



การคัดกรองและระบุชนิดรา *Trichoderma* species ที่สร้างเอนไซม์ไคตินเนส

Screening and Identification of Chitinase-Producing *Trichoderma* species

โชษิตา อุบลสุข¹, ชนินันท์ พรสุริยา^{1*}

Chosita Ubolsuk¹, Chaninun Pornsuriya^{1*}

(Received: October 9, 2020; Revised: December 4, 2020; Accepted: December 7, 2020)

บทคัดย่อ

รา *Trichoderma* species ที่เป็นปฏิปักษ์ต่อราสาเหตุโรคพืชส่วนใหญ่สร้างเอนไซม์ไคตินเนส ซึ่งเป็นคุณสมบัติหนึ่งของการเป็นราปฏิปักษ์ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบการสร้างเอนไซม์ไคตินเนสของรา *Trichoderma* species และระบุชนิดของไอโซเลทที่สร้างเอนไซม์ไคตินเนสได้สูงสุด โดยทดสอบการสร้างเอนไซม์ไคตินเนสเบื้องต้นของรา *Trichoderma* species จำนวน 26 ไอโซเลทบนอาหารแข็ง chitinase detection medium pH 4.7 และวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์ไคตินเนสในน้ำเลี้ยงเชื้อ PDB โดยวิธีการหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้ด้วยวิธี DNS method ผลการทดลองพบว่า รา *Trichoderma* species สามารถสร้างเอนไซม์ไคตินเนสได้จำนวน 22 ไอโซเลท โดย T-GL7 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไคตินเนสสูงสุด 0.0082 U/ml การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ internal transcribed spacer (ITS) แสดงให้เห็นว่าไอโซเลท T-GL7 คือรา *T. reesei*

คำสำคัญ: *Trichoderma* species เอนไซม์ไคตินเนส DNS method

Abstract

Most of the antagonistic *Trichoderma* species produce chitinase against plant pathogenic fungi which is one of the antagonistic properties. Therefore, the aim of this research was to determine chitinase production of *Trichoderma* species and to identify the highest chitinase-producing isolate at the species level. Twenty-six isolates of *Trichoderma* species were primary tested for chitinase production on chitinase detection medium at pH 4.7. Chitinase activity was determined using DNS method by detection of reducing sugar in PDB culture filtrates. The results showed that 22 isolates of *Trichoderma* species produced chitinase

¹สาขาวิชานวัตกรรมและการจัดการ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ 90110

¹ Agricultural Innovation and Management Division, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University 90110

*Corresponding Author: chaninun.p@psu.ac.th



and the isolate T-GL7 showed the highest chitinase activity of 0.0082 U/ml. Confirmation by morphological characteristic and nucleotide sequence of the internal transcribed spacer (ITS) showed that the T-GL7 was *T. reesei*.

Keywords: *Trichoderma* species, Chitinase, DNS method

บทนำ

Trichoderma species เป็นราที่มีความสำคัญทางการเกษตร ซึ่งหลายชนิดมีคุณสมบัติเป็นราปฏิปักษ์ควบคุมราสาเหตุโรคพืช (Stewart & Hill, 2014) เช่น รา *T. harzianum* T-39 ควบคุมรา *Botrytis cinerea* สาเหตุโรคราสีเทาของมะเขือเทศ รา *T. virens* ควบคุมรา *Fusarium* spp., *Pythium* spp., *Rhizoctonia* spp. และ *Verticillium dahlia* สาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ โรครากและโคนเน่าของไม้ประดับ โรครากและโคนเน่าของถั่วเขียว และโรคเหี่ยวของมันฝรั่ง ตามลำดับ (Weindling, 1932; Grosch et al., 2007; Samuels & Hebbbar, 2015) โดยราชนิดนี้มีกลไกการควบคุมราสาเหตุโรคพืชหลายแบบ เช่น การแย่งแย่งแข่งขัน การทำลายชีวิต การชักนำให้พืชเกิดความต้านทานต่อโรค และการเป็นปรสิต (Harman, Howell, & Viterbo, 2004) ในกลไกการเป็นปรสิตและการทำลายชีวิต ราชนิดนี้สร้างเอนไซม์ไคตินเนส (chitinase) และเอนไซม์ 1,3-เบต้ากลูคาเนส (β -1,3-glucanase) ย่อยไคติน (chitin) และเบต้ากลูแคน (β -1,3-glucans) ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์รา

ไคตินเป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์ของราคิดเป็น 75% ของน้ำหนัก (Urbina-Salazar et al., 2018) ไคตินถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไคตินเนสได้ N-acetyl-D-glucosamine ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของน้ำตาลกลูโคส (Sahai & Manocha, 1993) โดยกลไกการเป็นปรสิต และการทำลายชีวิตของรา *Trichoderma* species พบว่าราชนิดนี้สามารถสร้างเอนไซม์ไคตินเนสในการทำลายผนังเซลล์ของราสาเหตุโรคพืช (Sivasithamparam & Ghisalberti, 1998) เช่น *T. harzianum* สามารถสร้างเอนไซม์ไคตินเนสทำลายผนังเซลล์รา *Sclerotium rolfii* สาเหตุโรครากและโคนเน่า และรา *T. viride* สร้างเอนไซม์ไคตินส่อย่อยไคตินซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์รา *Aspergillus niger* สาเหตุโรครากค้ำหลังการเก็บเกี่ยว *Fusarium oxysporum* สาเหตุโรคเหี่ยว และ *S. rolfii* สาเหตุโรครากและโคนเน่าในห้องปฏิบัติการ (El-Katatny, Somitsch, Robra, El-Katatny, & Gübitz, 2000; Khatri, Tiwari, & Bariya, 2017)



วัตถุประสงค์

เพื่อคัดกรองรา *Trichoderma* species ที่สร้างเอนไซม์ไคตินเนส และระบุชนิดของไอโซเลทที่สร้างเอนไซม์ไคตินเนสสูงสุด ซึ่งสามารถพัฒนาไปใช้เป็นราปฏิปักษ์ควบคุมราสาเหตุโรคพืชต่อไป

วิธีการวิจัย

1. การทดสอบการสร้างเอนไซม์ไคตินเนสเบื้องต้น

นำรา *Trichoderma* species ทั้งหมด 26 ไอโซเลท ได้แก่ T-GL1, T-GL2, T-GL3, T-GL4, T-GL6, T-GL7, T-GL8, T-GL9, T-GL13, T-GL15, T-GL16, T-GL17, T-GL18, T-GL19, T-GL20, T-GL23, T-GL24, T-GL26, T-GL29, T-GL30, T-GL31, T-GL33, T-GL34, T-GL36, T-GL39 และ T-GL40 ซึ่งแยกได้จากวัสดุเพาะเห็ด และเก็บรวบรวมไว้ที่ห้องปฏิบัติการเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ทางการเกษตร คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ มาทดสอบการสร้างเอนไซม์ไคตินเนสเบื้องต้นด้วยวิธี gel diffusion method บนอาหาร chitinase detection medium pH 4.7 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 กรัม $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3.0 กรัม KH_2PO_4 2.0 กรัม citric acid monohydrate 1.0 กรัม ผงวุ้น 15 กรัม Tween-80 200 ไมโครลิตร colloidal chitin 4.5 กรัม bromocresol purple 0.15 กรัม น้ำ 1 ลิตร) (Agrawal & Kotasthane, 2012) โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะบริเวณขอบโคโลนีของรา *Trichoderma* อายุ 3 วัน บนอาหาร potato dextrose agar (PDA) วางลงตรงกลางอาหาร chitinase detection medium บ่มที่อุณหภูมิห้อง ($25 - 30^\circ\text{C}$) สังเกตและบันทึกเวลาการเปลี่ยนสีของอาหาร chitinase detection medium ทุกวันเป็นเวลา 7 วัน

2. การวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์ไคตินเนส

นำรา *Trichoderma* species ที่สร้างเอนไซม์ไคตินเนสจากการทดสอบเบื้องต้นมาวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์ไคตินเนส โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะบริเวณขอบโคโลนีของรา *Trichoderma* species อายุ 3 วัน บนอาหาร PDA วางลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 200 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร potato dextrose broth (PDB; มันฝรั่ง 200 กรัม น้ำตาลเดกซ์โทรส 20 กรัม น้ำ 1 ลิตร) ปริมาตร 150 มิลลิลิตร นำไปวางบนเครื่องเขย่า ที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นกรองเอาเฉพาะน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยกระดาษกรอง (Whatman No.1) ที่นั่งผ้าเช็ดแล้ว นำน้ำเลี้ยงเชื้อไปวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์ โดยหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้ด้วยวิธี dinitrosalicylic acid (DNS method) (Miller, 1959) ซึ่งใช้ 1% colloidal chitin ใน 50 mM potassium phosphate buffer (KPB) pH 7.0 เป็นสารตั้งต้น (substrate)



การวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเนสวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) โดยเตรียมตัวอย่างรา *Trichoderma* species แต่ละไอโซเลท ซึ่งแบ่งออกเป็น 4 หลอดทดลอง หลอดทดลองละ 3 ซ้ำ ดังนี้ หลอดทดลองที่ 1 เติม 50 mM KPB pH 7.0 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เป็นชุดควบคุม (control) หลอดทดลองที่ 2 เติม 50 mM KPB, pH 7.0 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมกับสารตั้งต้น ปริมาตร 250 ไมโครลิตร เป็นชุดควบคุมสารตั้งต้น (substrate control) หลอดทดลองที่ 3 เติม 50 mM KPB, pH 7.0 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมกับตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อของแต่ละไอโซเลท ปริมาตร 250 ไมโครลิตร เป็นเอนไซม์เบลนค์ (enzyme blank) และหลอดทดลองที่ 4 ตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อของแต่ละไอโซเลท ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมกับสารตั้งต้น ปริมาตร 250 ไมโครลิตร เป็นตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อกับสารตั้งต้น (enzyme substrate) นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 50 นาที จากนั้นเติมสารละลาย DNS (3,5 DNS 10 กรัม 2N NaOH 200 มิลลิลิตร sodium potassium tartrate 300 กรัม น้ำ 1 ลิตร) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที เติมน้ำกลั่นหนึ่งขวด 4 มิลลิลิตร รอให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-vis spectrophotometer รุ่น UV 5300 METASH, China) ที่ความยาวคลื่น 575 นาโนเมตร เทียบกับกราฟมาตรฐานของ N-acetyl-D-glucosamine เพื่อใช้คำนวณหาค่ากิจกรรมเอนไซม์ โดยหนึ่งยูนิต (U) ของเอนไซม์หมายถึงเอนไซม์ที่ทำให้เกิดน้ำตาลรีดิวซ์ 1 ไมโครโมล (μmol) ต่อ 1 นาที จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงของแต่ละไอโซเลทมาคำนวณหาค่ากิจกรรมเอนไซม์ไคตินเนสตามสมการคำนวณหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ดังนี้

$$\text{Enzyme activity (U/ml)} = [(((\Delta A/m) * 1000) / V_t) / MW] / (T) / (V_t / V_e)] * D$$

นำผลค่ากิจกรรมเอนไซม์ไคตินเนสของรา *Trichoderma* species แต่ละไอโซเลทมาวิเคราะห์ผลทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99 โดยวิธี Duncan's Multiple Range test (DMRT)

3. การระบุชนิดของรา *Trichoderma* species ที่มีศักยภาพในการสร้างเอนไซม์ไคตินเนส

นำรา *Trichoderma* species ที่มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไคตินเนสสูงสุด มาตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยเลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน สังเกตลักษณะของโคโลนี การเจริญของเส้นใย สีของโคโลนี การเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ และทำ slide culture ส่องและถ่ายภาพลักษณะโครงสร้างของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Leica DM750, Germany) ซึ่งประกอบด้วยกล้องถ่ายภาพ (Leica MD170 HD, Germany) วัดขนาดโครงสร้างสปีพันธุ์ของราจากภาพถ่ายด้วย Leica application suite (LAS software version 4.9.0) เปรียบเทียบกับเอกสารอ้างอิง Kubicek and Harman (1998) และ Samuels and Hebbbar (2015)

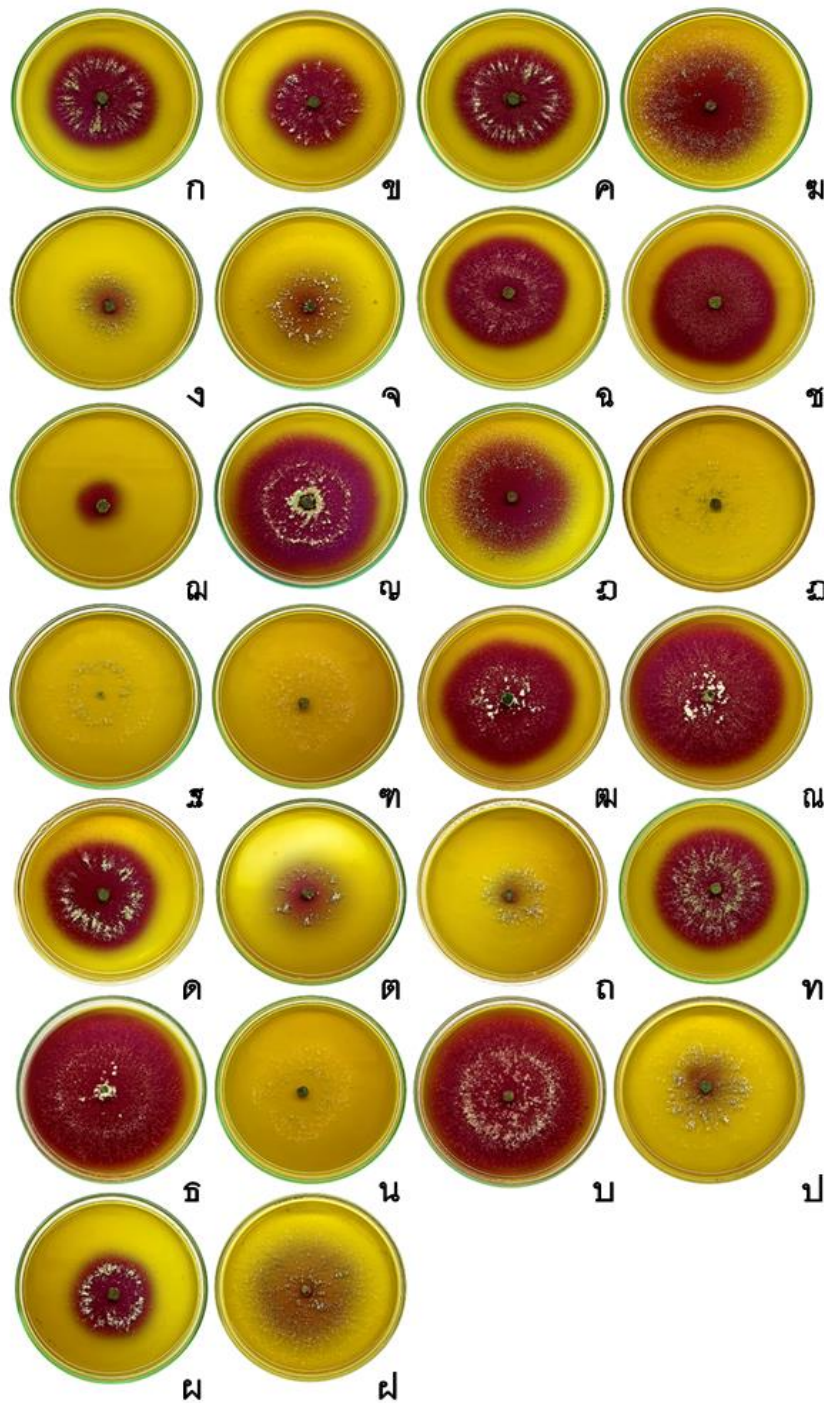


สกัด DNA ตามวิธีของ Saitoh, Togashi, and Arie (2006) ตรวจหา DNA โดยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟริซิส (gel electrophoresis) บน 1% อะกาโรสเจล (agarose gel) กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที นำไปตรวจสอบภายใต้ UV transilluminator (GenedireX, Taiwan) เพิ่มปริมาณ DNA โดยใช้เทคนิค PCR (polymerase chain reaction) ที่ตำแหน่ง internal transcribed spacer (ITS1-5.8S-ITS2) ด้วยไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 (White, Bruns, Lee, & Taylor, 1990) โดยปฏิกิริยาทั้งหมด 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย DNA template 2 ไมโครลิตร forward primer 1 ไมโครลิตร reverse primer 1 ไมโครลิตร DreamTaq (Thermo Scientific) 12.5 ไมโครลิตร และ Rnase – free water 8.5 ไมโครลิตร นำหลอด PCR ใส่เครื่อง thermal cycler (BIO-RAD T100TM, USA) ตั้งเวลาและอุณหภูมิดังนี้ Pre denaturation ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 1 รอบ Denaturation ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 30 วินาที Annealing ที่อุณหภูมิ 55 °C เป็นเวลา 30 วินาที Extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำจำนวน 35 รอบ และ Final extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 5 นาที ตรวจหา PCR product โดยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟริซิส ส่ง PCR product ไปยังบริษัท Macrogen (ประเทศเกาหลีใต้) เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้รับมาเทียบหาชนิดของราใน GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) ด้วยโปรแกรม Nucleotide BLAST (blastn)

ผลการวิจัย

1. การทดสอบการสร้างเอนไซม์ไคตินเนสเบื้องต้น

คัดเลือกรา *Trichoderma* species ที่สามารถสร้างเอนไซม์ไคตินเนสบนอาหาร chitinase detection medium ได้ 22 ไอโซเลต คือ T-GL1, T-GL2, T-GL3, T-GL4, T-GL6, T-GL7, T-GL8, T-GL9, T-GL13, T-GL15, T-GL16, T-GL20, T-GL23, T-GL24, T-GL26, T-GL29, T-GL30, T-GL31, T-GL34, T-GL36, T-GL39 และ T-GL40 โดยอาหารเกิดการเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีม่วงบริเวณโคโลนีบนอาหารทดสอบหลังจากวางเชื้อเป็นเวลา 4 วัน ส่วนรา *Trichoderma* species ที่ไม่สร้างเอนไซม์ไคตินเนส 4 ไอโซเลต คือ T-GL17, T-GL18, T-GL19 และ T-GL33 อาหารทดสอบไม่เกิดการเปลี่ยนสี (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 การสร้างเอนไซม์ไคตินเนสของรา *Trichoderma* species บนอาหาร chitinase detection medium
ก. T-GL1 ข. T-GL2 ค. T-GL3 ง. T-GL4 จ. T-GL6 ฉ. T-GL7 ช. T-GL8 ซ. T-GL9 ฅ. T-GL13 ญ. T-GL15 ฎ. T-GL16
ฏ. T-GL17 ฐ. T-GL18 ท. T-GL19 ฒ. T-GL20 ณ. T-GL23 ด. T-GL24 ต. T-GL26 ถ. T-GL29 ท. T-GL30
ธ. T-GL31 น. T-GL33 บ. T-GL34 ป. T-GL36 ผ. T-GL39 ฝ. T-GL40

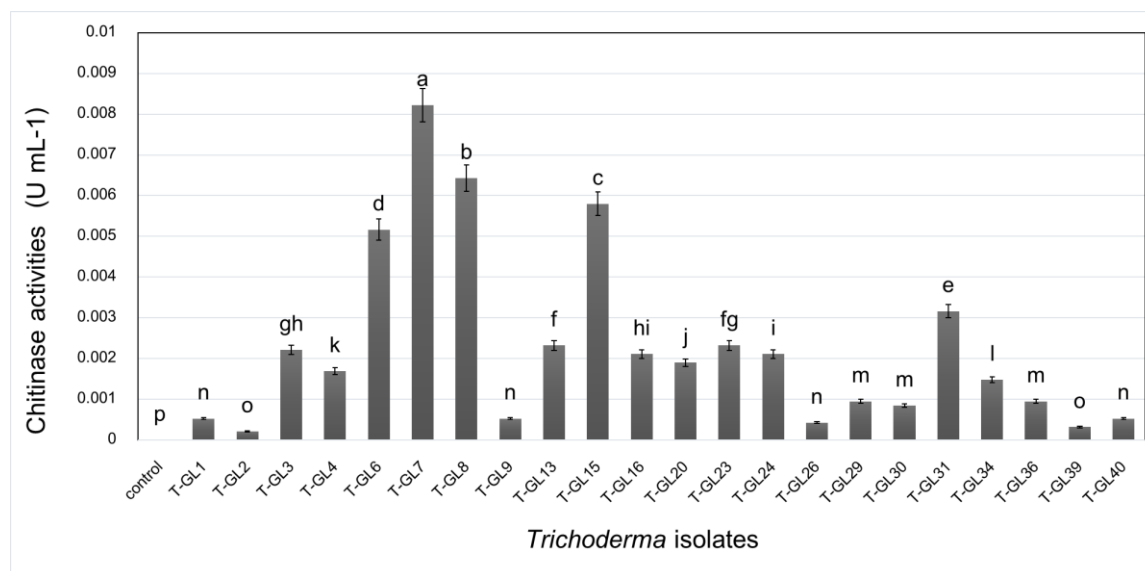


2. การวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์ไคตินเนส

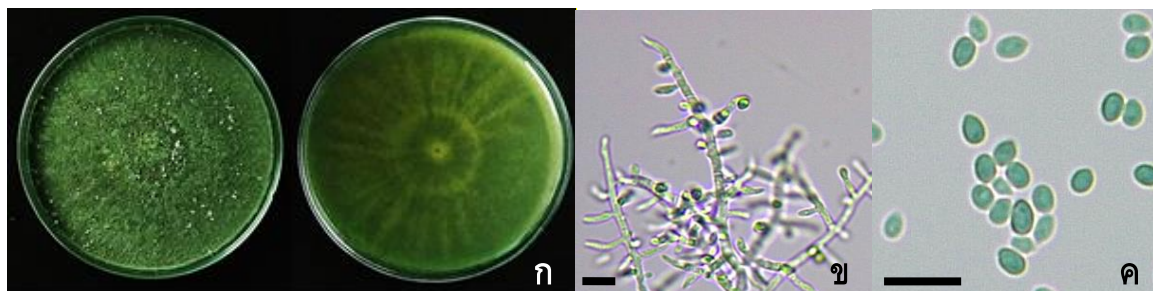
เมื่อนำรา *Trichoderma* species ทั้ง 22 ไอโซเลทจากการทดสอบการสร้างเอนไซม์ไคตินเนสเบื้องต้น มาวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ พบว่าทั้ง 22 ไอโซเลท มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไคตินเนสดังภาพที่ 2 โดยไอโซเลท T-GL7 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไคตินเนสสูงสุด (0.0082 U/ml) ซึ่งแตกต่างทางสถิติเมื่อเทียบกับไอโซเลทอื่น รองลงมาคือ ไอโซเลท T-GL8 และ T-GL15 โดยมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ 0.0064 U/ml และ 0.0057 U/ml ตามลำดับ ส่วนไอโซเลท T-GL2 และ T-GL39 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไคตินเนสต่ำสุดไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ 0.00023 U/ml และ 0.00027 U/ml

3. การระบุชนิดของรา *Trichoderma* species ที่มีศักยภาพในการสร้างเอนไซม์ไคตินเนส

การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่ตำแหน่ง ITS เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank พบว่ารา *Trichoderma* species ไอโซเลท T-GL7 มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน 99% กับรา *T. reesei* ในฐานข้อมูล GenBank และมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาตรงกับเอกสารอ้างอิงดังนี้ โคลนิน (colony) สีเขียวอ่อนจนถึงสีเขียวเข้ม ด้านใต้โคโลนีอาหารเปลี่ยนสีกลายเป็นสีเหลือง ไม่มีกลิ่น การสร้างโคนิเดีย (conidiation) เป็นแบบแบนราบคลุมทั่วทั้งผิวอาหารในจานเลี้ยงเชื้อ โคนิดิโอฟอร์ (conidiophores) มีการแตกแขนงแบบ Longibrachiatum type ฟิโลอะไลด์ (phialides) เป็นแบบ lageniform โคนิเดีย (conidia) รูปร่างกระสวย (ellipsoidal) สีเขียว ขนาด $3.6 - 4.6 \times 2.35 - 3.12$ ไมครอน (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 2 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไคตินเนสจากน้ำเลี้ยงเชื้อของรา *Trichoderma* species ที่เจริญในอาหาร PDB ค่าเฉลี่ยของกิจกรรมเอนไซม์ $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (3 ซ้ำ) และค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99 โดยวิธี Duncan's Multiple Range test



ภาพที่ 3 ลักษณะของรา *Trichoderma reesei* T-GL7 (ก) โคลนิจของราเจริญบนอาหาร PDA

(ข) โคนิดิโอฟอร์ (ค) โคนิเดีย (สเกลบาร์ภาพ ข และ ค = 10 ไมครอน)

อภิปรายผล

ผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์ไคตินเอสเปื่องต้นสอดคล้องกับรายงาน Agrawal and Kotasthane (2012) ที่ได้ทำการทดสอบการสร้างเอนไซม์ไคตินบนอาหาร chitinase detection medium พบว่า *Trichoderma* species ที่สร้างเอนไซม์ไคตินบนอาหารทดสอบ ส่งผลให้อาหารเกิดการเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีม่วง เนื่องจากไคตินถูกย่อยด้วยเอนไซม์ไคตินเอสกลายเป็น N-acetyl glucosamine ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของค่า pH จากภาวะเป็นกรดไปสู่ภาวะเป็นด่าง และเกิดการเปลี่ยนสีของสีย้อม (bromocresol purple) จากสีเหลืองเป็นสีม่วงบริเวณที่มีการย่อยไคตินรอบ ๆ โคลนิจ โดยขนาดของสีม่วงที่ต่างกันอาจเกิดจากแต่ละไอโซเลทมีการสร้างเอนไซม์ไคตินเอสทำลายไคตินในปริมาณไม่เท่ากัน ซึ่งอาจขึ้นอยู่กับชนิดของรา *Trichoderma* species

จากการวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์ของรา *Trichoderma* species ทั้ง 22 ไอโซเลท พบว่าสร้างเอนไซม์ไคตินเอสในปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับรายงานของ Urbina-Salazar et al. (2018) ซึ่งทดสอบเอนไซม์ไคตินเอสของ *T. harzianum* โดยเลี้ยงในอาหารที่เพิ่มตัวกระตุ้นให้ราชนิดนี้สร้างเอนไซม์ไคตินเอส พบว่ารา *T. harzianum* สามารถสร้างเอนไซม์ไคตินเอสได้สูงที่สุดซึ่งมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ 261.5 U/ml ในสูตรอาหาร M-Ch/G-F (mushroom Chitin/Glucan enriched fraction) และรายงานของ Agrawal and Kotasthane (2012) ได้ทำการทดสอบการสร้างเอนไซม์ไคตินเอสของรา *Trichoderma* species โดยเลี้ยงในอาหารเหลวที่เพิ่ม colloidal chitin ที่ได้จากผนังเซลล์ของรา *Rhizoctonia* ซึ่งกระตุ้นให้รา *Trichoderma* species สร้างเอนไซม์ไคตินเอสที่ค่ากิจกรรมเอนไซม์ 0.03578 U/ml ดังนั้นการสร้างเอนไซม์ที่น้อยในงานวิจัยนี้ เนื่องจากการเลี้ยงราในอาหารที่ไม่ได้มีการกระตุ้นให้มีการสร้างเอนไซม์ไคตินเอสในปริมาณมาก แต่อย่างไรก็ตามรา *Trichoderma* species ไอโซเลท T-GL7 ก็มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไคตินเอสสูงสุดที่ 0.0082 U/ml ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีคุณสมบัติของการเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ และ



หากนำไปเลี้ยงในอาหารที่เพิ่มตัวกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ไคตินเนสคาดว่าราไอโซเลทนี้ก็สามารถสร้างเอนไซม์ไคตินเนสได้สูงเช่นเดียวกัน

รา *Trichoderma* species ไอโซเลท T-GL7 มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาตรงกับรา *T. reesei* ซึ่งถูกจัดอยู่ในกลุ่ม section Longibrachaitum ตามไดโคโทมัสคีย์ (dichotomous keys) ของ Kubicek and Harman (1998) และการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์จัดอยู่ใน Longibrachaitum clade ตามเอกสารอ้างอิงของ Samuels and Hebbbar (2015)

สรุป

รา *Trichoderma* species จำนวน 26 ไอโซเลท ที่แยกได้จากวัสดุเพาะเห็ด และเก็บรวบรวมไว้ที่ห้องปฏิบัติการเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ทางการแพทย์และการเกษตร คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สามารถสร้างเอนไซม์ไคตินเนสได้จำนวน 22 ไอโซเลท โดยไอโซเลทที่สร้างเอนไซม์ไคตินเนสได้สูงสุดคือ T-GL7 และระบุชนิดได้คือ *T. reesei*

ข้อเสนอแนะ

จากการทดลองนี้สามารถนำรา *T. reesei* ไอโซเลท T-GL7 ไปทดสอบคุณสมบัติอื่น ๆ ในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อสาเหตุโรคพืชต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่งจาก สถานวิจัยความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรและทรัพยากรธรรมชาติ ระยะที่ 2 คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

รายการอ้างอิง (References)

- Agrawal, T., & Kotasthane, A.S. (2012). Chitinolytic assay of indigenous *Trichoderma* isolates collected from different geographical locations of Chhattisgarh in Central India. *A SpringerPlus*, 1, 73.
- El-Katatny, M.H.A., Somitsch, W., Robra, K.H., El-Katatny, M.S., & Gübitz, G. (2000). Production of chitinase and b-1,3-glucanase by *Trichoderma harzianum* for control of the phytopathogenic fungus *Sclerotium rolfsii*. *Food Technology and Biotechnology*, 38, 173 - 180.



- Grosch, R., Lottmann, J., Rehn, V.N.C., Rehn, K.G., Mendonça-Hagler, L., Smalla, K., & Berg, G. (2007). Analysis of antagonistic interactions between *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Fungal Genet. Biol.*, 42, 813 - 828.
- Harman, G.E., Howell, C.R., & Viterbo, A. (2004). *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, 2, 43 - 56.
- Khatri, K.D., Tiwari, N.D., & Bariya, S.H. (2017). Chitinolytic efficacy and secretion of cell wall-degrading enzymes from *Trichoderma* spp. in response to phytopathological fungi. *Applied Biology & Biotechnology*, 5, 1 - 8.
- Kubicek, P.C., & Harman, E.G. (1998). *Trichoderma* and *Gliocladium*: basic biology, taxonomy and genetics. *CRC Press*, 1, 1 - 300.
- Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Biochemistry*, 31, 426 - 428.
- Samuels, J.G., & Hebbbar, K.P. (2015). *Trichoderma* identification and agricultural applications. *The American Phytopathological Society*, 1 - 196.
- Sahai, A.S., & Manocha, M.S. (1993). Chitinase of fungi and plants: Their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction. *Microbiology Reviews*, 11, 317 - 338.
- Saitoh, K.I., Togashi, K., & Arie, T. (2006). A simple method for a mini-preparation of fungal DNA. *Journal of General Plant Pathology*, 72, 348 - 350.
- Sivasithamparam, K., & Ghisalberti, E.L. (1998). Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. In: Kubicek, C. P. & Harman, G. E. (Eds). *Trichoderma and Gliocladium*. *Taylor and Francis*, 1, 139 - 191.
- Urbina-Salazar, R.A., Inca-Torres, R.A., Falcón-García, G., Carbonero-Aguilar, P., Rodríguez-Morgado, B. Campo, A.J., Parrado, J., & Bautista, J. (2018). Chitinase Production by *Trichoderma harzianum* grown on a chitin-rich mushroom byproduct formulated medium. *Waste and Biomass Valorization*, 10, 1 - 9.
- Weindling, R. (1932). *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. *Phytopathology, ISSUE* 22, 837 - 845.



White, T.J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J.L. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, 38, 315 - 322.