รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. **แผนงานวิจัย** : วิจัยการใช้ประโยชน์จากเอ็นไซม์ของเชื้อจุลินทรีย์เพื่อควบคุมศัตรูพืช

2. **โครงการวิจัย** : วิจัยการใช้ประโยชน์จากเอ็นไซม์ของเชื้อจุลินทรีย์เพื่อควบคุมศัตรูพืช

   กิจกรรม : การผลิตเอ็นไซม์ย่อยสลายที่มีประโยชน์จากเชื้อราไตรโคเดอร์มาเพื่อใช้ในการควบคุมโรคพืช

3. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)** : การคัดเลือกและจำแนกชนิดของเอ็นไซม์จากเชื้อราไตรโคเดอร์มาที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืช

   ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Screening and Identification of *Trichoderma* Isolates with Potential to Degrading Enzymes Production for Plant Disease Control.

4. **คณะผู้ดำเนินงาน**

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

5. บทคัดย่อ

ทำการแยกและคัดเลือกเชื้อราไตรโคเดอร์มาสปีชีส์ (*Trichoderma* species) จากตัวอย่างดินและตัวอย่างเห็ด จ.กาญจนบุรี โดยวิธี soil dilution plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอ ได้ไตรโคเดอร์มาจำนวน 30 ไอโซเลต เพื่อศึกษาการสร้างเอ็นไซม์ย่อยสลายจำนวน 3 ชนิด ได้แก่ เซลลูเลส อะไมเลส และเพคติเนส จากการทดสอบความสามารถในการสร้างเอ็นไซม์บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ (selective medium) โดยวิธีการวัดการเจริญเติบโตเฉลี่ยของราไตรโคเดอร์มาบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะตามค่าเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของเส้นใย พบว่า ราไตรโคเดอร์มาทุกไอโซเลต คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ สามารถสร้างเอ็นไซม์ย่อยสลายได้ทั้ง 3 ชนิด โดย ไตรโคเดอร์มาไอโซเลต T14 สามารถสร้างเอ็นไซม์เซลลูเลสได้ดีที่สุดบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะเกลือ CMC ไอโซเลต T22 สามารถสร้างเอ็นไซม์อะไมเลสได้ดีที่สุดบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะผงวุ้นแป้ง และไตรโคเดอร์มาไอโซเลต TC1 สามารถสร้างเอ็นไซม์เพคติเนสได้ดีที่สุดบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ Czapek ด้วยเหตุนี้ เซลลูเลสเป็นเอ็นไซม์ย่อยสลายหลักที่ไตรโคเดอร์มาสามารถสร้างได้จากคุณสมบัติในการสร้างเอ็นไซม์ย่อยสลาย ผลที่ได้จากการศึกษา แสดงให้เห็นถึงศักยภาพในการสร้างเอ็นไซม์ย่อยสลายของราไตรโคเดอร์มาในประเทศไทย และสามารถนำไปใช้เป็นทางเลือกในการควบคุมโรคพืชสำคัญได้

Abstract

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

6. คำนำ

ปัจจุบันการศึกษาเกี่ยวกับการนำเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ ต่อการนำมาใช้ในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี (biocontrol agents) มีวัตถุประสงค์เพื่อป้องกันโรคพืชที่สำคัญ โดยเฉพาะการใช้เชื้อราไตรโคเดอร์มา (*Trichoderma* spp.) ที่มีคุณสมบัติของเชื้อราที่จัดเป็นเชื้อปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืชและสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตให้แก่พืช นั้น พบว่ามีการศึกษาการนำมาใช้ประโยชน์ในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืช และทำลายเชื้อสาเหตุโรคพืชที่สำคัญมากมายอย่างต่อเนื่องเป็นเวลานานในประเทศไทย ซึ่งวิธีการนำเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไปใช้ควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี มีหลากหลายวิธี เช่น การคลุกเมล็ด การรองก้นหลุม การผสมกับวัสดุปลูก การหว่านลงดิน การให้ไปกับระบบน้ำ การทาแผลและการฉีดพ่น (จิระเดช 2534; จิระเดช และ วรรณวิไล, 2542) เป็นต้น

นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาถึงการครอบครองรากพืชของเชื้อรา *Trichoderma* spp. โดยการผสมเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในดินสำหรับปลูกข้าวโพด ถั่วลิสงและยาสูบ พบว่าพืชสร้างเอ็นไซม์เป็นปริมาณมากจึงส่งผลให้พืชมีความต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคได้ (Engelberth et al., 2003) โดยการสร้างสารเคมีส่งสัญญาณ คือ salicylic acid (SA) และ jasmonic acid (JA) สารทั้งสองจะถูกลำเลียงไปยังส่วนต่างๆ ของพืชและไปกระตุ้นการทำงานของ R gene (Wasternack et al., 2006) ซึ่งมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตัวเองของพืช เช่น PR genes ทำหน้าที่สังเคราะห์ PR-proteins (Pathogenesis Related Proteins) โดย PR-proteins ซึ่งมีหลายชนิดด้วยกัน เช่น CWDE (Cell Wall Degrading Enzymes) ที่ *Trichoderma* สร้างได้เอง เช่น chitinase , cellulase, xylanase, amylase, pectinase, glucanase (b-1,3 glucanase; b-1,4-glucanase), lipase, arabinase และ protease เป็นต้น โดยความสามารถที่เชื้อรา *Trichoderma* สามารถสร้างเอ็นไซม์ย่อยสลายต่างๆเหล่านี้ จะเกิดปฏิสัมพันธ์ (interact) ในเชิงปฏิปักษ์ (antagonist) และการเป็นปรสิต (parasite) โดยเฉพาะกับเชื้อราสาเหตุโรคเท่านั้น (Vinale et al., 2008)

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

นอกจากคุณสมบัติในการกระตุ้นการสร้าง PR-protein ดังกล่าวข้างต้น เชื้อรา *Trichoderma* ยังส่งเสริมการเจริญเติบโตของรากพืชและช่วยให้พืชดูดซึมแร่ธาตุอาหารได้ดีขึ้น (Harman et al., 2004) เชื้อรา *Trichoderma* spp. เมื่อมีการเจริญบนบริเวณรากพืชจะกระตุ้นให้พืชมีการเจริญเติบโต และมีความต้านทานโรคที่ดีขึ้น และก่อให้เกิดกระบวนการกระตุ้นความต้านทานแบบทั่วต้น (induce systemic resistance, ISR) โดยทำให้ปริมาณของ jasmonic acid (JA) และ ethylene (ET) เพิ่มขึ้น และก่อให้เกิดการแสดงออกของยีน อย่างไรก็ตาม การศึกษากลไกต่างๆที่สำคัญ ที่ทำให้เชื้อรา *Trichoderma* spp. สามารถกระตุ้นให้พืชสร้างความต้านทานต่อเชื้อราสาเหตุโรคต่างๆ โดยการใช้เอ็นไซม์ชักนำให้พืชเกิดความต้านทานนั้นยังมีรายงานการศึกษาน้อย ถึงการใช้เอ็นไซม์ที่เชื้อรา *Trichoderma* spp. สามารถสร้างได้ และนำมาใช้

ประโยชน์โดยนำมาใช้เป็นกลไกชักนำให้พืชเกิดความต้านทานต่อโรคโคนเน่ารากเน่า ที่เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora* spp. เช่น โรครากเน่าโคนเน่าทุเรียน ส้ม ยางพารา พริก มะเขือเทศ และมันสำปะหลัง เป็นต้น

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

อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่า มีการศึกษาเกี่ยวกับการใช้เอ็นไซม์เพื่อใช้ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชและกระตุ้นความต้านทานต่อโรคพืช เช่น ไคติเนส เซลลูเลส อะไมเลส และเพคติเนส เป็นต้น แต่ในประเทศไทย การศึกษาการผลิตและการใช้เอ็นไซม์ย่อยสลายจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. มาใช้ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชรากเน่าโคนเน่ายังมีอยู่อย่างจำกัด ดังนั้น วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ เพื่อศึกษาและทดสอบการสร้างเอ็นไซม์ย่อยสลายของเชื้อรา *Trichoderma* spp. และนำไปใช้ในการทดสอบการผลิตเอ็นไซม์เพื่อใช้ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืช เพื่อลดหรือทดแทนการใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัดโรคพืชของเกษตรกร ซึ่งเป็นแนวทางที่ปลอดภัยและยั่งยืนต่อเกษตรกรและสภาพแวดล้อม

7. วิธีดำเนินการ :

อุปกรณ์

- อุปกรณ์มาตรฐานในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ได้แก่ ตู้เขี่ยเชื้อปลอดเชื้อ อุปกรณ์การแยกเชื้อรา จานเพาะเชื้อแก้ว มีฝาครอบ ขนาด 90 มม., ขวดแก้วรูปชมพู่, ที่เจาะจุกยาง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 ซม. , ใบมีดผ่าตัด, ด้ามใบมีดผ่าตัด, ห่วงเขี่ยเชื้อ

- อุปกรณ์วิทยาศาสตร์ ได้แก่ ตู้ควบคุมอุณหภูมิ ตู้เย็นเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และลบ 20 องศาเซลเซียส หม้อนึ่งความดันไอ เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ ตู้อบ

-เครื่องแก้วและอุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ เครื่องชั่ง เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง กระดาษชั่ง ม้วนเทปกาวย่น ปากกาสีสำหรับเขียนติดข้อความ กระดาษทิชชู่ปลอดเชื้อ

- ไอโซเลตเชื้อราไตรโคเดอร์มา

คัดแยกตัวอย่างไอโซเลตเชื้อราบนอาหารวุ้นเอียงพีดีเอ (slant agar) จำนวน 30 ไอโซเลต โดยสกัดแยกได้จากอาหารวุ้นเลี้ยงเชื้อแครอทจาก ทัศนาพร และคณะ (2550)

สารเคมี สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่

ผงวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อ, อาหารเลี้ยงแบคทีเรียสารสกัดยีสต์, สารละลายย้อมสีตรวจหาจุลินทรีย์ conga red, อาหารเลี้ยงเชื้อซาเพ็ค, อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB, เกลือโซเดียมซีเอ็มซี คาร์บอกซีเมธิลเซลลูโลส, czapek dox broth, ผงวุ้นโปเตโต้เด็กซ์โตรสพีดีเอ, ผงวุ้นแป้งอาหารเลี้ยงเชื้อ , อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวพีดีบี , สารละลายไอโอดีน, อาหารวุ้นเลี้ยงเชื้อ Lactobacillus MRS (HiMedia)

วิธีการ

1.การคัดเลือกเชื้อราไตรโคเดอร์มา ไอโซเลตที่มีศักยภาพในการผลิตเอ็นไซม์ย่อยสลาย

1.1 การเก็บตัวอย่างเชื้อราไตรโคเดอร์มา

สุ่มเก็บตัวอย่างดินและเห็ดจากจังหวัดกาญจนบุรี แยกราไตรโคเดอร์มา โดยวิธีเจือจางดิน (Serial Dilution Spread Plate Technique) บนอาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอ (Selective Medium PDA) ตามวิธีการของทัศนาพรและคณะ (2550) ได้เชื้อราไตรโคเดอร์มา จำนวนทั้งหมด 30 ไอโซเลต (เก็บรวบรวมไว้ที่กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร จำนวน 28 ไอไซเลต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จำนวน 1 ไอโซเลต และ การสุ่มเก็บตัวอย่างจำนวน 1 ไอโซเลต) ให้ชื่อว่า Tc1 ถึง Tc30 บ่มบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน ก่อนนำไปใช้ทดลองหรือเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสต่อไป จากนั้น ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแต่ละไอโซเลตบนอาหารวุ้นแครอทเอียง (slant agar) เพื่อเก็บรักษาเป็นเชื้อตั้งต้น (Stock culture) เพื่อเก็บรักษาไว้ในระยะยาวที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทั้งในอาหารวุ้นเลี้ยงเชื้อเอียงและบนจานเพาะเชื้อ ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อราแต่ละไอโซเลตบนอาหารเพาะเลี้ยงใหม่ที่เตรียมบนจานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 90 มม. ก่อนนำไปใช้ในการศึกษาในแต่ละการทดลอง เพื่อใช้ในการทดลองแยกสกัดเอ็นไซม์โดยการทดสอบคุณสมบัติการย่อยสลายของเอ็นไซม์เซลลูเลส อะไมเลส และเพคติเนส

บนอาหารจำเพาะเอ็นไซม์ชนิดต่างๆ และคัดเลือกราไตรโคเดอร์มาที่สามารถสร้างเอ็นไซม์ย่อยสลายได้ เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

1.2 การแยกเชื้อราไตรโคเดอร์มา

นำชิ้นวุ้นเชื้อราไตรโคเดอร์มาที่แยกสกัดได้จากข้อ 1.1 มาเลี้ยงบนจานเพาะเชื้อมีฝาครอบเชื้อพีดีเอ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 72 ชั่วโมง สังเกตหรือวัดขนาดการเจริญเติบโตของเส้นใยทุกวันเป็นเวลา 3 วัน เพื่อนำไปทำการทดลองในขั้นตอนต่อไป

เพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณเชื้อราไตรโคเดอร์มา โดยการเตรียมอาหารสูตรพีดีเอ เพื่อทดสอบการสร้างเอ็นไซม์ พบว่า ราไตรโคเดอร์มาสามารถเส้นใยในอาหารพีดีเอได้ใกล้เคียงกัน ทำการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณจำนวน 3 ครั้ง เพื่อเก็บเป็น stock culture ทั้งในรูปจานอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อและในรูปสปอร์ (ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ประกอบด้วยกลีเซอรอล) เชื้อนำเชื้อราไตรโคเดอร์มาที่แยกได้มาทดสอบความสามารถการสร้างเอ็นไซม์เซลลูเลส เอ็นไซม์อะไมเลส และ เอ็นไซม์เพคติเนส จากนั้น จึงคำนวณหาค่าเฉลี่ยความสามารถการสร้างเอ็นไซม์แต่ละชนิด ต่อไป

2. ทดสอบความสามารถการสร้างเอ็นไซม์ของเชื้อราไตรโคเดอร์มา

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

2.2 นำเชื้อราไตรโคเดอร์มาที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคโคนเน่ารากเน่าจากการทดลองที่ 1 อย่างน้อย 5 ไอโซเลต มาทดสอบการสร้างเอ็นไซม์เซลลูเลส ดังนี้ นำเชื้อรามาเลี้ยงลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อพีดีบี เป็นเวลานาน 1 วัน ทำการปิเปตสารละลายเชื้อ ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ลงในหลุมอาหารวุ้น CMC (carboxy methyl cellulose) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8 เซนตริเมตร โดยวิธี agar spot บ่มเป็นเวลา 3 วัน และ flood plate ด้วยสารละลาย congo red ความเข้มข้นร้อยละ 1 ให้ท่วมผิวหน้าอาหาร ทิ้งไว้ 15 นาที และเทออก วัดเส้นผ่านศูนย์กลางการสร้างหรือเกิดบริเวณใส วงใสรอบโคโลนีต่ออัตราส่วนเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี หรือ ค่า HC (HC value) (เพชรลดาและกำไล 2556)

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

2.4 บันทึกผลการทดลอง

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

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

3. การจำแนกชนิดของเอ็นไซม์ที่เชื้อราไตรโคเดอร์มาที่สามารถสร้างเอ็นไซม์

วิธีการดำเนินงาน

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

4. การวิเคราะห์ความแปรปรวนและความแตกต่างของค่าเฉลี่ยการสร้างเอ็นไซม์ทางสถิติ

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

- เวลาและสถานที่ - เริ่มต้น ตุลาคม 2561 – สิ้นสุด กันยายน 2562

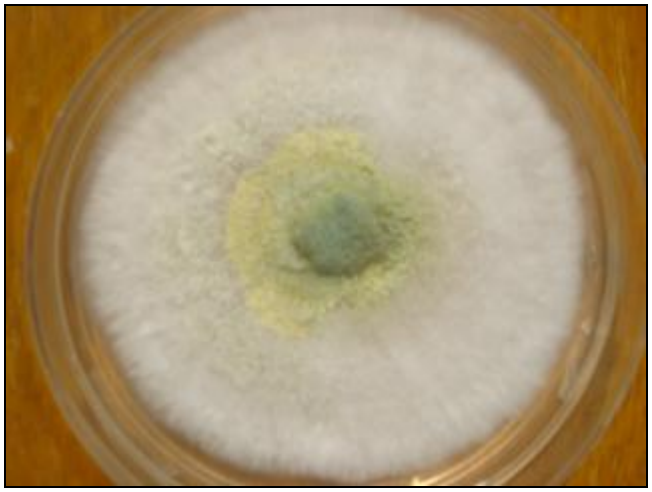
สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

1.การคัดเลือกไอโซเลตเชื้อราไตรโคเดอร์มาที่มีศักยภาพในการผลิตเอ็นไซม์ย่อยสลาย

จากการทดสอบการแยกเชื้อราไตรโคเดอร์มาจากตัวอย่างดินและเห็ด จำนวน 30 ตัวอย่าง โดยวิธี soil dilution plate บนอาหารพีดีเอ สามารถได้ราไตรโคเดอร์มาจำนวนทั้งสิ้น 29 ไอโซเลต (สาเหตุจากเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อเพื่อศึกษาการสร้างเอ็นไซม์ พบว่า ไอโซเลต ชื่อว่า TC29 ไม่สามารถเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อต่อไปได้) ส่วนไอโซเลตอื่นๆ ลักษณะเชื้อรามีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เส้นใยสีขาว สปอร์มีสีเขียวเข้มเต็มขอบ เส้นใยฟูเจริญเป็นวงกว้างบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (รูปที่ 1) นอกจากนี้ ทดสอบการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราทุกไอโซเลตที่สามารถเจริญเติบโตในวุ้นอาหารจำเพาะเพื่อทดสอบการสร้างเอ็นไซม์เซลลูเลสบนอาหารเลี้ยงเชื้อเซลลูโลส (CMC), เอ็นไซม์อะไมเลสบนอาหารเลี้ยงเชื้อแป้ง (star agar) และ เอ็นไซม์เพคติเนสบนอาหารเลี้ยงเชื้อเพคติน (Czapek-Dox) พบว่า ราไตรโคเดอร์มาทุกไอโซเลตสามารถสร้างเอ็นไซม์ทั้งสามชนิดได้ โดย ไอโซเลต TC14, TC1 และ TC22 สามารถสร้างเอ็นไซม์ย่อยสลายเซลลูเลส เพคติเนสและอะไมเลส ได้สูงสุดตามลำดับ โดยได้ค่าเฉลี่ยการสร้างวงใสบนอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดเอ็นไซม์ที่ 21.20, 7.73 และ 5.00 ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

จากการศึกษาเกี่ยวกับเอ็นไซม์สำคัญ ที่เชื้อรา *Trichoderma* spp. สามารถสร้างได้ และเป็นกลไกที่ทำให้เชื้อรา *Trichoderma* spp. สามารถกระตุ้นหรือชักนำให้พืชสร้างความต้านทานต่อเชื้อราสาเหตุโรคต่างๆ (biocontrol) โดยเฉพาะได้ เช่น คุณสมบัติการเป็น mycoparasitism, antagonism, antibiosis, nutrient competition และ phytopathogen suppression เป็นต้น (Hansan, 2014) ทว่า การศึกษาเกี่ยวกับการสร้างเอ็นไซม์ย่อยสลายจากไตรโคเดอร์มาในประเทศไทย ยังมีรายงานการศึกษาน้อยมาก ดังนั้น ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาถึงการสร้างเอ็นไซม์ สามารถนำมาประยุกต์ใช้หรือนำเอ็นไซม์ดังกล่าวมาใช้เป็นกลไกสำคัญเพื่อชักนำให้พืชเกิดความต้านทานต่อโรคโคนเน่ารากเน่าต่อไปได้ จากการศึกษานี้ พบว่า รา *Trichoderma* spp. สามารถสร้างเอ็นไซม์ย่อยสลายได้ทั้งสามชนิด และจากการศึกษานี้พบว่า ไตรโคเดอร์มาสามารถสร้างเอ็นไซม์เซลลูเลสได้ในปริมาณที่สูง สอดคล้องกับรายงานการศึกษาอื่นๆ (Bech, 2014)



รูปที่ 1 ลักษณะการเจริญเติบโต สปอร์ และเส้นใยของราไตรโคเดอร์มา บนอาหารเลี้ยงเชื้อ พีดีเอหลังการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องนาน 5 วัน

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

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

ตารางที่ 2 แสดงการศึกษาความสามารถของไอโซเลตเชื้อราไตรโคเดอร์มาที่แตกต่างกันจำนวน 29 ไอโซเลต ต่อการสร้างเอ็นไซม์เซลลูเลส (CELLULASE) โดยใช้วิธีการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย DMRT

TRT	N	RANKS	MEANS
t1	2	19	3.35 fgh[1/]
t2	3	23	2.37 hi
t3	3	18	4.10 efg
t4	2	20	2.85 ghi
t5	3	27	1.30 i
t6	3	24	2.23 hi
t7	3	26	1.83 hi
t8	3	21	2.83 ghi
t9	3	16	4.60 c-f
t10	3	25	1.87 hi
t11	3	13	4.97 b-f
t12	3	7	5.77 a-e
t13	3	3	6.13 abc
t14	3	1	7.13 a
t15	3	10	5.23 b-e
t16	3	9	5.43 b-e
t17	3	4	5.93 a-d
t18	3	2	6.40 ab
t19	3	17	4.33 d-g
t20	3	15	4.83 b-f
t21	3	14	4.90 b-f
t22	3	7	5.77 a-e
t23	3	5	5.87 a-d
t24	3	2	6.40 ab
t25	3	8	5.73 a-e
t26	3	12	5.00 b-f
t27	3	22	2.40 hi
t28	2	6	5.80 a-e
t29	3	11	5.17 b-e
MEAN			4.52

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

cv = 18.7%

F-test = 11.03 significant at 1% level

ตารางที่ 3 แสดงการศึกษาความสามารถของไอโซเลตเชื้อราไตรโคเดอร์มาที่แตกต่างกันจำนวน 29 ไอโซเลต ต่อการสร้างเอ็นไซม์อะไมเลส (AMYLASE) โดยใช้วิธีการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย DMRT

TRT	N	RANKS	MEANS
t1	3	19	2.33 ghi[1/]
t2	3	17	2.67 e-i
t3	3	14	3.10 d-h
t4	3	17	2.67 e-i
t5	3	18	2.40 f-i
t6	3	16	2.83 d-h
t7	3	19	2.33 ghi
t10	3	19	2.33 ghi
t11	3	10	3.90 a-e
t12	3	15	3.07 d-h
t13	3	12	3.50 b-g
t14	2	21	1.25 i
t15	3	20	1.83 hi
t16	3	13	3.33 c-g
t17	3	3	4.87 ab
t18	3	5	4.70 abc
t19	3	17	2.67 e-i
t20	3	7	4.17 a-d
t21	3	6	4.67 abc
t22	3	1	5.00 a
t23	3	12	3.50 b-g
t24	3	4	4.83 ab
t25	3	2	4.93 a
t26	3	9	4.10 a-d
t27	3	2	4.93 a
t28	3	8	4.13 a-d
t29	3	11	3.77 a-f
MEAN			3.50

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

cv = 20.7%

F-test = 6.26 significant at 1% level

ตารางที่ 4 แสดงการศึกษาความสามารถของไอโซเลตเชื้อราไตรโคเดอร์มาที่แตกต่างกันจำนวน 29 ไอโซเลต ต่อการสร้างเอ็นไซม์เพคติเนส (PECTINASE) โดยใช้วิธีการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย DMRT

TRT	N	RANKS	MEANS
t1	3	1	7.73 a[1/]
t2	3	8	6.40 abc
t3	3	14	5.60 bc
t4	3	2	6.70 ab
t6	3	3	6.67 ab
t7	3	3	6.67 ab
t10	3	16	5.27 cd
t12	3	6	6.53 abc
t13	3	11	6.17 bc
t16	3	15	5.40 bc
t17	3	13	5.67 bc
t18	2	18	1.35 e
t19	2	18	1.35 e
t20	2	17	4.00 d
t21	3	12	5.83 bc
t22	3	10	6.27 bc
t23	3	5	6.60 abc
t24	3	4	6.63 abc
t25	3	9	6.37 bc
t26	3	7	6.50 abc
t27	3	3	6.67 ab
t28	3	11	6.17 bc
t29	3	2	6.70 ab
MEAN			5.95

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

cv = 11.8%

F-test = 1.90 significant at 1% level

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

1. จากการทดลอง สามารถแยกเชื้อราไตรโคเคอร์มาที่ได้จากตัวอย่างดินและตัวอย่างเห็ด (ทัศนาพร และคณะ 2550) ได้จำนวนทั้งหมด 29 ไอโซเลต ทำการต่อเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอ บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยเก็บรักษาไว้ในจานอาหารเพาะเชื้อแก้วพีดีเอและในวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อเอียงที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ เพื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (stock culture) เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป นำไตรโคเดอร์มาแต่ละไอโซเลตบนอาหารเพาะเลี้ยงใหม่ที่เตรียมในจานเพาะเชื้อแก้วมีฝาครอบขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 90 มิลลิเมตร โดยบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ก่อนนำไปใช้ในการศึกษาแต่ละการทดลอง

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

3.เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นพบว่าเชื้อราไตรโคเดอร์มา ที่คัดแยกได้จำนวน 29 ไอโซเลต จะสร้างเส้นใยฟูสีขาว และเส้นใยฟูสีเขียวอมเข้ม ขอบเรียบ ซึ่งเป็นลักษณะของเชื้อราไตรโคเดอร์มา

4.ผลการทดลองโดยรวมที่ผ่านมา ได้ไอโซเลตเชื้อราไตรโคเดอร์มาที่สร้างเอ็นไซม์เซลลูเลส (ไอโซเลต Tc14) เอ็นไซม์เพคติเนส (ไอโซเลต Tc1) และเอ็นไซม์อะไมเลส (ไอโซเลต Tc22) ที่สร้าง clear zone หรือไอโซเลตที่มีความสามารถในการสร้างเอ็นไซม์ได้สูงสุด (โดยพิจารณาจากค่าเฉลี่ยความสามารถการสร้างวงใส ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่จำเพาะต่อการสร้างเอ็นไซม์แต่ละชนิด) วัดขนาดเฉลี่ยสูงสุดบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะได้ที่ 21.2, 7.73 และ 5.0 เซ็นตริเมตร ตามลำดับ ดังนั้น ข้อมูลที่คัดเลือกได้นี้ สามารถนำข้อมูลที่ได้จากการศึกษาไปใช้ต่อยอดในการศึกษาการผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ เพื่อนำมาใช้ยับยั้งหรือควบคุมโรครากเน่าโคนเน่าสาเหตุจากเชื้อราโรคพืช ทั้งในสภาพโรงเรือนปลูกทดลองหรือในระดับโรงเรือนในอนาคตได้ต่อไป

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

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

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

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

11. คำขอบคุณ

ขอขอบคุณกรมวิชาการเกษตร ที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัย นายไกรศร ตาวงศ์ นักวิชาการสถิติ กลุ่มวิจัยและวิเคราะห์ทางสถิติงานวิจัยเกษตร กองแผนงานและวิชาการ กรมวิชาการเกษตร สำหรับให้คำปรึกษาผลวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ นายอนุชา สุขสังวาลย์ และนางสาว อภิญญา สลีวงศ์ นักวิชาการเกษตร กลุ่มวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร ที่ให้ความช่วยเหลือจัดเตรียมอุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมีงานทดลองในห้องปฏิบัติงานวิจัยจุลชีววิทยา จัดเตรียมสถานที่ปฏิบัติงานวิจัยและเก็บบันทึกข้อมูล

12. เอกสารอ้างอิง

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

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

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

เพชรลดา ปั้นหยา และกำไล เลาห์พัฒนาเลิศ 2556. การคัดกรองและทำการคัดแยกจุลินทรีย์ที่สร้างเอ็นไซม์เซลลูเลส อะไมเลส และเพคติเนส จากกากมันสำปะหลังสด. การประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยรังสิต ประจำปี 2556.

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

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

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

Heil, M., and R.M.Bostock. 2002. Induce systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induce resistance. Ann Bot. 89(5):503-12.

Jones, D.A., and Takemoto, D. 2004. Plant innate immunity-direct and indirect recognition of general and specific pathogen –associated molecules. *Curr. Opin. Immunol*. 16: 48-62.

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

Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisaberti, E.L., Marra, R., Woo, and S.L., Lorito, M. (2008).

Trichoderma-plant-pathogen interaction. Soil Biol Biochem: 40:1-10.

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

13. ภาคผนวก

ตารางที่ 1 การทดสอบการสร้างเอ็นไซม์เซลลูเลสบนอาหาร CMC ที่ระยะเวลา 3 วันหลังการบ่มเชื้อ

Isolates of *Trichoderma* spp.	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ผลรวม (sum value)	Mean
TC1	-	3.40	3.30	6.70	2.23
TC2	1.50	2.60	3.00	7.10	2.36
TC3	4.00	4.00	4.30	12.30	4.10
TC4	-	2.50	3.20	5.70	1.90
TC5	1.00	1.50	1.40	3.90	1.30
TC6	2.00	1.60	3.10	6.70	2.23
TC7	1.20	2.20	2.10	5.50	1.83
TC8	2.00	2.50	4.00	8.50	2.83
TC9	4.60	4.70	4.50	13.80	4.60
TC10	2.50	1.60	1.50	5.60	1.86
TC11	3.60	6.00	5.30	14.90	4.96
TC12	5.80	5.70	5.80	17.30	5.76
TC13	6.00	6.50	5.90	18.40	6.13
TC14	7.00	7.50	6.90	21.40	7.13
TC15	7.20	6.50	2.00	15.70	5.23
TC16	5.50	5.60	5.20	16.30	5.43
TC17	6.50	5.80	5.50	17.80	5.93
TC18	6.50	6.50	6.20	19.20	6.40
TC19	6.00	2.00	5.00	13.00	4.33
TC20	4.30	5.00	5.20	14.50	4.83
TC21	5.80	4.30	4.60	14.70	4.90
TC22	5.60	6.00	5.70	17.30	5.76
TC23	5.60	6.00	6.00	17.60	5.86
TC24	6.20	6.50	6.50	19.20	6.40
TC25	6.00	6.00	5.20	17.20	5.73
TC26	5.50	5.00	4.50	15.00	5.00
TC27	2.20	2.00	3.00	7.20	2.40
TC28	5.70	-	5.90	11.60	3.86
TC30	4.50	5.50	5.50	15.50	5.16

ตารางที่ 2 การทดสอบการสร้างเอ็นไซม์อะไมเลสบนอาหาร Starch agar ที่ระยะเวลา 3 วันหลังการบ่มเชื้อ

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

ตารางที่ 3 การทดสอบการสร้างเอ็นไซม์เพคติเนสบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Czapek agar ที่ระยะเวลา 3 วันหลังการบ่มเชื้อ

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