และ 1:9 ตามลำดับ นำส่วนผสมที่ได้ไปแผ่เป็นแผ่นบางๆ ผึ่งให้แห้งในที่ร่ม ก่อนนำไปบดให้เป็นผงละเอียด แล้วใช้ตะแกรงร่อน บรรจุผงเชื้อที่ร่อนได้ในถุงพลาสติก เก็บไว้ในที่เย็น หรือนำเอาไปใช้ได้เลย