

## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

### โครงการ:

การค้นหาเชื้อราและยีน chitinase ของเชื้อราจากดินเพื่อการควบคุมโรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา

### โดย

ดร. ทิพา อัครรักษ์

ภาควิชา เทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์  
มหาวิทยาลัยมหิดล

ศาสตราจารย์ ดร. วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด

ภาควิชา เทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์  
มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

1 กรกฎาคม 2551

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ:

การค้นหาเชื้อราและยีน chitinase ของเชื้อราจากดินเพื่อการควบคุมโรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา

โดย

ดร. ทิพา อัครรักษ์

ภาควิชา เทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์  
มหาวิทยาลัยมหิดล

ศาสตราจารย์ ดร. วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด

ภาควิชา เทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์  
มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

## กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาที่ให้ทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ในการสนับสนุนโครงการวิจัยนี้ รวมทั้งให้โอกาสในการทำวิจัยและโอกาสในการพบปะแลกเปลี่ยนความรู้กับนักวิจัยและผู้ทรงคุณวุฒิ

ผู้วิจัยขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล และขอขอบคุณภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพสำหรับความสนับสนุนด้านทุนวิจัยตลอดจนสถานที่และเครื่องมืออุปกรณ์ในการวิจัย

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัยสำหรับคำแนะนำ ความเห็นและแนวคิดอันมีค่า อีกทั้งยังให้ความช่วยเหลือและการสนับสนุนในทุกๆด้านตลอดระยะเวลาโครงการ

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ชื่นจิตต์ บุญเจิด สำหรับคำแนะนำและการสนับสนุนในการดำเนินงานวิจัย

นอกจากนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณ อ. วัชร จินตะโกวิช และอาจารย์ที่ได้ให้คำแนะนำ ตลอดจน นส. ปิยะพร ทองไทยสิน และนักศึกษาในห้องปฏิบัติการที่มีส่วนร่วมในงานวิจัยนี้ไว้ ณ.ที่นี้ด้วย

## Abstract

---

**Project Code:** MRG4980073

**Project Title:** Identification and Characterization of Chitinase Gene from Soil Fungal Community for Biological Control

**Investigator:** Dr. Thipa Asvarak

**Mentor:** Professor Dr. Watanalai Pangred

**Project Period:** 1 June 2006 - 1 June 2008 (2 years)

The objectives of this research are isolation of soil fungi with antagonistic activity against fungal phytopathogens, and cloning of chitinase gene from fungal isolate of interest. Total of 127 fungal isolates, obtained from 19 soil samples, were screened for the ability to produce chitinase. From these, 37 chitinase producing isolates were assayed for antagonistic activity against four fungal test strains, including *A. fumigatus* and three phytopathogens: *Cochliobolus heterostrophus*, *Colletotrichum gloeosporioides* and *Pythium ultimum*. Thirty-three isolates showed the ability to inhibit or alter growth of at least one fungal test strains, suggesting potential application of chitinase producing fungi in biological control of fungal pathogens. Molecular identification based on ITS1-5.8S-ITS2 region of rDNA suggested that most fungal isolates belong to genera *Aspergillus* and *Trichoderma*. Based on chitinase activity and molecular identification, a fungal isolate N3-1 (high similarity to *Trichoderma longibrachiatum*) was selected for cDNA library construction and cloning of chitinase gene. To identify clones carrying cDNA of chitinase genes, the constructed cDNA library was screened by PCR-based screening method, using primers specific to conserved region of chitinases and to vector. Several candidates were obtained, and will be characterized for chitinase cDNA inserts. Primers designed based on alignment of *Trichoderma* chitinases were also used to amplify fragment of chitinase gene from N3-1 genomic DNA. Resulting fragment was ligated into vector and transformed into *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ . A 1.2 kb fragment of chitinase gene, whose sequence showed highest similarity to *Hypocrea jecorina* chitinase gene *chi18-5*, was obtained. A full length fragment of this gene (approximate 1.5 kb) will be cloned. In addition, N3-1 was preliminary assayed for *in vivo* antagonistic activity against *Colletotrichum* spp. and *P. ultimum*. The results suggested potential application of chitinase producing fungal isolates as biological agents against fungal phytopathogens.

**Keywords:** fungi, chitinase, biological control, antagonist, chitinase gene

## บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG4980073

ชื่อโครงการ: การค้นหาเชื้อราและยีน chitinase ของเชื้อราจากดินเพื่อการควบคุมโรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา

ชื่อนักวิจัย: ดร. ทิพา อัครรักษ์

นักวิจัยที่ปรึกษา: ศาสตราจารย์ ดร.วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด

สถาบัน: ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ระยะเวลาโครงการ: 1 กรกฎาคม 2549 - 1 กรกฎาคม 2551 (2 ปี)

โครงการวิจัยนี้ต้องการค้นหาเชื้อราที่สามารถเป็น antagonist ต่อเชื้อราก่อโรคพืชและค้นหายีนที่สร้างเอนไซม์ chitinase ที่มีประสิทธิภาพสูงจากเชื้อรา โดยได้นำเชื้อรา 127 isolates ที่แยกได้จาก 19 ตัวอย่างดินมาคัดกรองหาเชื้อราที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ chitinase พบเชื้อราจำนวน 37 isolates ที่สามารถสร้าง chitinase ได้ เมื่อนำเชื้อราที่สร้าง chitinase ทั้ง 37 isolates มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราก่อโรค 4 สายพันธุ์ คือ *Aspergillus fumigatus* และเชื้อราที่ก่อโรคในพืช ได้แก่ *Cochliobolus heterostrophus*, *Colletotrichum gloeosporioides* และ *Pythium ultimum* พบว่ามีถึง 33 isolates ที่มีผลยับยั้งเชื้อราที่ใช้ในการทดสอบอย่างน้อยหนึ่งชนิดซึ่งแสดงให้เห็นถึงความน่าสนใจในการนำเชื้อราที่สร้าง chitinase มาใช้เป็น biological control agents จากการบ่งชี้สายพันธุ์ทางอนุชีววิทยาโดยอาศัยส่วน ITS1-5.8S-ITS2 ของ rDNA พบว่าเชื้อราเหล่านี้อยู่ใน genera *Aspergillus* และ *Trichoderma* เมื่อวิเคราะห์ chitinase activity แล้วจึงคัดเลือกเชื้อรา isolate N3-1 ซึ่งผลการบ่งชี้สายพันธุ์คล้ายคลึงกับ *Trichoderma longibrachiatum* และมี chitinase activity สูงมาใช้ในการสร้าง cDNA library และการ clone ยีน chitinase โดยได้คัดกรอง cDNA library เพื่อค้นหา clones ที่มีชิ้นส่วน chitinase cDNA ด้วย PCR-based screening โดยใช้ primers ที่จำเพาะต่อ conserved region ของ chitinase และ vector พบ candidates หลาย clones ซึ่งจะนำมา characterize ต่อไป และได้ใช้ primers ที่ออกแบบจาก alignment ของยีน chitinases ของ *Trichoderma* spp. ในการ amplify จาก N3-1 genomic DNA และ ligate เข้า vector แล้ว transform สู่ *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  พบว่าสามารถ clone ชิ้นส่วนของยีน chitinase ขนาด 1.2 kb ได้โดย sequence ของ fragment นี้มีความคล้ายคลึงสูงที่สุดกับ *chi18-5* ของ *Hypocrea jecorina* โดยจะทำการ clone full length fragment ขนาด 1.5 kb ของยีนนี้ต่อไป นอกจากนี้ยังได้ศึกษาความสามารถของ N3-1 ในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืช *Colletotrichum* spp. และ *P. ultimum* ในพืช ซึ่งผลการทดลองเบื้องต้นแสดงให้เห็นถึงความน่าสนใจในการนำเชื้อราสายพันธุ์นี้และเชื้อราที่สร้าง chitinase มาใช้ประโยชน์ในการควบคุมโรคพืชที่เกิดจากเชื้อราได้อีกด้วย

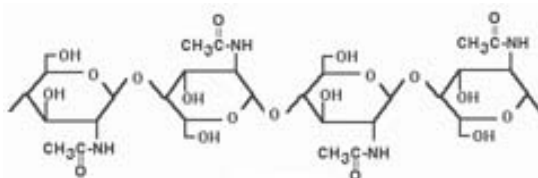
คำหลัก: fungi, chitinase, biological control, antagonist, chitinase gene

## บทนำ

จุลินทรีย์ที่อยู่ในดินมีบทบาทต่อการหมุนเวียนของสารอินทรีย์และต่อระบบชีวธรณีเคมีต่างๆ นอกจากนี้ จุลินทรีย์บางกลุ่มยังมีอิทธิพลต่อการควบคุมโรคและศัตรูพืชอีกด้วย ประชาคมจุลินทรีย์ในดินมีเชื้อราเป็นองค์ประกอบหลักที่มีสัดส่วนมากกว่าแบคทีเรีย นอกจากนี้คุณสมบัติที่แตกต่างจากแบคทีเรียหลายประการทำให้เชื้อราเป็น biocontrol agents ที่มีประสิทธิภาพ เช่น การเจริญเติบโตในลักษณะเส้นใยซึ่งทำให้เชื้อราสามารถครอบคลุมบริเวณได้กว้าง หรือการที่เชื้อราหลายชนิดสามารถบุกรุกแมลงศัตรูพืชได้โดยการทะลุผ่าน cuticle ของแมลงโดยตรงทำให้มีประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงได้หลายชนิด อย่างไรก็ตามเนื่องจากการศึกษาเชื้อราและยีนของเชื้อรามีความซับซ้อนจึงทำให้งานวิจัยส่วนใหญ่มักมุ่งเน้นไปที่การค้นหาแบคทีเรียหรือยีนจากแบคทีเรีย ดังนั้นยังมีเชื้อราอีกจำนวนมากที่ถูกมองข้ามไปและยังไม่ได้นำมาใช้ประโยชน์ จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการศึกษาวิจัยเพื่อใช้ประโยชน์เชื้อราและยีนของเชื้อราเหล่านี้ในการควบคุมโรคและศัตรูพืช

เชื้อราเป็นจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญในทางเทคโนโลยีชีวภาพอย่างมาก เชื้อราหลายชนิด เช่น เชื้อราใน genera *Trichoderma*, *Penicillium*, *Gliocladium*, *Fusarium* และ *Sporidesmium* ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น antagonist ต่อเชื้อโรคและศัตรูพืชได้นั้น เป็นที่รู้จักกันดีในฐานะ biocontrol agents ที่มีประสิทธิภาพสูงและมีคุณค่าในเชิงพาณิชย์ โดยเชื้อราเหล่านี้มักจะยับยั้งขั้นตอนในวัฏจักรชีวิตหรือวัฏจักรการก่อโรคของเชื้อโรคและศัตรูพืช กระบวนการที่เชื้อราเหล่านี้ใช้ในการควบคุมโรคและศัตรูพืชมีหลายแบบ ได้แก่ การสร้างสารปฏิชีวนะ (antibiotics), การหลั่งเอนไซม์ที่สลายผนังเซลล์ (cell wall degrading enzymes), การแข่งขันเพื่อแย่งอาหารและพื้นที่ (competition), การกระตุ้นระบบป้องกันของพืช (induced resistance) และ การเป็นปรสิตของเชื้อที่ก่อโรค (mycoparasitism) โดยอาจใช้เพียงกระบวนการหนึ่งหรืออาจใช้หลายกระบวนการร่วมกันก็ได้

Chitin เป็น สารอินทรีย์ที่มีมากเป็นอันดับที่สองรองจาก cellulose โดยเป็นโพลิเมอร์ของน้ำตาลอะมิโน *N*-acetyl-glucosamine (GlcNAc) เชื่อมต่อดด้วยพันธะ  $\beta$ -(1,4)-glycosidic linkage (รูปที่ 1) Chitin เป็นองค์ประกอบสำคัญที่พบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น ใน cell wall ของเชื้อรา, เปลือกของสัตว์พวกกุ้งกิ้งปู และ cuticle ของแมลง เป็นต้น



รูปที่ 1 โครงสร้างของ chitin

ผนังเซลล์ของเชื้อรามีส่วนประกอบหลักคือ polysaccharides จำพวก chitin และ glucan การหลั่งเอนไซม์ที่มีผลต่อส่วนประกอบเหล่านี้โดยเฉพาะเอนไซม์ chitinase ซึ่งมีผลต่อทั้งผนังเซลล์ของเชื้อราและต่อโครงสร้างของแมลงจึงเป็นคุณสมบัติที่สำคัญของจุลินทรีย์หลายชนิดที่ใช้เป็น biocontrol agents จากการเปรียบเทียบ amino acid sequence และโครงสร้างของ chitinase ได้มีการจัดเอนไซม์นี้อยู่ในกลุ่ม glycoside hydrolases family 18, family 19 และ family 20 โดย chitinase ที่สร้างโดยจุลินทรีย์ส่วนใหญ่อยู่ใน family 18 ซึ่งมี  $(\beta/\alpha)_8$ -barrel catalytic domain เหมือนกัน, มีกลไกของเอนไซม์แบบ retaining mechanism ซึ่งให้ chito-oligosaccharide แบบ  $\beta$ -anomeric และมีความไวต่อสาร allosamidin ซึ่งยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ เชื้อราจำนวนมากมีคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์ chitinase ทั้งนี้เอนไซม์ chitinase จากเชื้อราบางสายพันธุ์ เช่น

*Trichoderma* spp. ยังมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อราที่ก่อโรคพืชสูงกว่า chitinase ที่สร้างโดยยีนจากแบคทีเรียหรือพืชอีกด้วย ทำให้เชื้อราเป็นแหล่งที่น่าสนใจอย่างยิ่งในการค้นหา chitinase

งานวิจัยหลายชิ้นแสดงให้เห็นว่าการหลั่ง cell wall degrading enzymes เป็นกระบวนการหลักที่เชื้อราหลายชนิดใช้ในการเป็น antagonist ต่อเชื้อราที่ก่อโรคพืช เชื้อราหลายชนิดซึ่งเป็นที่รู้จักกันดีในฐานะ biocontrol agents ที่มีประสิทธิภาพสูงหรือมีความสามารถในการเป็น antagonist ต่อเชื้อราอื่นสามารถสร้างเอนไซม์พวก chitinase, glucanase และ protease ได้ โดยเอนไซม์ chitinase และ glucanase บริสุทธิ์จากเชื้อราเหล่านี้มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราอื่น หลักฐานดังกล่าวรวมกับความรู้อย่างยิ่งว่า chitin และ glucan เป็นองค์ประกอบหลักในผนังเซลล์ของเส้นใยเชื้อรา บ่งชี้ถึงบทบาทสำคัญของ chitinase และ glucanase ในการสลายผนังเซลล์ของเชื้อราที่ก่อโรคพืช ซึ่งนำไปสู่ความสามารถในการเป็น antagonist นอกจากนี้ chitin ยังเป็นองค์ประกอบสำคัญในโครงสร้างของแมลง เชื้อราที่สร้าง chitinase หลายชนิดสามารถรุกรานผ่าน cuticle ของแมลงและก่อให้เกิดโรคหรือการตายของแมลงได้ เชื้อราเหล่านี้หลายสายพันธุ์ได้ถูกนำมาใช้เป็น biocontrol agent ที่มีประสิทธิภาพสูง ซึ่งนอกจากการควบคุมศัตรูพืชแล้ว เชื้อราบางชนิด เช่น *Metarhizium anisopliae* ซึ่งมี host range กว้างและสามารถติดเชื้อในเห็บ *Boophilus microplus*, *Ixodes scapularum* และ *Rhipicephalus sanguineus* ได้นั้นยังสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการควบคุมแมลงที่เป็นศัตรูสัตว์ได้ด้วย ทำให้เอนไซม์ chitinase ได้รับความสนใจอย่างมากถึงแนวโน้มในการประยุกต์ใช้ในการผลิต biological control agents ได้มีรายงานผลงานวิจัยเพื่อประยุกต์ใช้เอนไซม์และยีนที่สร้างเอนไซม์นี้ในการควบคุมโรคและศัตรูพืช เช่น การแสดงออกของยีนสำหรับ chitinase จาก *Trichoderma* spp. ในพืชเพื่อเพิ่มความต้านทานการติดเชื้อรา, การแสดงออกของยีนที่ encode สำหรับเอนไซม์ chitinase ในยีสต์เพื่อใช้ในการจัดการโรคพืชทางชีววิธี เป็นต้น นอกจากนี้การ overexpress ยีน chitinase ยังสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการเป็น antagonist ของเชื้อราได้อีกด้วย เช่น transformants ของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ที่ overexpress ยีน chitinase ขนาด 33 kDa มีความสามารถในการย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อราสูงขึ้นถึง 200 เท่าและมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ก่อโรคพืช *Rhizoctonia solani* ได้ดีขึ้น และการ overexpress chitinase ขนาด 42 kDa ซึ่งมีบทบาทต่อความสามารถในการเป็น antagonist ของ *Trichoderma* spp. ต่อเชื้อรา *Botrytis cinerea* และ *R. solani* ก็ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืชทางชีววิธีเช่นกัน นอกเหนือไปจาก *Trichoderma* spp. แล้ว ยังมีงานวิจัยที่แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของเอนไซม์ chitinases ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราชนิดอื่น ตัวอย่างเช่น chitinases สองชนิดที่แยกบริสุทธิ์จากเชื้อรา *Talaromyces flavus* มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายผนังเซลล์และยับยั้งการ germination ของเชื้อราที่ก่อโรคพืชหลายชนิด งานวิจัยที่มีมาก่อนยังมีข้อจำกัดคือการศึกษาและประยุกต์ใช้ยีน chitinase จากแบคทีเรียนั้นไม่เหมาะสมที่จะนำเข้าสู่เชื้อรา เนื่องจากปัญหา codon bias, การ secrete และ processing ของเอนไซม์ที่ไม่เหมือนกันในระบบแบคทีเรียและเชื้อรา การค้นหาและศึกษาเชื้อราและยีน chitinases ของเชื้อราจากแหล่งธรรมชาติจึงจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการประยุกต์ใช้ในการควบคุมโรคและศัตรูพืชโดยชีววิธี ดังนั้นในโครงการวิจัยนี้จึงมุ่งหาเชื้อราที่เป็น antagonist ของเชื้อราที่ก่อโรคพืช และหายีน chitinase จากเชื้อราที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ได้สูงเพื่อนำไปสู่การประยุกต์ใช้โอกาสในเพิ่มความสามารถในการควบคุมโรคและศัตรูพืชของ biological control agent ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

## วัตถุประสงค์

- 1) เพื่อค้นหาและศึกษาเชื้อราจากดินที่มีคุณสมบัติเป็น antagonist ต่อเชื้อราที่ก่อโรคพืช
- 2) เพื่อค้นหาและ clone ยีน chitinase ของเชื้อราจากดินเพื่อใช้ในการเพิ่มประสิทธิภาพของ biological control agent

## วิธีทดลอง

### การแยกเชื้อราที่เพาะเลี้ยงได้จากตัวอย่างดินและทำให้บริสุทธิ์

เตรียมตัวอย่างดินโดยเก็บตัวอย่างที่อยู่ในระดับประมาณ 5-10 เซนติเมตรจากผิวน้ำดินและใช้ในการแยกเชื้อภายใน 48 ชั่วโมง โดยทำ serial dilutions ของแต่ละตัวอย่างดินปริมาณ 1 g และ spread แต่ละ dilution ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) และ chitin selective medium ทำ duplicate ของแต่ละ dilution จากนั้นบ่มที่ 30°C เป็นเวลา 7-14 วัน เมื่อเชื้อราเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วแยกเชื้อราที่มีลักษณะภายนอกที่แตกต่างกันในแต่ละตัวอย่างดินไปลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์และเก็บรักษาสายพันธุ์เชื้อราบริสุทธิ์เป็น stock culture ใน 25% glycerol ที่ -80°C

### การคัดกรองหาเชื้อราที่สร้างเอนไซม์ chitinase

การคัดกรองเชื้อราที่แยกได้จากตัวอย่างดินทำโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อราแต่ละ isolate ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ chitin selective medium ที่มี 2% colloidal chitin เป็นส่วนประกอบ และวิเคราะห์ความสามารถในการสร้างเอนไซม์ chitinase โดยสังเกตจากความสามารถในการเจริญบน chitin selective medium และการเกิด clear zone บริเวณรอบโคโลนี จากนั้นทำการ purify เชื้อราที่คัดเลือกมาด้วย hyphal tips method โดยการตัดชิ้นส่วน hyphal tips จากโคโลนีของเชื้อราแต่ละ isolates จำนวน 4 ชิ้นมาวางบนอาหาร chitin selective medium เมื่อเชื้อราเจริญแล้วและสังเกตเห็นการสร้าง clear zone รอบๆ โคโลนีที่เกิดขึ้นจึงตัดชิ้นส่วน hyphal tips มาวางบนอาหาร chitin selective medium ใหม่จนครบสามครั้ง แล้วจึงนำโคโลนีที่ผ่านการ purify โดย hyphal tip method มาวิเคราะห์การสร้างเอนไซม์ chitinase

### การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราที่ก่อโรค

นำเชื้อบริสุทธิ์ที่ผ่านการคัดกรองไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราก่อโรคในพืชด้วยวิธีการเพาะคู่กัน (dual cultures) โดยมีเชื้อราที่ใช้ทดสอบคือเชื้อราก่อโรคพืช 3 สายพันธุ์ คือ *Colletotrichum gloeosporioides* (anthracnose), *Cochliobolus heterostrophus* (Southern corn leaf blight) และ *Pythium ultimum* (rot และ damping-off) และ เชื้อราที่พบโดยทั่วไปอีก 1 สายพันธุ์คือ *Aspergillus fumigatus* (อาจก่อ Aspergillosis ในผู้ป่วยภูมิคุ้มกันบกพร่องได้) โดยตัดชิ้นวุ้นเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5 มิลลิเมตรจากบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อราที่แยกได้และเชื้อราทดสอบ (test strains) วางชิ้นวุ้นบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาด 9 cm ให้ชิ้นวุ้นทั้งสองอยู่ตรงกันข้ามกันและมีระยะห่างกันประมาณ 4 เซนติเมตร และบ่มที่ 30°C เพื่อสังเกตการที่เชื้อสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราที่ทดสอบ โดยสังเกตการยับยั้งคือขอบโคโลนีของเชื้อที่ทดสอบในด้านที่ติดกับเชื้อที่ยับยั้งจะเจริญเติบโตไม่ดีซึ่งอาจเห็นเป็นขอบเว้าเข้าหรือตัดตรง หรือมีการเจริญเติบโตที่ลดลงผิดปกติ

### การวิเคราะห์ activity ของเอนไซม์ chitinase

วัด activity ของ chitinase ของเชื้อราที่ผ่านการ screen โดยเลี้ยงเชื้อราใน chitin liquid medium ปริมาตร 75 ml และบ่มที่ 30°C, 200 rpm เก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมงเป็นเวลา 7 วัน โดย centrifuge แล้วนำ supernatant 150 µl มาหา activity ด้วยวิธี colorimetric assay โดยผสมกับ 150 µl 5% colloidal chitin และใช้ control คือ 150 µl supernatant + 150 µl 0.2 M acetate buffer pH 6.6 (enzyme control) และ 150 µl 5% colloidal chitin + 150 µl 0.2 M acetate buffer pH 6.6 (substrate control) จากนั้น incubate ที่ 37°C นาน 30

นาที่ นำไป centrifuge ที่ 10,000 rpm 10 นาที เติม 30  $\mu$ l of 0.8 M potassium tetraborate pH 9.1 ลงใน 150  $\mu$ l supernatant และหยุดปฏิกิริยาโดยการต้ม 3 นาทีและแช่ในน้ำแข็ง แล้วทำปฏิกิริยากับ 900  $\mu$ l 1 % pDAB ที่ 37°C นาน 20 นาที และวัดค่า absorbance ที่ 585 nm (activity ของ chitinase 1 unit เท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการปล่อย N-acetyl glucosamine 1  $\mu$ mol ใน 1 นาที)

#### การสกัด DNA ของเชื้อรา

เตรียม DNA โดยการ inoculate เชื้อราจาก stock culture ลงบน PDA และบ่มที่ 30°C เป็นเวลา 5-10 วัน จากนั้นจึงจะ inoculate ลงใน Potato Dextrose Broth (PDB) และบ่มที่ 30°C, 200 rpm เป็นเวลา 1 คืน กรองและนำ mycelium มาบดให้ละเอียดด้วย liquid nitrogen สกัด genomic DNA จาก mycelium ที่บดแล้วโดยใช้ DNeasy plant mini kit (Qiagen) หรือ rapid miniprep method (Lui et al, 2000) และตรวจสอบคุณภาพของ DNA โดย agarose gel electrophoresis

#### Molecular Identification

สกัดดีเอ็นเอด้วย DNeasy plant mini kit (Qiagen) จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้มาใช้เป็น template ในการทำ Polymerase Chain Reaction (PCR) ด้วย primers ที่จำเพาะต่อยีน ribosomal RNA (rDNA) ของเชื้อรา โดย primers ที่ใช้ในการทดลองนี้คือ ITS1 (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3') และ ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') (White et al, 1990) โดย PCR cycles ประกอบด้วย [94°C, 5 นาที; 35 cycles ของ (94°C, 30 วินาที; 55°C , 1 นาที; 72°C, 1 นาที 15 วินาที); 72°C, 5 นาที] (White et al, 1990) จากนั้นทำการ purify PCR product และใช้น้ำ purified product ไปทำ sequencing

#### Amplified rDNA Restriction Analysis (ARDRA)

นำ PCR products มา purify โดยใช้ Qiagen PCR purification kit (Qiagen) และย่อยด้วย restriction enzymes *Hae*III และ *Hin*fl และตรวจสอบ patterns ของ digests ที่ได้โดย gel electrophoresis เพื่อสังเกต pattern การย่อยของ *Hae*III และ *Hin*fl เพื่อจัดกลุ่มเชื้อราเหล่านี้โดยอาศัย restriction pattern ที่คล้ายคลึงหรือแตกต่างกัน

#### การ clone ยีน chitinase จาก genomic DNA ของเชื้อรา

ออกแบบ primers ที่ใช้ในการทำ PCR โดยการ alignment ของ sequences ของยีน chitinase จากเชื้อรา โดย primers G42F (5' atgttggttcctcctcgaaa 3'), G42R (5' ggggtatcgaaagagatgag 3') และ G42R2 (5' CTAGTTGAGACCGCTTCGGAT 3') ที่ใช้ในการทดลองนี้ได้จากการ alignment ของ DNA sequences ที่ encode ยีน endochitinase จากเชื้อรา *Trichoderma* spp. 5 สายพันธุ์ โดยคาดว่า G42F/G42R จะให้ product เป็น partial gene ขนาดประมาณ 1.2 kb และ G42F/G42R2 จะให้ product เป็น full length gene ขนาดประมาณ 1.5 kb และ purify product โดยใช้ Gel purification kit (Bioneer) จากนั้น ligate fragment ที่สนใจ โดยใช้ pGEM-T easy vector และ transform เข้า *E. coli* DH5 $\alpha$  เมื่อคัดเลือก transformants แล้วจึงสกัด plasmids โดยใช้ alkaline lysis method (Sambrook and Russell, 2001)

### การสร้าง cDNA library ของเชื้อรา

สำหรับการทำ cDNA library นั้น ผู้วิจัยต้องการเชื้อราที่เกิดจากสปอร์เพียงหนึ่งสปอร์ (single spore culture) เนื่องจากสปอร์เป็น haploid ดังนั้นโคโลนีที่เกิดจากหนึ่งสปอร์จึงเป็น uninuclear culture ดังนั้นจึงนำเชื้อรา N3-1 มาทำ single spore isolation โดยกระจายสปอร์จากโคโลนีในน้ำกลั่น sterile ที่มี tween 80 และนำสปอร์แต่ละสปอร์ไปวางบนอาหาร chitin selective medium สุดท้ายจึงได้ single spore isolates ซึ่งสามารถสร้าง clear zone บนอาหาร chitin selective medium

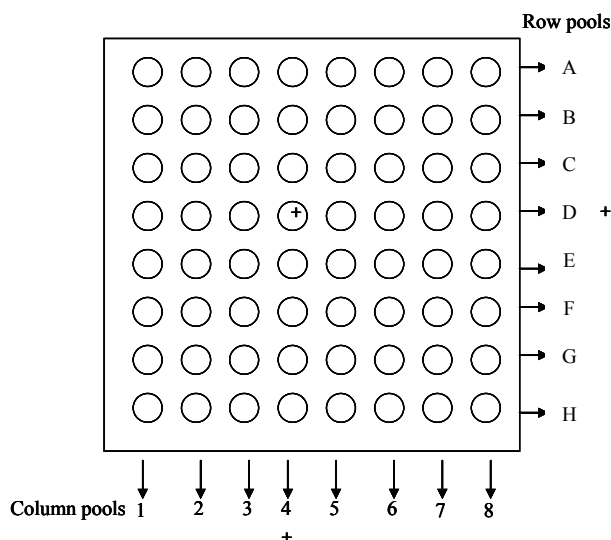
จากนั้นจึงสกัด RNA ของเชื้อรา N3-1 ในช่วงที่มีการแสดงออกของยีน chitinase โดย inoculate N3-1 จำนวน  $10^7$  spores ลงใน chitin liquid medium ปริมาตร 75 ml ใน flask ขนาด 250 ml และ incubate บน shaker ที่ 30°C เป็นเวลา 6 วัน จากนั้น harvest mycelia ของเชื้อราโดยการ filtration และ บด mycelia ใน liquid nitrogen จากนั้นจึงสกัด RNA โดยใช้ RNeasy plant minikit (Qiagen) จากนั้นเตรียม (polyA)+ mRNA โดยใช้ Oligotex mRNA kit (Qiagen) และใช้ poly(A)+ RNA ที่ได้ในการเตรียม cDNA library โดยใช้ ZAP-cDNA synthesis kit (Stratagene) ซึ่งวิธีการประกอบด้วยการสร้าง cDNA จาก (polyA)+ mRNA ประมาณ 5 µg โดยใช้ cDNA synthesis kit (Stratagene) จากนั้นนำ double strand cDNA มาเติม EcoRI adapter และย่อยด้วย XhoI จากนั้นจึงคัดเลือก cDNA ที่มีขนาดใหญ่โดยการทำ size fractionation ด้วย drip column ที่บรรจุด้วย Sepharose CL-2B filtration medium หลังจากเก็บ cDNA fraction (ประมาณ 100 µl/ fraction) แล้วประมาณปริมาณ cDNA ในแต่ละ fraction โดยใช้ Ethidium bromide plate assay เพื่อเลือก fractions ที่จะใช้ในการสร้าง cDNA library แล้วจึง ligate cDNA เข้าใน Uni-ZAP XR vector และ package เข้า phage โดยใช้ Gigapack III XL packaging extract (Stratagene) เมื่อได้ primary library แล้วจึง amplify library ที่ได้โดยใช้แบคทีเรีย XL1-Blue MRF' cells และเก็บ library ไว้ที่ 4°C (ใน 0.3% chloroform) และที่ -80°C (ใน 7% DMSO)

### การคัดกรอง cDNA library โดยการทำให้ PCR-based screening method

การทำ PCR-based screening method ใช้วิธีที่ประยุกต์จาก PCR-based Method for Screening Libraries (Israel, 2003) โดย primers ที่ใช้ในการทดลองประกอบด้วย Con2F (5' TTTGACGGTATTGATATCGACATTG 3') และ Con2R (5' GGTGTATCATACTCGTGCAAAC 3') ซึ่งออกแบบจาก alignment ของ amino acid sequence ของยีน chitinase จากเชื้อราสายพันธุ์ต่างๆ โดยคาดว่าจะให้ PCR product ประมาณ 500 bp และ primers T3 (5' AATTAACCCTCACTAAAGGG 3') และ T7 (5' GTAATACGACTCACTATAGGGC 3') ซึ่งจำเพาะต่อ Uni-ZAP XR vector ที่ใช้ในการสร้าง cDNA library

สำหรับ primary screening ผสม 1 ml SM buffer ที่มี  $3 \times 10^6$  pfu phages กับ 1 ml overnight culture แบคทีเรีย XL1-Blue MRF' บ่มที่ 37°C, 15 นาที จากนั้นเติม 18 ml LB+ (supplemented ด้วย 10mM MgSO<sub>4</sub>) แล้วแบ่ง suspension ลงใน microcentrifuge tube จำนวน 64 tubes (100 µl/tube) โดยเรียงเป็น 8x8 matrix (รูปที่ 2) แล้วบ่มที่ 37°C, 200 rpm ประมาณ 5 ชั่วโมง จากนั้น pool แต่ละ row และ แต่ละ column (20 µl จากแต่ละ tube) เข้าด้วยกัน ดังนั้นจึงได้เป็น pool ของ phage suspension จำนวน 16 pools และใช้ 1 µl ของแต่ละ pool เป็น template ในการทำ PCR เมื่อพบ tube ที่เป็นจุดตัดระหว่าง positive row และ positive column แล้ว จึงใช้ phage suspension นั้นในการทำ secondary screening ต่อไป โดยนำ phage suspension นี้มา ผสมกับ แบคทีเรีย XL1-Blue MRF' แล้วแบ่งเป็น 64 tubes (8x8 matrix) อีกครั้ง และใช้ pools จำนวน 16 pools เป็น template ในการทำ PCR เช่นเดียวกับการ screen ครั้งแรก และคัดเลือก phage suspensions ที่เป็นจุดตัดระหว่าง positive row และ positive column มาใช้ในการทำ tertiary screening อีกครั้ง เมื่อได้ phage suspension ที่เป็น candidate จาก tertiary screening แล้วจึง plate 100 pfu ลงบน NZY agar และสุ่มเลือก

plaques มา diffuse ใน SM แล้วใช้ phage suspension ที่ได้จากแต่ละ plaque เป็น template ในการทำ PCR เพื่อบ่งชี้ positive plaques



**รูปที่ 2** การทำ pools ของ phage suspension สำหรับ PCR-based screening ของ cDNA library (adapted from Israel, 2003)

#### การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราที่ก่อโรคในพืช (*in vivo* assay)

เชื้อราที่ก่อโรคพืชที่ใช้ทดสอบประกอบด้วย *Colletotrichum* spp. (anthracnose) 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *C. capsici* -1511 (C-1511) และ *C. gloeosporioides*-1060 (C-1060) และ *Pythium ultimum* (root rot and damping-off)

สำหรับ *Colletotrichum* spp. ทำการทดสอบใน post harvest โดยใช้ผลพริกชี้ฟ้าและพริกหยวก ในการทดลอง ในการทดลองนี้เตรียม suspension ของ *Colletotrichum* spp. โดยเพาะเชื้อราลงบน PDA และบ่มที่ 30°C เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นชุดเส้นใยของเชื้อรา 1 plate ผสมลงในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 10 ml แล้วผสมอย่างแรงให้เข้ากันเพื่อใช้เป็น suspension ในการ inoculate พืช สำหรับเชื้อรา N3-1 ที่ใช้เป็น treatment นั้นเตรียม inoculum 2 แบบคือเป็น spore suspension ( $10^8$  spores/ml) และ culture filtrate ซึ่งได้จากการบ่มเชื้อรา N3-1 ใน chitin liquid medium ที่ 30°C, 2000 rpm เป็นเวลา 6 วัน จากนั้นคัดเลือกผลพริกที่ขนาดใกล้เคียงกันมาทำ surface sterilization แล้วสร้างแผลบนผลพริกและ treat ด้วย treatment ต่างๆ ดังนี้ 1) treated ด้วยน้ำกลั่นที่ปลอดเชื้อ, 2) treated ด้วย N3-1 culture filtrate, 3) treated ด้วย N3-1 spore suspension ( $10^8$  spores/ml), 4) treated ด้วย suspension ของ *Colletotrichum* spp., 5) treated ด้วย suspension ของ *Colletotrichum* spp. และ culture filtrate culture filtrate ของเชื้อรา และ 6) treat ด้วย suspension ของ *Colletotrichum* spp. และ N3-1 spore suspension ( $10^8$  spores/ml) โดยแต่ละ treatment ใช้ 25  $\mu$ l สำหรับพริกชี้ฟ้าและ 50  $\mu$ l สำหรับพริกหยวก จากนั้นบ่มผลพริกจากทุก treatment ใน moisture chamber ที่อุณหภูมิห้องและสังเกตความเปลี่ยนแปลงของแผลและขนาดของแผลทุก 24 ชั่วโมงเป็นเวลา 7 วัน โดยทำการทดลองซ้ำ 5 replicates (แต่ละ replicate ใช้ 1 ผล/1 treatment)

สำหรับ *P. ultimum* ทำการทดสอบในพริกและแตงกวา โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ชุด คือปลูกในดินที่ปลอดเชื้อและดินที่คลุก suspension ของ *P. ultimum* ซึ่งเตรียมโดยเพาะเชื้อราลงบน PDA และบ่มที่ 30°C

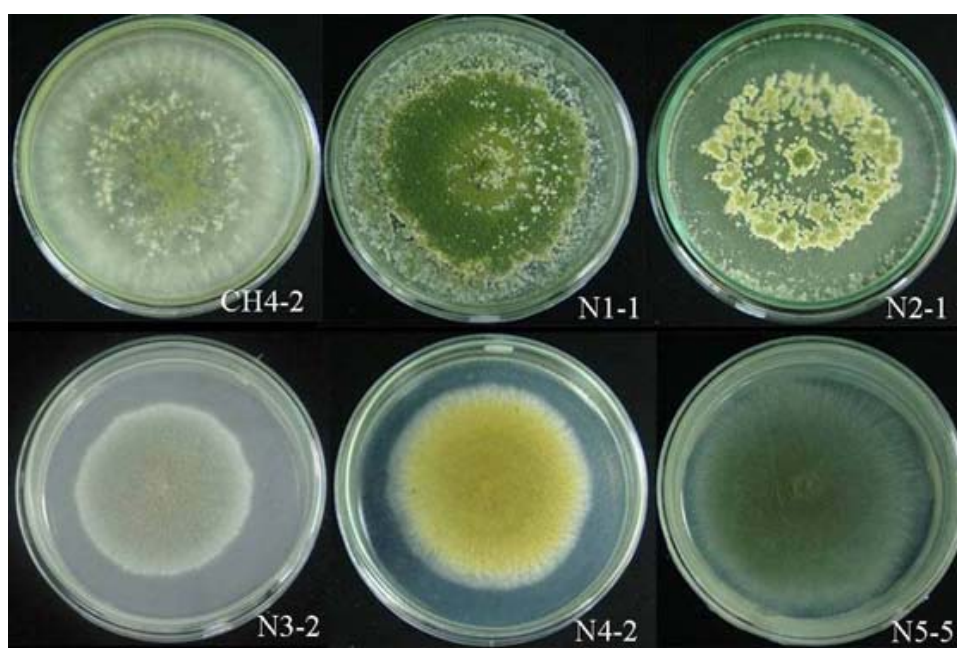
เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นชุดเส้นใยของเชื้อรา 1 plate ผสมลงในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 10 ml แล้วผสมอย่างแรงให้เข้ากัน เพื่อใช้เป็น suspension สำหรับคลุกในดิน โดยใช้ *P. ultimum* 5 plates ต่อดินฆ่าเชื้อ 1 กิโลกรัม โดยแต่ละชุดการทดลองประกอบด้วย treatment ต่างๆ ดังนี้ 1) เมล็ด treated ด้วยน้ำกลั่นที่ปลอดเชื้อ, 2) เมล็ด treated ด้วย N3-1 spore suspension ( $10^8$  spores/ml), 3) เมล็ดปลูกในดินที่คลุก N3-1 spore suspension, 4) เมล็ด treated ด้วย N3-1 culture broth โดยแต่ละ treatment ปลูกพืช 5 เมล็ด/กระถางขนาด 2 นิ้ว (ดิน 150 g) ทำซ้ำ 3 replicates รดด้วยน้ำปลอดเชื้อกระถางละ 30 มิลลิลิตร จากนั้นห่อกระถางด้วยถุงพลาสติกแล้วบ่มใน growth chamber ที่อุณหภูมิ 28 °C ควบคุมการให้แสงวันละ 16 ชั่วโมง เป็นเวลา 7-14 วัน และบันทึกผลการงอกและลักษณะการเจริญของต้นกล้า

## ผลการทดลอง

### การแยกเชื้อราที่เพาะเลี้ยงได้จากตัวอย่างดินและการคัดกรองเชื้อราที่สร้างเอนไซม์ chitinase

ในงานวิจัยนี้ได้นำตัวอย่างดินจากแหล่งต่างๆ จำนวน 19 ตัวอย่างมาใช้ในการแยกเชื้อราโดย spread dilutions ต่างๆของทั้ง 19 ตัวอย่างดินลงบนอาหาร PDA แล้วแยกเชื้อราที่มีลักษณะภายนอกที่แตกต่างกันในแต่ละตัวอย่างดินไปลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์เพื่อนำไปคัดกรองหาเชื้อราที่สามารถสร้าง chitinase บน chitin selective medium ต่อไป นอกจากการแยกเชื้อราบน PDA แล้ว ยังได้ทำการ spread dilutions ต่างๆ ของตัวอย่างดิน 7 ตัวอย่างลงบน chitin selective medium โดยตรง และคัดเลือกเชื้อราที่มีลักษณะภายนอกที่แตกต่างกันไปมาแยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์

จากนั้นจึงนำเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้ทั้งหมด 127 isolates ไปทดสอบคัดกรองหาเชื้อราที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ chitinase โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อราแต่ละ isolate ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ chitin selective medium พบเชื้อราจำนวน 37 isolates ที่สามารถเจริญได้ดีบน chitin selective medium และมีการสร้าง clear zone บน chitin selective medium หรือทำให้อาหาร chitin selective medium สีขึ้นอย่างเห็นได้ชัด ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยเก็บเชื้อราที่ผ่านการคัดกรองนี้ไว้เป็น glycerol stock ที่  $-80^{\circ}\text{C}$  เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป ตัวอย่างเชื้อรา ที่สามารถเจริญได้ดีบน chitin selective medium แสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 3 ตัวอย่างเชื้อราที่แยกได้และผ่านการคัดกรองการสร้างเอนไซม์ chitinase

ตารางที่ 1 จำนวนเชื้อราที่นำมาคัดกรองหาเชื้อราที่สร้างเอนไซม์ chitinase บน chitin selective medium

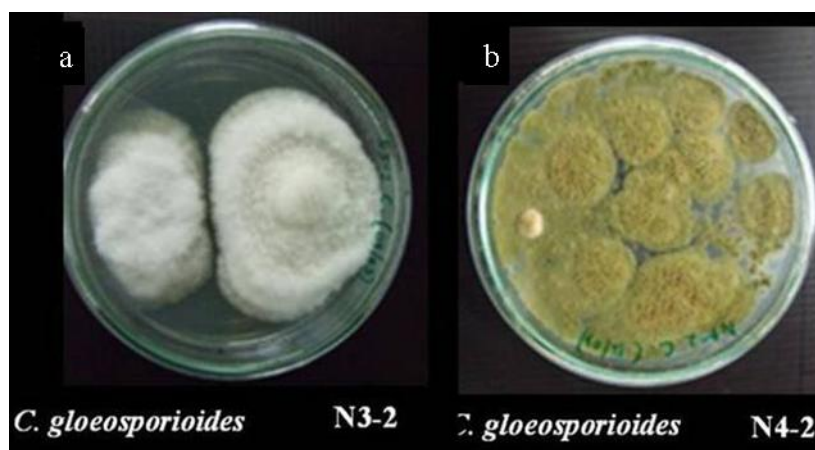
| Soil sample # | แหล่งตัวอย่าง | จำนวน isolates แยกได้บน PDA | จำนวน isolates แยกได้บน chitin selective medium | รวมจำนวนเชื้อราที่แยกได้จากตัวอย่างดิน | จำนวน isolates ที่สร้าง chitinase | Fungal isolates # ที่สร้าง chitinase |
|---------------|---------------|-----------------------------|-------------------------------------------------|----------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|
| CH1           | กรุงเทพ       | 6                           | ND                                              | 6                                      | 5                                 | CH1-2, CH1-4, CH1-5, CH1-6, CH4-1    |
| CH2           | กรุงเทพ       | 4                           | ND                                              | 4                                      | 0                                 | -                                    |
| CH3           | นครปฐม        | 11                          | ND                                              | 11                                     | 0                                 | -                                    |
| CH4           | กรุงเทพ       | 3                           | ND                                              | 3                                      | 2                                 | CH4-2, CH4-3                         |
| CH5           | กรุงเทพ       | 9                           | ND                                              | 9                                      | 3                                 | CH5-2, CH5-5, CH5-6                  |
| CH6           | นครปฐม        | 5                           | ND                                              | 5                                      | 4                                 | CH6-1, CH6-2, CH6-3, CH6-5           |
| CH7           | กรุงเทพ       | 2                           | ND                                              | 2                                      | 0                                 | -                                    |
| CH8           | กรุงเทพ       | 4                           | ND                                              | 4                                      | 0                                 | -                                    |
| N1            | กรุงเทพ       | 6                           | ND                                              | 6                                      | 1                                 | N1-3                                 |
| N2            | กรุงเทพ       | 2                           | ND                                              | 2                                      | 1                                 | N2-2                                 |
| N3            | กรุงเทพ       | 6                           | ND                                              | 6                                      | 2                                 | N3-1; N3-2                           |
| N4            | สมุทรปราการ   | 9                           | ND                                              | 9                                      | 3                                 | N4-2; N4-3; N4-7                     |
| N5            | สุพรรณบุรี    | 0                           | 7                                               | 7                                      | 3                                 | N5-2; N5-3; N5-5                     |
| N6            | เพชรบูรณ์     | 3                           | 5                                               | 8                                      | 2                                 | N6-1; N6-3                           |
| N7            | กรุงเทพ       | 8                           | 1                                               | 9                                      | 4                                 | N7-1; N7-2; N7-3; N7-4               |
| N8            | เพชรบูรณ์     | 5                           | 4                                               | 9                                      | 3                                 | N8-1; N8-2; N8-3                     |
| N9            | เพชรบูรณ์     | 9                           | 4                                               | 13                                     | 4                                 | N9-4; N9-5; N9-7; N9-13              |
| N10           | เพชรบูรณ์     | 5                           | 3                                               | 8                                      | 0                                 | -                                    |
| N11           | เพชรบูรณ์     | 3                           | 3                                               | 6                                      | 0                                 | -                                    |
| รวม           | 19            | 100                         | 27                                              | 127                                    | 37                                |                                      |

หมายเหตุ: ND = Not Done

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราที่ก่อโรคในพืช (in vitro assay)

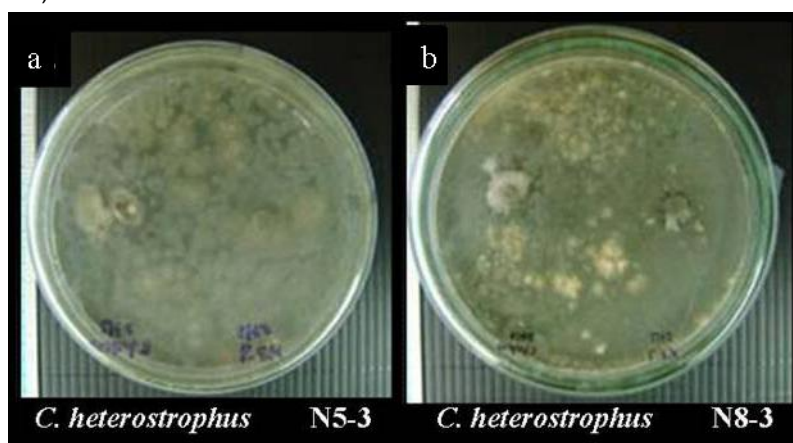
ในการทำ *in vitro* assay เพื่อศึกษาความสามารถในการเป็น antagonist ของเชื้อราที่ผ่านการคัดกรองแล้วว่าสร้าง chitinase ต่อเชื้อราที่ก่อโรคนั้น ได้นำเชื้อราที่สร้าง chitinase ทั้ง 37 isolates ที่มีความสามารถในการสร้าง chitinase มาทำทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราที่ก่อโรคด้วยวิธี dual cultures กับเชื้อรา 4 สายพันธุ์ เชื้อราที่ก่อโรคในพืช 3 ชนิด ได้แก่ *Cochliobolus heterostrophus* ซึ่งก่อให้เกิดโรค Southern corn leaf blight ในข้าวโพด, *Colletotrichum gloeosporioides* ซึ่งก่อโรค anthracnose และ *Pythium ultimum* ซึ่งก่อโรครากเน่าในพืชหลายชนิด และ *Aspergillus fumigatus* ซึ่งเป็นเชื้อราที่พบได้ทั่วไปและสามารถก่อให้เกิดอาการภูมิแพ้และ aspergillosis ในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่องได้

จากการทดลองพบว่ามีเชื้อราจำนวน 33 isolates ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *C. gloeosporioides* ได้ ได้แก่ CH1-2, CH1-4, CH1-6, CH4-1, CH4-3, CH5-5, CH5-6, CH6-2, CH6-3, CH6-5, N1-3, N2-2, N3-1, N3-2, N4-2, N4-3, N4-7, N5-2, N5-3, N5-5, N6-1, N6-3, N7-1, N7-2, N7-3, N7-4, N8-1, N8-2, N8-3, N9-4, N9-5, N9-7, N9-13 (รูปที่ 4)



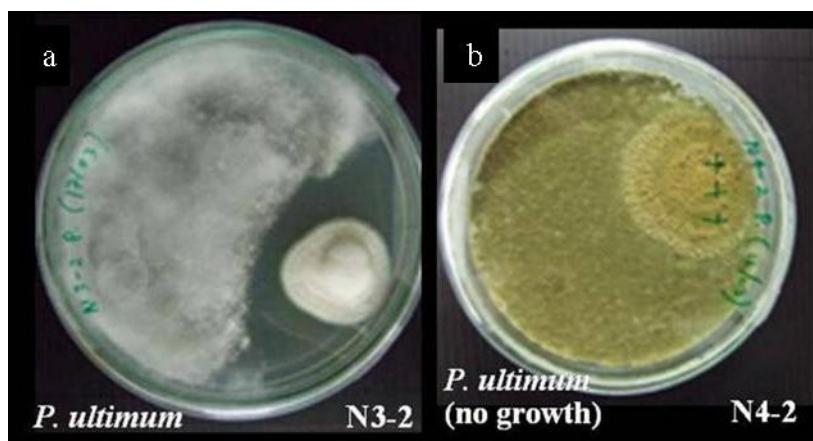
รูปที่ 4 ตัวอย่าง dual culture plates ที่ fungal isolates N3-2 (4a) และ N4-2 (4b) มีผลต่อการเจริญของ *C. gloeosporioides*

มีเชื้อราจำนวน 2 isolates ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *C. heterostrophus* ได้ ได้แก่ N5-3 และ N8-3 (รูปที่ 5)



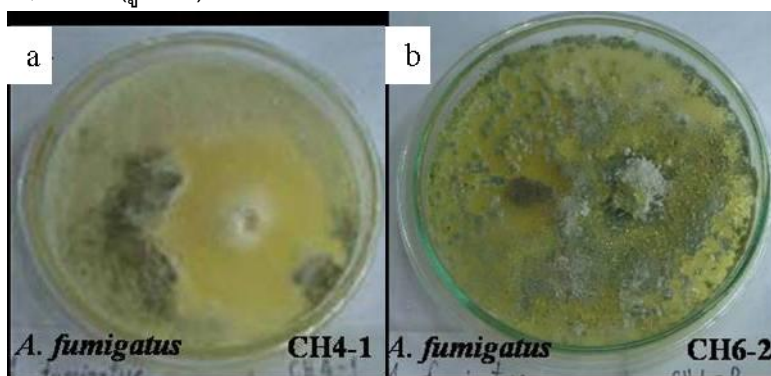
รูปที่ 5 ตัวอย่าง dual culture plates ที่ fungal isolates N5-3 (3a) และ N8-3 (3b) มีผลต่อการเจริญของ *C. heterostrophus*

นอกจากเชื้อราก่อโรคที่เป็น true fungi แล้ว ยังได้ศึกษาความสามารถของเชื้อราที่แยกได้ในการยับยั้งการเจริญของ *Pythium ultimum* ซึ่งเป็นเชื้อราในกลุ่ม Oomycota อีกด้วย *P. ultimum* เป็นเชื้อราที่ก่อโรคเน่า (rot และ damping-off) ในพืชหลายชนิด ถึงแม้ว่าเชื้อราในกลุ่ม Oomycota จะไม่ได้มี chitin เป็นองค์ประกอบหลักของ cell wall แต่จากการทดสอบพบว่าเชื้อราที่สร้าง chitinase จำนวน 32 isolates ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *P. ultimum* ได้ ได้แก่ CH1-2; CH1-4; CH1-6; CH4-1; CH4-3; CH5-5; CH5-6; CH6-2; CH6-3; N1-3; N2-2; N3-1; N3-2; N4-2; N4-3; N4-7; N5-2; N5-3; N5-5; N6-1; N6-3; N7-1; N7-2; N7-3; N7-4; N8-1; N8-2; N8-3; N9-4; N9-5; N9-7; N9-13 (รูปที่ 6)



รูปที่ 6 ตัวอย่าง dual culture plates ที่ fungal isolates N3-2 (6a) และ N4-2 (6b) ซึ่งสามารถสร้าง chitinase ได้มีผลต่อการเจริญของ *P. ultimum*

จากเชื้อราที่แยกได้และผ่านการคัดกรองว่ามีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ chitinase จำนวน 37 isolates พบว่า มีเชื้อราจำนวน 19 isolates ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *A. fumigatus* ได้ ได้แก่ CH1-4, CH1-6, CH4-1, CH6-2, CH6-5, N1-3, N2-2, N3-1, N4-2, N4-7, N5-2, N5-3, N6-3, N7-3, N7-4, N8-1, N9-4, N9-7, N9-13 (รูปที่ 5)



รูปที่ 7 ตัวอย่าง dual culture plates ที่ fungal isolates CH4-1 (7a) และ CH6-2 (7b) มีผลต่อการเจริญของ *A. fumigatus*

ดังนั้นจาก *in vitro* assay พบว่าจากเชื้อราที่มีความสามารถในการสร้าง chitinase จำนวน 37 isolates มีถึง 33 isolates ที่มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ใช้ในการทดสอบอย่างน้อยหนึ่งชนิด ดังแสดงในตารางที่ 2 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อราที่สร้าง chitinase เป็นเชื้อราที่มีความน่าสนใจอย่างยิ่งในการนำมาใช้เป็น biological control agent

ตารางที่ 2 สรุปผลการทดสอบการยับยั้งของ fungal isolates ที่มีความสามารถสร้าง chitinase และยับยั้งเชื้อราก่อโรค

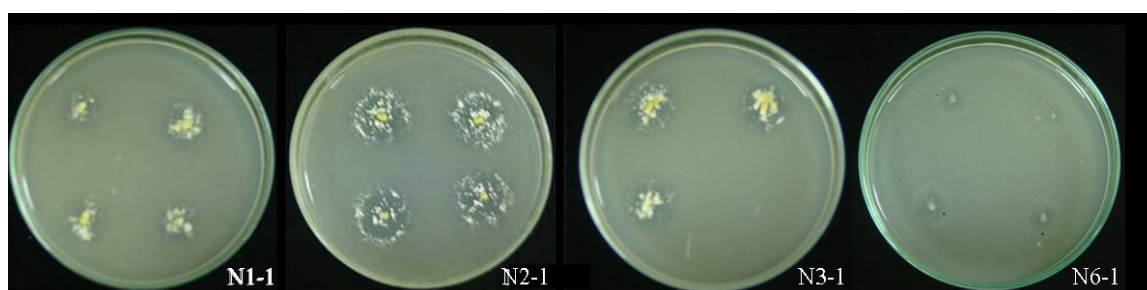
| Fungal Isolates | การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา |                          |                   |                     |
|-----------------|------------------------------------|--------------------------|-------------------|---------------------|
|                 | <i>C. gloeosporioides</i>          | <i>C. heterostrophus</i> | <i>P. ultimum</i> | <i>A. fumigatus</i> |
| CH1-2           | +                                  | -                        | +                 | -                   |
| CH1-4           | ++                                 | -                        | ++                | +++                 |
| CH1-5           | -                                  | -                        | -                 | -                   |
| CH1-6           | ++                                 | -                        | ++                | ++                  |
| CH4-1           | +++                                | -                        | +++               | ++                  |
| CH4-2           | -                                  | -                        | -                 | -                   |
| CH4-3           | ++                                 | -                        | ++                | -                   |
| CH5-2           | -                                  | -                        | -                 | -                   |
| CH5-5           | +                                  | -                        | +                 | -                   |
| CH5-6           | +                                  | -                        | ++                | -                   |
| CH6-1           | -                                  | -                        | -                 | -                   |
| CH6-2           | ++                                 | -                        | ++                | +++                 |
| CH6-3           | +++                                | -                        | +++               | -                   |
| CH6-5           | +++                                | -                        | -                 | +++                 |
| N1-3            | +++                                | ND                       | +++               | ++                  |
| N2-2            | ++                                 | ND                       | ++                | +++                 |
| N3-1            | +++                                | -                        | +++               | ++                  |
| N3-2            | ++                                 | ND                       | ++                | -                   |
| N4-2            | +++                                | ND                       | +++               | +                   |
| N4-3            | ++                                 | -                        | ++                | -                   |
| N4-7            | +++                                | -                        | +++               | +++                 |
| N5-2            | +                                  | -                        | +                 | +++                 |
| N5-3            | ++                                 | +                        | ++                | +++                 |
| N5-5            | +++                                | -                        | +++               | -                   |
| N6-1            | +                                  | -                        | +                 | -                   |
| N6-3            | +                                  | -                        | +                 | +++                 |
| N7-1            | +++                                | -                        | +++               | -                   |
| N7-2            | +++                                | -                        | +++               | -                   |
| N7-3            | +++                                | -                        | +++               | +++                 |
| N7-4            | +++                                | -                        | +++               | +++                 |

| Fungal Isolates | การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา |                          |                   |                     |
|-----------------|------------------------------------|--------------------------|-------------------|---------------------|
|                 | <i>C. gloeosporioides</i>          | <i>C. heterostrophus</i> | <i>P. ultimum</i> | <i>A. fumigatus</i> |
| N8-1            | +++                                | ND                       | +++               | ++                  |
| N8-2            | ++                                 | -                        | ++                | -                   |
| N8-3            | +++                                | +                        | +++               | -                   |
| N9-4            | +                                  | -                        | +                 | +                   |
| N9-5            | +                                  | -                        | +                 | -                   |
| N9-7            | +++                                | -                        | ++                | +++                 |
| N9-13           | ++                                 | -                        | +++               | +++                 |
| รวม             | 33                                 | 2                        | 33                | 19                  |

หมายเหตุ: + = weak inhibition; ++ = strong inhibition; +++ = very strong inhibition; - = no inhibition; ND = Not Done

#### การวิเคราะห์ activity ของเอนไซม์ chitinase

จากการคัดกรองเชื้อราที่มีความสามารถในการสร้าง chitinase ด้วย chitin selective agar ได้คัดเลือกเชื้อราที่น่าจะมีความสามารถในการสร้าง chitinase สูง โดยเชื้อราเหล่านี้สามารถเจริญได้บนอาหาร chitin selective medium และย่อย chitin ในอาหารจนเกิดเป็น clear zone โดยได้ทำการ purify เชื้อราที่คัดเลือกมาด้วย hyphal tips method โดยการตัดชิ้นส่วน hyphal tips จากโคโลนีของเชื้อราแต่ละ isolates จำนวน 4 ชิ้นมาวางบนอาหาร chitin selective medium เมื่อเชื้อราเจริญแล้วและสังเกตเห็นการสร้าง clear zone รอบๆ โคโลนีที่เกิดขึ้นจึงตัดชิ้นส่วน hyphal tips มาวางบนอาหาร chitin selective medium ใหม่จนครบสามครั้ง จากนั้นจึงนำโคโลนีที่ผ่านการ purify โดย hyphal tip method มาวิเคราะห์การสร้างเอนไซม์ chitinase โดยวิธี colorimetric method ดังแสดงในรูปที่ 8



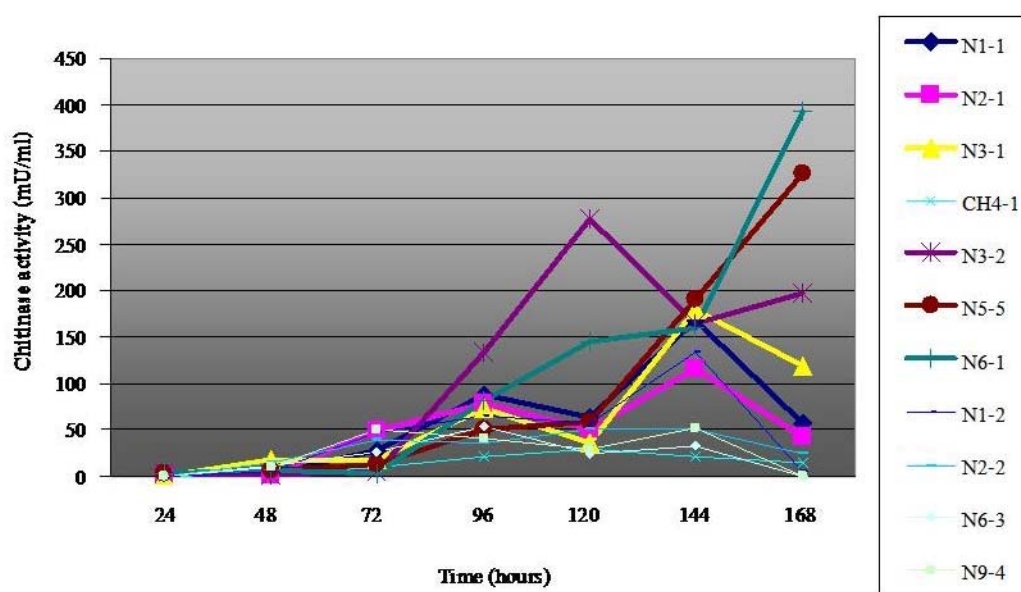
รูปที่ 8 ตัวอย่างการ purify เชื้อราโดยการนำ hyphal tips method โดยวาง hyphal tips บนอาหาร chitin selective media และสังเกต clear zone รอบๆ โคโลนี

จากการวิเคราะห์การสร้างเอนไซม์ chitinase ของเชื้อราที่ผ่านการคัดเลือกจำนวน 11 isolates ได้แก่ N1-1, N1-2, N2-1, N2-2, N3-1, N3-2, N5-5, N6-1, N6-3, N9-4 และ CH4-1 ในอาหารเหลวที่มี chitin โดยเก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมงเป็นเวลา 168 ชั่วโมง (7 วัน) และนำตัวอย่างไปหาค่า chitinase activity โดยวิธี colorimetric method พบว่าเชื้อราที่คัดเลือกมาส่วนใหญ่สร้างเอนไซม์เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนหลังจาก

inoculation เป็นเวลา 96 ชั่วโมงและส่วนใหญ่มีค่า activity สูงสุดของ chitinase ได้ในหลังจาก inoculation เป็นเวลา 144 ชั่วโมง ดังแสดงในตารางที่ 3 และรูปที่ 9

ตารางที่ 3 แสดงค่าเฉลี่ยของ chitinase activity ของเชื้อราทั้ง 11 isolates ณ. เวลาต่างๆ

| Isolates # | Chitinase Activity (mU/ml) ณ. เวลาต่างๆ |        |        |             |              |              |              |
|------------|-----------------------------------------|--------|--------|-------------|--------------|--------------|--------------|
|            | 24 ชม.                                  | 48 ชม. | 72 ชม. | 96 ชม.      | 120 ชม.      | 144 ชม.      | 168 ชม.      |
| N6-1       | 2.9                                     | 7.3    | 2.8    | 82.0        | 145.3        | 159.0        | <b>392.6</b> |
| N5-5       | 2.5                                     | 6.7    | 12.7   | 51.1        | 58.9         | 190.0        | <b>326.8</b> |
| N3-2       | 2.8                                     | 1.1    | 5.7    | 133.1       | <b>276.5</b> | 165.4        | 198.1        |
| N3-1       | 0                                       | 17.5   | 17.7   | 72.8        | 36.4         | <b>269.4</b> | 119.4        |
| N1-1       | 1.1                                     | 2.7    | 27.8   | 88.1        | 63.3         | <b>167.7</b> | 57.5         |
| N2-1       | 1.4                                     | 1.9    | 48.9   | 77.7        | 49.8         | <b>146.3</b> | 41.8         |
| N1-2       | 0                                       | 5.7    | 46.8   | 64.6        | 56.5         | <b>133.9</b> | 5.0          |
| N9-4       | 0.5                                     | 10.1   | 49.9   | 41.2        | 29.5         | <b>52.8</b>  | 0            |
| N6-3       | 0                                       | 12.0   | 26.9   | <b>53.5</b> | 25.2         | 32.7         | 0            |
| N2-2       | 0                                       | 14.3   | 39.5   | 36.5        | 49.8         | <b>50.0</b>  | 24.8         |
| CH4-1      | 0.2                                     | 1.9    | 9.2    | 20.9        | <b>29.5</b>  | 18.6         | 15.0         |

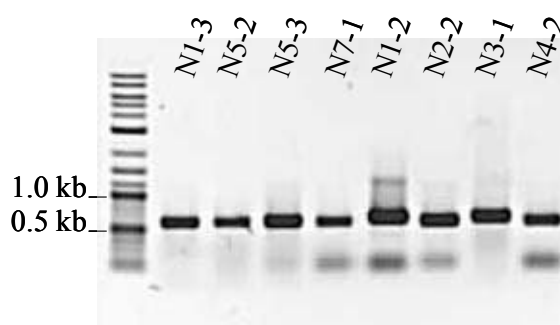


รูปที่ 9 กราฟแสดงค่า chitinase activity ของเชื้อราทั้ง 11 isolates ณ. เวลาต่างๆ

จากการเปรียบเทียบค่า activity ของ chitinase พบว่าเชื้อราที่มี activity สูงที่สุดคือเชื้อราสายพันธุ์ N6-1, N5-5 and N3-2 ซึ่งมีลักษณะ morphology คล้ายคลึงกับเชื้อราใน genus *Aspergillus* และเชื้อราสายพันธุ์ N3-1, N1-1 and N2-1 ซึ่งมีลักษณะ morphology คล้ายคลึงกับเชื้อราใน genus *Trichoderma* ตามลำดับ

### การศึกษาทางอนุชีววิทยาของเชื้อราที่สร้าง chitinase

ได้ทำการศึกษาทางอนุชีววิทยาสำหรับเชื้อรา isolates ที่น่าสนใจทั้งการบ่งชี้สายพันธุ์โดยอาศัย rDNA sequences และการทำ amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) เพื่อช่วยในการจัดกลุ่มของเชื้อราที่อาจมี sequences คล้ายคลึงกัน โดยนำมาสกัดดีเอ็นเอด้วย DNeasy plant mini kit (Qiagen) จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้มาใช้เป็น template ในการทำ Polymerase Chain Reaction (PCR) ด้วย primers ที่จำเพาะต่อส่วน ITS1-5.8s-ITS2 ของยีน ribosomal RNA (rDNA) ของเชื้อรา จากนั้นจึงตรวจสอบขนาดของ products ที่ได้โดย gel electrophoresis พบว่าสามารถได้ PCR products จากทุก isolates ดังแสดงในรูปที่ 10

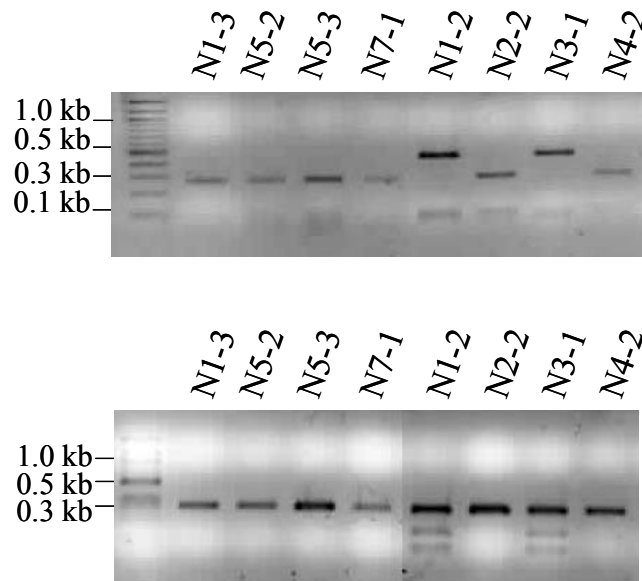


รูปที่ 10 ตัวอย่างผลผลิตจากการทำ PCR โดยใช้ primers ITS1 และ ITS4

เมื่อนำ PCR products มา purify และนำไปทำ sequencing โดยใช้ primer ITS1 ที่ใช้ในการทำ PCR และเปรียบเทียบ sequence กับ database จากผลการทำ sequencing ของเชื้อราจำนวน 23 isolates พบว่า sequences ของเชื้อราเหล่านี้มีความคล้ายคลึงกับเชื้อรา *Trichoderma longibrachiatum* (N1-1, N1-2, N2-1, N3-1, N7-2 และ CH6-2), *Trichoderma reesei* (CH4-1), *Aspergillus fumigatus* (N1-3, N3-2, N5-2, N5-3, N5-5, N7-1, N9-4, N9-5, CH1-2 และ CH4-3), *Aspergillus tamarii* (N4-2) และ *Aspergillus flavus* (N2-2, N9-7 และ CH5-3), *Aspergillus terreus* (CH1-6) และ *Penicillium raperi* (CH5-2)

### Amplified rDNA Restriction Analysis (ARDRA)

เมื่อนำ PCR products มา purify โดยใช้ Qiagen PCR purification kit (Qiagen) และย่อยด้วย restriction enzymes *HaeIII* และ *HinfI* และตรวจสอบ patterns ของ digests ที่ได้โดย agarose gel electrophoresis พบว่าสามารถสังเกตเห็น pattern การย่อยของ *HaeIII* และ *HinfI* ที่แตกต่างกันได้ระหว่าง patterns ของ N1-2 และ N1-3 (*T. longibrachiatum*) และ N1-3, N5-2, N5-3, N7-1, N4-2 และ N2-2 (*Aspergillus* spp.) ดังแสดงในรูปที่ 11 แสดงให้เห็นถึงประโยชน์ของการนำ ARDRA มาประยุกต์ใช้ในการจัดกลุ่มเชื้อราเบื้องต้นก่อนเพื่อลดการซ้ำซ้อนของการทำ sequencing ของเชื้อราในกลุ่มเดียวกัน อย่างไรก็ตามการจะจัดกลุ่มเชื้อราอย่างละเอียดขึ้นอาจจะต้องอาศัย primers และ restriction enzymes อื่นเพิ่มเติม

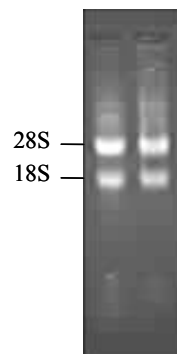


รูปที่ 11 ตัวอย่างการทำ ARDRA โดยการย่อย Purified PCR products ด้วย *HaeIII* (บน) and *HinfI* (ล่าง)

#### การสร้าง cDNA library ของเชื้อรา

ถึงแม้ isolates ที่มีค่า activity สูงสุดคือ N6-1, N5-5 และ N3-2 แต่จากผลการวิเคราะห์ทางอนุชีววิทยาบ่งชี้ว่าเชื้อราดังกล่าวเป็น *A. fumigatus* ซึ่งอาจมีการสร้างสารพิษ นอกจากนี้ยังได้มีงานวิจัยที่มีการ clone ยีน chitinase จาก *A. fumigatus* แล้ว ดังนั้นผู้วิจัยจึงคัดเลือกเชื้อรา isolate N3-1 ซึ่งมี chitinase activity สูงรองลงมาและลักษณะ morphology และผลการวิเคราะห์ทางอนุชีววิทยาบ่งชี้ว่าเป็น *Trichoderma* sp. โดย rDNA sequence มีความคล้ายคลึงกับ *T. longibrachiatrum* เพื่อใช้ในการ clone ยีน chitinase ต่อไป โดย N3-1 นอกจากจะมีความสามารถในการสร้าง chitinase สูงแล้ว ยังเป็นเชื้อราใน genus *Trichoderma* ซึ่งมีความสามารถในการเป็น biocontrol อย่างดีอีกด้วย

สำหรับการทำ cDNA library นั้น ผู้วิจัยต้องการเชื้อราที่เกิดจากสปอร์เพียงหนึ่งสปอร์ (single spore culture) เนื่องจากสปอร์เป็น haploid ดังนั้นโคลนีที่เกิดจากหนึ่งสปอร์จึงเป็น uninuclear culture ดังนั้นจึงนำเชื้อรา N3-1 มาทำการ purify ด้วยวิธี single spore isolation จนได้ single spore isolates ซึ่งสามารถสร้าง clear zone บนอาหาร chitin selective medium จากนั้นจึงสกัด RNA จาก mycelium ที่ harvest จาก culture อายุ 6 วันของ N3-1 ใน chitin liquid medium ซึ่งจากการวิเคราะห์การสร้างเอนไซม์ได้แสดงให้เห็นว่าเป็นช่วงที่มีการแสดงออกของยีน chitinase พบว่าสามารถสกัด RNA ได้ดังตัวอย่างในรูปที่ 12 โดยดูจาก band ของ 28S และ 18S RNA



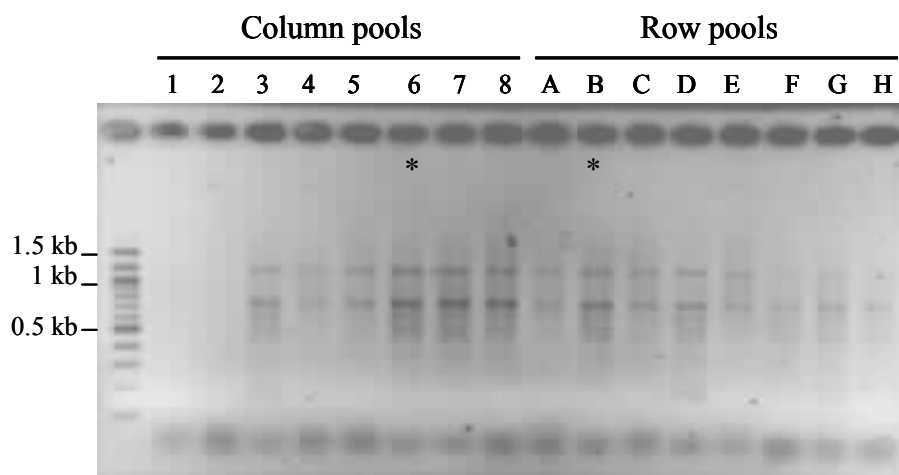
รูปที่ 12 ตัวอย่าง RNA ที่สกัดจาก mycelium เชื้อรา N3-1

จากนั้นเตรียม poly(A)+ RNA โดยใช้ Oligotex mRNA purification และใช้ poly(A)+ RNA ที่ได้ประมาณ 5 µg เป็น template ในการสร้าง cDNA นำ double strand cDNA มาเติม *EcoRI* adapter และย่อยด้วย *XhoI* ก่อนจะนำไปทำ size fractionation โดยใช้ drip column ที่บรรจุด้วย Sepharose CL-2B โดยเก็บ fraction (ประมาณ 100 µl/ fraction) จำนวน 21 fractions หลังจากประมาณปริมาณ cDNA ในแต่ละ fraction โดยใช้ Ethidium bromide plate assay แล้ว ผู้วิจัยจึงเลือกใช้ fraction ที่ 1-9 รวมกันในการสร้าง cDNA library โดย ligate cDNA เข้าใน Uni-ZAP XR vector แล้ว package เข้า phage โดยใช้ Gigapack III XL packaging extract (Startagene) จากการทำการ titring โดยใช้แบคทีเรีย XL1 Blue MRF<sup>+</sup> พบว่า primary library ที่ได้มี titer ประมาณ  $2 \times 10^4$  pfu/ml และหลังจาก amplify library แล้วทำการ titring พบว่า library ที่ได้มี titer ประมาณ  $4 \times 10^7$  pfu/ml และเก็บ library นี้ไว้เพื่อใช้ในการคัดกรองหา clone ที่มีชิ้นส่วนของยีน chitinase ต่อไป

#### การคัดกรอง cDNA library โดยการทำการ PCR

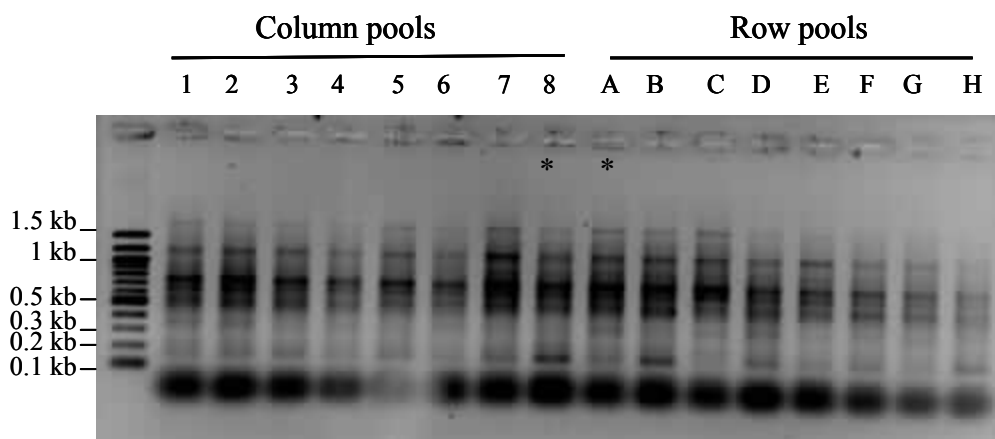
งานวิจัยนี้ประยุกต์ใช้ PCR-based screening method เพื่อหา clone ที่มีส่วนของยีน chitinase จาก cDNA library โดยออกแบบ primers ที่ใช้ให้ specific กับ conserved region ของยีน chitinase จากการทำการ alignment ของ amino acid sequences ของยีน chitinase ต่างๆ ในกลุ่ม family 18 ในขั้น primary screening ได้ใช้ phage เริ่มต้นประมาณ  $10^6$  pfu มา amplify แล้วแบ่งเป็น 64 tube (แบบ 8x8 matrix) เมื่อรวม reactions จาก 8 rows และ 8 columns ได้เป็น 16 pools แล้วจึงทำการ primary PCR screening โดยได้ออกแบบ primers Con2F และ Con2R จาก conserved regions ของยีน chitinase โดยคาดว่าจะให้ product ขนาด 500 bp เมื่อทดสอบกับ pools ของ phage suspension แล้วพบว่ามี products หลายขนาด โดยมี product ที่เห็นชัดเจนคือ products ขนาด 500 bp และ 1kb ในทุก pools อย่างไรก็ตามเมื่อใช้แบคทีเรีย XL1-Blue เป็น template พบว่า primers Con2F/Con2R ให้ product ขนาด 500 bp ด้วย ดังนั้นการใช้ primers Con2F/Con2R อาจจะทำให้ผล false negative ในการ screening ได้ ดังนั้นเพื่อให้ primer pairs มีความจำเพาะต่อ phage suspension ในการทำการ screening จึงเลือกใช้ primer Con 2F และ T3 โดย Con2F จะ specific ต่อ conserved region ของ chitinase ที่อยู่บน cDNA insert ในขณะที่ T3 จะ specific กับ UniZap vector ที่ใช้ในการสร้าง cDNA library โดยคาดว่าถ้า phage นั้นมี insert ที่มีชิ้นส่วนของยีน chitinase จะให้ positive PCR product ในการทำการ screening ซึ่งเมื่อทดสอบ primers Con2F และ T3 โดยการใช้ phage suspension และ XL1-Blue เป็น templates พบว่าให้ products ใน phage suspension แต่ไม่ให้ product ใน XL1-Blue

ในการทำการ primary screening ด้วย primers Con2F และ T3 นั้นคาดว่าถ้า phage นั้นมี insert ที่มีชิ้นส่วนของยีน chitinase จะให้ positive PCR product ซึ่งคาดว่าจะพบหลายขนาดขึ้นอยู่กับขนาดของ cDNA insert ใน phage (เนื่องจาก primer Con 2F จะ specific ต่อ conserved region ของชิ้นส่วนของยีน chitinase ที่อยู่บน cDNA insert และ T3 specific กับ UniZap vector) จากการ screen พบว่าเกือบทุก pools ยกเว้น pools ที่ 1 และ 2 ให้ PCR products หลายขนาด ดังแสดงในรูปที่ 13 โดย pools ส่วนใหญ่ มี products ที่เห็นชัดเจนคือขนาดประมาณ 1.2 kb, 700 bp และ 500 bp จากนั้นเลือก column pool 6 และ row pool B ซึ่งมี PCR product ขนาดดังกล่าวชัดเจน และนำ phage suspension จาก tube ที่จุดตัด 6B มาใช้ในการทำการ secondary screening ต่อไป โดยเมื่อทำการ titer แล้วพบว่า phage suspension นี้มี titer ประมาณ  $7 \times 10^7$  pfu/ml จึงนำ  $10^6$  pfu มาใช้ในขั้น secondary screening



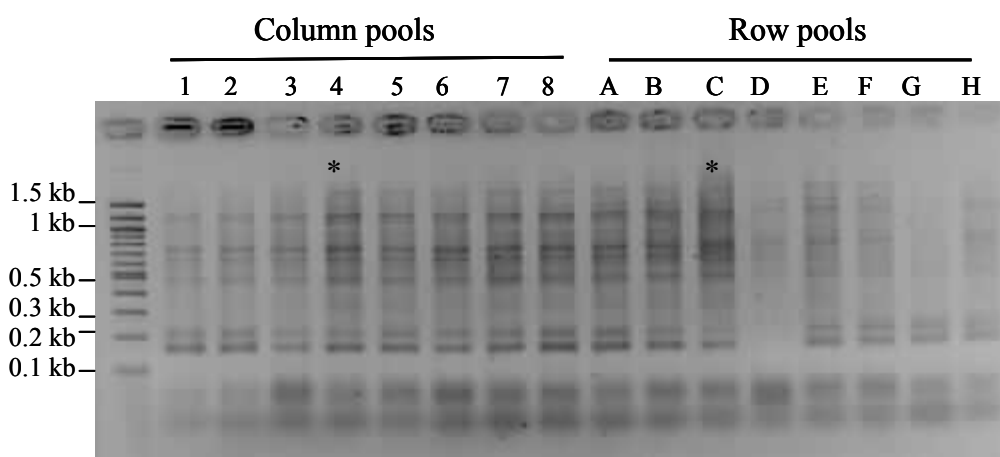
รูปที่ 13 ผลการทำ primary screening ของ cDNA library

จากการทำ secondary screening พบว่ามี PCR products ในทุก pools โดยยังพบ products ขนาด 1.2 kb, 700 bp และ 500 bp ใน ทุก pools และ product ขนาดอื่นๆคือประมาณ 150 bp, 350 bp ด้วย จากนั้นเลือก column pool 8 และ row pool A ซึ่งมี PCR product และนำ phage suspension จาก tube ที่จุดตัด 8A มาใช้ในการทำ secondary tertiary screening ต่อไป



รูปที่ 14 ผลการทำ secondary screening ของ cDNA library

จากการทำ tertiary screening พบว่ามี PCR products ในทุก pools โดย PCR product ที่เห็นชัดเจนคือขนาด 1.2kb, 700 bp, 500 bp และประมาณ 150-200 bp โดย pools ที่ให้ product ขนาด 1.2kb, 700 bp, 500 bp (ซึ่งเป็น products ที่สังเกตเห็นและติดตามมาตั้งแต่ primary screening) ชัดเจนคือ column pools 1-8 และ row pools A, B, C, E, F และ H จากนั้นจึงเลือก column pool 4 และ row pool C ซึ่งมี PCR product ขนาดดังกล่าวที่ชัดเจนและนำ phage suspension จาก tube ที่จุดตัด 4C มาใช้ในการทำ plate assay ต่อไป



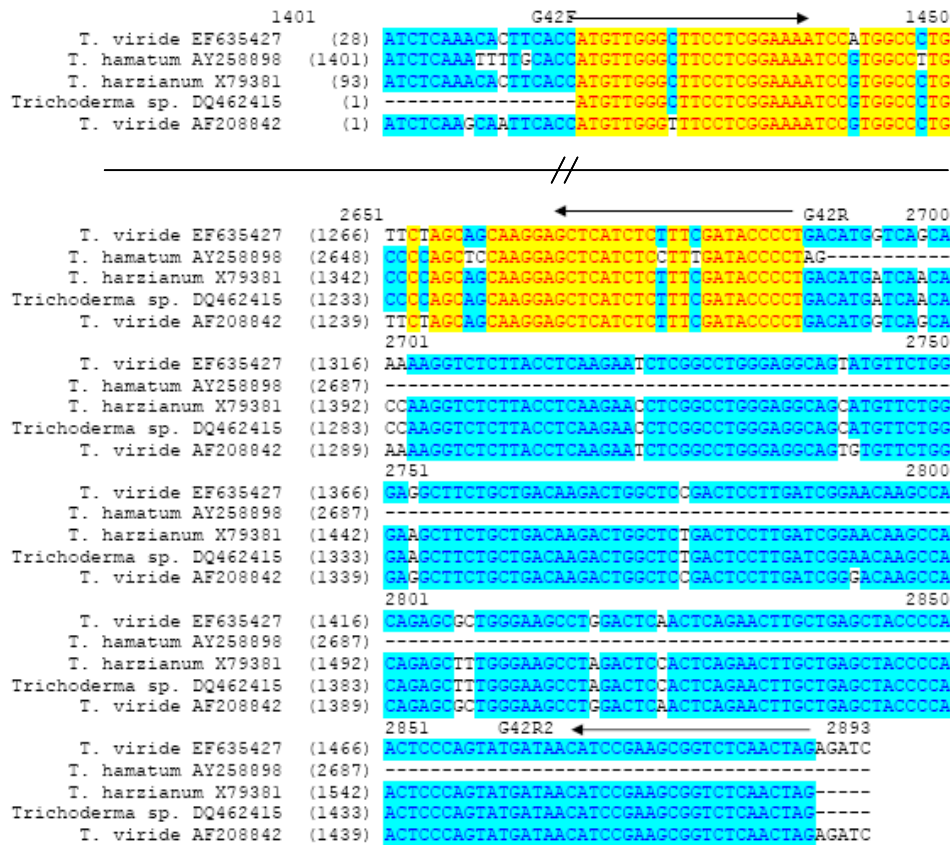
รูปที่ 15 ผลการทำ tertiary screening ของ cDNA library

การทำ plate assay ทำโดย plate phage จาก tube ที่จุดตัด 4C จำนวน 100 pfu และสุ่มเลือก plaques ที่ได้มา diffuse ใน SM buffer และสุ่มเลือก 20 plaques มาใช้เป็น template ในการทำ PCR เพื่อ บ่งชี้ clone ที่คาดว่าจะมีชิ้นส่วนของยีน chitinase อยู่ ซึ่ง ณ. เวลาที่เตรียมรายงานนี้กำลังอยู่ในระหว่างการ รอผล โดยคาดว่าจะได้ clone ที่มีชิ้นส่วน cDNA ของยีน chitinase เพื่อนำมา excise plasmid และศึกษา cDNA ของยีน chitinase นั้น โดย sequence ของ cDNA จะบ่งถึงยีน chitinase ที่แสดงออก ณ.เวลาที่สกัด RNA เพื่อเตรียม cDNA library นอกจากนี้ clone ที่มี cDNA ของยีน chitinase ที่สมบูรณ์อยู่จะมีประโยชน์ อย่างยิ่งในการนำมาประยุกต์ใช้ในอนาคต เนื่องจาก cDNA ที่ได้เป็นส่วนส่วนของยีน chitinase ที่แสดงออก และ ไม่มี intron ดังนั้นถ้าพบ cDNA ที่สมบูรณ์ก็จะสามารถนำไปใช้ในการแสดงออกในสิ่งมีชีวิตอื่นๆ นอกจากเชื้อราได้

อย่างไรก็ตามเนื่องจากการทำ PCR-based screening โดยใช้ primers Con2F และ T3 พบผล positive ในหลาย pools ซึ่งอาจเนื่องมาจาก nonspecificity ของ primer ซึ่งออกแบบให้จำเพาะต่อ conserved region ของ chitinase ดังนั้นจะให้ผล positive ต่อทุก phage ที่มีส่วนของ conserved region นี้ (ซึ่งอาจมีหลายยีน chitinase) อยู่ ดังนั้นหากเปลี่ยน primers ให้มี specificity สูงขึ้นอาจทำให้ได้ผลที่ชัดเจนยิ่งขึ้น

#### การโคลนยีน chitinase จาก genomic DNA ของเชื้อรา

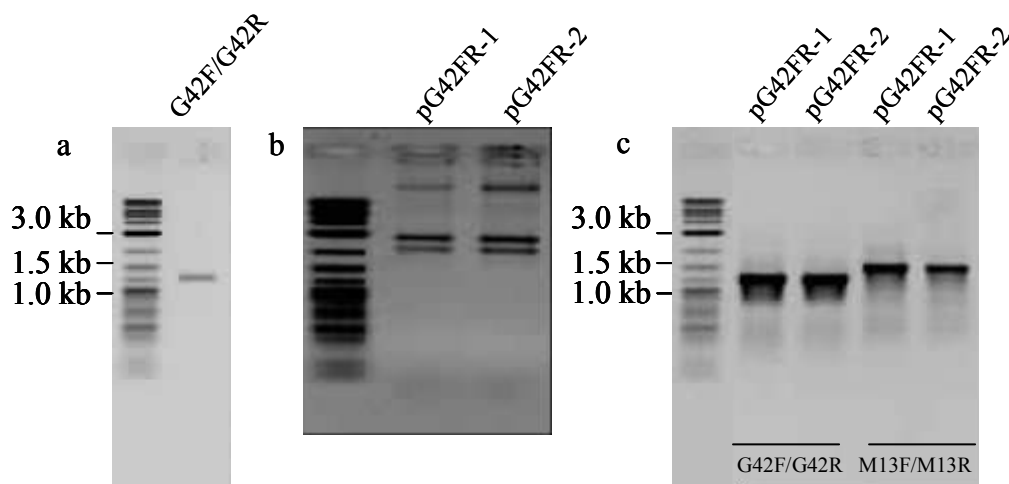
เนื่องจากงานวิจัยหลายชิ้นแสดงว่ายีนที่ encode chitinase ขนาด 42 kDa และ homologs ของยีน นี้ ของเชื้อรามีบทบาทต่อความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคและความสามารถในการเป็น biocontrol ซึ่งเมื่อนำ sequences ของ homologs ของยีนเหล่านี้จากเชื้อรา *Trichoderma* spp. สายพันธุ์ ต่างๆ มาเปรียบเทียบกันแล้วพบว่าในแต่ละกลุ่มมีความคล้ายคลึงกันอย่างมาก ดังนั้นจึงออกแบบ primers จาก alignment ของยีน chitinase 42 ของ *Trichoderma* spp. คือ G42F, G42R และ G42R2 โดยคาดว่า G42F/G42R จะให้ product เป็น partial gene ขนาดประมาณ 1.2 kb และคาดว่า G42F/G42R2 จะให้ product เป็น full length gene ขนาดประมาณ 1.5 kb



รูปที่ 16 ส่วนของ alignment ที่ใช้ในการออกแบบ primers G42F, G42R และ G42R2 (แสดงเฉพาะบางส่วนของ alignment เท่านั้น)

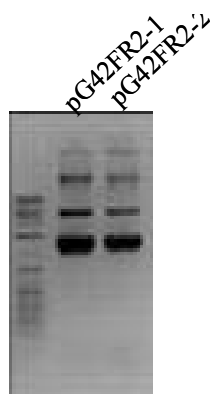
จากการ amplify genomic DNA ของเชื้อรา N3-1 ด้วย G42F/G42R ซึ่งคาดว่าจะให้ product เป็น partial gene ขนาดประมาณ 1.2 kb พบว่าได้ PCR product ขนาดที่คาดไว้ ดังแสดงในรูปที่ 15 โดยเมื่อนำ PCR product ที่ได้มาทำ sequencing พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ family 18 endochitinase จากเชื้อราในกลุ่ม *Trichoderma* spp. หลายยีน โดยมีความคล้ายคลึงสูงที่สุดกับ *Hypocrea jecorina* chitinase 18-5 (*chi18-5*) gene (Accession number BK006078, 84% identity)

จากนั้นจึง clone PCR product ที่ได้ โดยใช้ pGEM-T easy vector และ transform เข้า *E. coli* DH5 $\alpha$  เมื่อสกัดพลาสมิดแล้วทำวิเคราะห์โดยการทำ PCR ด้วย primers M13F/M13R ซึ่งมีความจำเพาะต่อ vector และ primers G42F/G42R พบว่ามี insert ขนาดที่คาดไว้จริง ดังแสดงในรูปที่ 17 จากการ sequence พลาสมิดที่ได้โดยใช้ primers M13F และ M13R พบว่าให้ผล Blastn เช่นเดียวกับ PCR fragment คือมีความคล้ายคลึงสูงกับ endochitinase ของ *Trichoderma* spp. โดยมีความคล้ายคลึงสูงที่สุดกับ *Hypocrea jecorina* chitinase 18-5 (*chi18-5*) gene (accession number: BK006078, 85% identity) (Seidl et al, 2005) ซึ่งยีน *chi18-5* ของ *H. jecorina* (*T. reesei*) นี้ encode chitinase ขนาด 46 kDa และเป็น ortholog ยีนของ *Trichoderma* spp. ที่ encode endochitinase ขนาด 42 kDa ซึ่งป็นยีนที่ใช้ในการออกแบบ primers G42F และ G42R



รูปที่ 17 การ clone partial chitinase gene จาก genomic DNA a) PCR product จากการ amplify N3-1 genomic DNA ด้วย G42F/G42R, b) plasmids ที่ได้จากการ clone G42F/G42R และ c) plasmids ที่ได้จากการ clone G42F/G42R amplified ด้วย primers G42F/G42R (ซ้าย) และ ด้วย M13F/M13R (ขวา)

เพื่อการ clone ยีน chitinase ที่เป็น full length ได้ออกแบบ primer G42R เพื่อ amplify fragment ที่คาดว่าจะให้ full length ของยีนที่กล่าวข้างต้น (ใน plasmid pG42FR-1 และ pG42FR-2, รูปที่ 17b) โดยจาก alignment คาดว่า primers G42F/G42R2 จะให้ product ที่เป็น full length gene ขนาดประมาณ 1.5 kb เมื่อใช้ primers คู่นี้ในการ amplify genomic DNA ของเชื้อรา N3-1 โดยใช้ *Pfu* DNA polymerase พบว่าได้ products หลายขนาดโดยมีขนาดที่คาดไว้คือประมาณ 1.5 kb ด้วย จึง purify fragment ดังกล่าวโดยใช้ gel purification kit (Bioneer) และ ligate เข้า pGEM-T easy vector และ transform เข้า *E. coli* DH5 $\alpha$  ตามลำดับ ขณะนี้ยังอยู่ในระหว่างการรอผล sequencing ของ plasmid ที่ได้ (รูปที่ 18)



รูปที่ 18 Plasmid ที่ได้จากการ clone fragment ขนาด 1.5 kb ซึ่งเป็น products จากการ N3-1 genomic DNA ด้วย primers G42F/G42R2

จากการ clone ยีน chitinase ของจาก genomic DNA ของเชื้อรา N3-1 พบว่าสามารถ clone ยีน chitinase ที่เป็น partial gene ขนาด 1.2 kb ได้ และได้ทำการ clone ส่วนที่เป็น full length gene ของยีนนี้ ซึ่งเมื่อได้ผล sequencing แล้วจะ characterize ยีนนี้ได้ โดยยีนที่ clone ได้จะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีนได้ต่อไปในอนาคต

การทดสอบเบื้องต้นเพื่อศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราที่ก่อโรคในพืช (in vivo assay)

**การทดสอบเบื้องต้นเพื่อศึกษาความสามารถของเชื้อรา N3-1 ในการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ในผลพริก**

เพื่อศึกษาความสามารถของเชื้อรา N3-1 ในการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ในพืช ได้ทำการ inoculate ผลพริกชี้ฟ้าและพริกหยวกด้วย suspension ของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *C. capsici* -1511 (C-1511) และ *C. gloeosporioides*-1060 (C-1060) โดยสร้างแผลบนผลพริก และ treat ด้วย suspension ของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. จากนั้น treat แผลดังกล่าวด้วย spore suspension หรือ culture filtrate ของเชื้อรา N3-1 และติดตามดูลักษณะและขนาดของแผลบนผลพริกทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน โดยมีชุดควบคุมประกอบด้วย ผลพริกที่ treat ด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ (negative control), ผลพริกที่ treat ด้วย broth ที่ไม่มีเชื้อรา N3-1 (negative control), ผลพริกที่ treat ด้วย suspension ของ *Colletotrichum* spp. (positive control) และผลพริกที่ treat ด้วย spore suspension หรือ culture filtrate ของเชื้อรา N3-1 (negative control) โดยทำการทดลอง 5 replicates (1 ผล/ treatment/ replicate) ดังแสดงในตารางที่ 4

จากการทดลองพบว่าการ treat ผลพริกชี้ฟ้าด้วย spore suspension หรือ culture filtrate ของเชื้อรา N3-1 มีผลให้แผลบนผลพริกที่เกิดจากเชื้อรา C-1511 มีขนาดลดลง ถึงแม้การ treat ด้วย culture filtrate และ spore suspension ของเชื้อรา N3-1 จะทำให้เกิดรอยดำตรงบริเวณแผลที่ทำไว้ซึ่งอาจเนื่องมาจากปฏิกิริยาของพืชต่อ treatment แต่ความรุนแรงของโรคลดลงอย่างเห็นได้ชัด

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบความสามารถของเชื้อรา N3-1 ในการยับยั้งเชื้อรา C-1511 ในผลพริกชี้ฟ้า

| treatment    |           | ขนาดแผลบนผลพริก (เซนติเมตร) |          |          |          |          |          |          |
|--------------|-----------|-----------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
|              |           | วันที่ 1                    | วันที่ 2 | วันที่ 3 | วันที่ 4 | วันที่ 5 | วันที่ 6 | วันที่ 7 |
| C-1511       | 1         | 0                           | +        | 0.5      | 1.35     | 1.95     | 2.75     | 3.4      |
|              | 2         | 0                           | +        | 1        | 1.5      | 2.25     | 2.75     | 3        |
|              | 3         | 0                           | +        | 0.95     | 1.5      | 2.05     | 2.8      | 3        |
|              | 4         | 0                           | +        | 0.75     | 1.5      | 2        | 2.65     | 2.85     |
|              | 5         | 0                           | +        | 1.05     | 1.5      | 2.35     | 2.55     | 2.75     |
|              | ค่าเฉลี่ย | 0                           | +        | 0.85     | 1.47     | 2.12     | 2.7      | 3        |
| C-1511+N3-1S | 1         | 0                           | +        | 0.4      | 0.65     | 1.25     | 1.65     | 2.15     |
|              | 2         | 0                           | +        | 0.25     | 0.6      | 1.75     | 2.45     | 3        |
|              | 3         | 0                           | +        | 0.25     | 0.65     | 1.75     | 2.05     | 2.5      |
|              | 4         | 0                           | +        | 0.25     | 0.35     | 0.85     | 1.1      | 1.6      |
|              | 5         | 0                           | +        | 0.3      | 0.1      | 0.95     | 1.9      | 2.65     |
|              | ค่าเฉลี่ย | 0                           | +        | 0.29     | 0.47     | 1.31     | 1.83     | 2.38     |
| C1511+N3-1F  | 1         | 0                           | +        | 0.55     | 1.7      | 2.4      | 2.5      | 3.1      |
|              | 2         | 0                           | +        | 0.55     | 1.1      | 1.6      | 2.25     | 2.65     |
|              | 3         | 0                           | +        | 0.21     | 0.25     | 0.85     | 2        | 2.55     |
|              | 4         | 0                           | +        | 0.35     | 0.55     | 1.2      | 1.8      | 2.75     |
|              | 5         | 0                           | +        | 0.35     | 1.1      | 2.1      | 2.35     | 3        |
|              | ค่าเฉลี่ย | 0                           | +        | 0.40     | 0.94     | 1.63     | 2.18     | 2.81     |

Note: N3-1S = spore suspension ของเชื้อรา N3-1; N3-1F = culture filtrate ของเชื้อรา N3-1; 0 = ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของแผลบนผลพริก; + = มีการเปลี่ยนแปลงของแผลบนผลพริกแต่ยังไม่สามารถวัดขนาดของแผลได้

ส่วนผลพริกชี้ฟ้าที่ treat ด้วย C-1060 พบว่าการ treat ผลพริกชี้ฟ้าด้วย spore suspension หรือ culture filtrate ของเชื้อรา N3-1 มีผลให้ผลบนผลพริกที่เกิดจากเชื้อรา C1511 มีขนาดลดลงเล็กน้อยในช่วงวันที่ 1-3 ของการทดลอง หลังจากนั้นไม่สังเกตเห็นผลการยับยั้งความรุนแรงของโรค (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบความสามารถของเชื้อรา N3-1 ในการยับยั้งเชื้อรา C-1060 ในผลพริกชี้ฟ้า

| treatment    |           | ขนาดแผลบนผลพริก (เซนติเมตร) |          |          |          |          |          |          |
|--------------|-----------|-----------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
|              |           | วันที่ 1                    | วันที่ 2 | วันที่ 3 | วันที่ 4 | วันที่ 5 | วันที่ 6 | วันที่ 7 |
| C-1060       | 1         | 0                           | +        | 1.15     | 1.2      | 1.65     | 1.8      | 2.05     |
|              | 2         | 0                           | +        | 1.05     | 1.45     | 2        | 2.05     | 2.05     |
|              | 3         | 0                           | +        | 0.8      | 0.95     | 1.15     | 1.8      | 2.45     |
|              | 4         | 0                           | +        | 0.55     | 0.85     | 1.75     | 1.85     | 1.75     |
|              | 5         | 0                           | +        | 1.05     | 1.5      | 1.55     | 1.8      | 2.1      |
|              | ค่าเฉลี่ย | 0                           | +        | 0.92     | 1.19     | 1.62     | 1.86     | 2.08     |
| C-1060+N3-1S | 1         | 0                           | +        | 0.75     | 1.2      | 1.55     | 1.85     | 3.5      |
|              | 2         | 0                           | +        | 0.7      | 1.75     | 1.55     | 1.6      | 2.1      |
|              | 3         | 0                           | +        | 0.35     | 1.1      | 1.65     | 2.3      | 2.25     |
|              | 4         | 0                           | +        | 0.65     | 1.25     | 1.75     | 2.15     | 2.9      |
|              | 5         | 0                           | +        | 0.45     | 1.25     | 2        | 2.55     | 2.6      |
|              | ค่าเฉลี่ย | 0                           | +        | 0.58     | 1.31     | 1.7      | 2.09     | 2.67     |
| C-1060+N3-1F | 1         | 0                           | +        | 0.4      | 1.2      | 1.65     | 1.65     | 2.25     |
|              | 2         | 0                           | +        | 0.4      | 0.65     | 1.1      | 0.9      | 1.25     |
|              | 3         | 0                           | +        | 1        | 1.55     | 2.05     | 1.8      | 2.25     |
|              | 4         | 0                           | +        | 0.55     | 1.25     | 1.55     | 1        | 2.2      |
|              | 5         | 0                           | +        | 0.65     | 0.5      | 1.9      | 1.75     | 2.5      |
|              | ค่าเฉลี่ย | 0                           | +        | 0.6      | 1.03     | 1.65     | 1.42     | 2.09     |

Note: N3-1S = spore suspension ของเชื้อรา N3-1; N3-1F = culture filtrate ของเชื้อรา N3-1; 0 = ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของแผลบนผลพริก; + = มีการเปลี่ยนแปลงของแผลบนผลพริกแต่ยังไม่สามารถวัดขนาดของแผลได้

การทดลองในฟริกหยวกแสดงให้เห็นว่า culture filtrate และ spore suspension ของเชื้อรา N3-1 ลดความรุนแรงของอาการที่เกิดจากเชื้อรา C-1511 ได้โดยสังเกตจากขนาดแผลที่ลดลงอย่างเห็นได้ชัด (ตารางที่ 6)

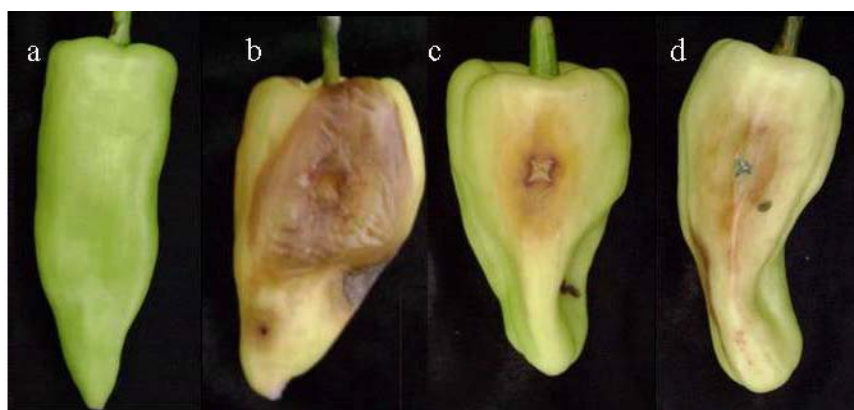
ตารางที่ 6 ผลการทดสอบความสามารถของเชื้อรา N3-1 ในการยับยั้งเชื้อรา C-1511 ในผลฟริกหยวก

| treatment    | ขนาดแผลบนผลฟริก (เซนติเมตร) |          |          |          |          |          |          |          |
|--------------|-----------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
|              |                             | วันที่ 1 | วันที่ 2 | วันที่ 3 | วันที่ 4 | วันที่ 5 | วันที่ 6 | วันที่ 7 |
| C-1511       | 1                           | 0        | 0        | 1.15     | 2.1      | 2.2      | 2.75     | 2.9      |
|              | 2                           | 0        | 0        | 0.75     | 1.15     | 1.85     | 2.75     | 3.7      |
|              | 3                           | 0        | 0        | 1.45     | 3.5      | 4        | 2.8      | 3.7      |
|              | 4                           | 0        | 0        | 1.1      | 1.15     | 2        | 2.8      | 2.65     |
|              | 5                           | 0        | 0        | 1.4      | 2.45     | 2.5      | 2.55     | 3.5      |
|              | ค่าเฉลี่ย                   | 0        | 0        | 2.478    | 3.89     | 4.544    | 4.862    | 5.51     |
| C-1511+N3-1S | 1                           | 0        | 0        | 1.65     | 1.7      | 1.95     | 2        | 2.3      |
|              | 2                           | 0        | 0        | 0.6      | 0.75     | 1.3      | 1.65     | 2.05     |
|              | 3                           | 0        | 0        | 0.65     | 0.65     | 1.15     | 2.05     | 2.4      |
|              | 4                           | 0        | 0        | 0.85     | 1.5      | 1.6      | 1.65     | 2.25     |
|              | 5                           | 0        | 0        | 0.45     | 0.7      | 0.75     | 0.85     | 1.85     |
|              | ค่าเฉลี่ย                   | 0        | 0        | 0.84     | 1.06     | 1.35     | 1.64     | 2.17     |
| C-1511+N3-1C | 1                           | 0        | 0        | 0.6      | 0.6      | 0.65     | 0.7      | 1.5      |
|              | 2                           | 0        | 0        | 1.1      | 1.15     | 1.25     | 2.25     | 2.7      |
|              | 3                           | 0        | 0        | 1.3      | 1.35     | 1.9      | 2        | 2.2      |
|              | 4                           | 0        | 0        | 0.85     | 0.9      | 1.35     | 1.8      | 1.9      |
|              | 5                           | 0        | 0        | 1.65     | 1.75     | 1.8      | 2.35     | 2.6      |
|              | ค่าเฉลี่ย                   | 0        | 0        | 1.1      | 1.15     | 1.39     | 1.82     | 2.18     |

Note: N3-1S = spore suspension ของเชื้อรา N3-1; N3-1F = culture filtrate ของเชื้อรา N3-1; 0 = ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของแผลบนผลฟริก; + = มีการเปลี่ยนแปลงของแผลบนผลฟริกแต่ยังไม่สามารถวัดขนาดของแผลได้

ส่วนผลฟริกหยวกที่ treat ด้วย C-1060 พบว่าขนาดแผลที่เกิดมีขนาดค่อนข้างเล็กตลอดช่วงเวลาทดลอง และการ treat ผลฟริกที่ฆ่าด้วย spore suspension หรือ culture filtrate ของเชื้อรา N3-1 ผลฟริกที่เกิดจากเชื้อรา C1511 มีขนาดลดลงเล็กน้อยในช่วงวันที่ 1-3 ของการทดลอง หลังจากนั้นไม่สังเกตเห็นผลการยับยั้งความรุนแรงของโรค

ดังนั้นจากการทดสอบความสามารถของเชื้อรา N3-1 ในการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ในผลพริกแสดงให้เห็นว่าเชื้อรา N3-1 มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืช โดยเฉพาะ *C. capsici* C-1511 ทั้งในพริกชี้ฟ้าและพริกหยวก แสดงให้เห็นถึงความน่าสนใจในการประยุกต์ใช้เชื้อรานี้และเชื้อราที่มีความสามารถในการสร้าง chitinase เป็น biological contro agent เพื่อต่อต้านเชื้อราก่อโรคพืช



รูปที่ 19 ตัวอย่างผลการทดสอบการทดสอบความสามารถของเชื้อรา N3-1 ในการยับยั้งเชื้อรา *C. capsici* C-1511 ในผลพริกชี้ฟ้า (บน) และพริกหยวก (ล่าง) ในวันที่ 6 หลัง treatment ซึ่ง treatment ในภาพประกอบด้วย a) treat ด้วย น้ำกลั่น b) treat ด้วยเชื้อรา C-1511 c) treat ด้วย C-1511 + N3-1 culture filtrate และ d) treat ด้วย C-1511 + N3-1 spore

#### การทดสอบเบื้องต้นเพื่อศึกษาความสามารถของเชื้อรา N3-1 ในการยับยั้งเชื้อ *P. ultimum* ในพืช

เนื่องจากเชื้อราที่คัดกรองแล้วที่มีการสร้าง chitinase หลาย isolates นอกจากจะมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่มี chitin นอกจากการยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืช *Colletotrichum* spp. ซึ่งมี chitin เป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์แล้ว จาก *in vitro* assay โดย dual culture method ยังแสดงให้เห็นว่าเชื้อราถึง 33 isolates (จาก 37 isolates) ยังมีความสามารถในการยับยั้งหรือมีผลต่อการเจริญของ *P. ultimum* ซึ่งเป็นเชื้อ oomycete ที่ก่อโรคในพืชอีกด้วย ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจศึกษาถึงความสามารถของเชื้อราที่คัดเลือกมาใช้ในการทดลองนี้ว่ามีความเป็นไปได้ที่จะใช้ในการควบคุมโรคพืชที่เกิดจาก *P. ultimum* หรือไม่ โดยทำการทดลองในพริกและแตงกวา

เพื่อศึกษาความสามารถของเชื้อรา N3-1 ในการยับยั้งเชื้อรา *P. ultimum* ในพืช ได้ทำการ inoculate ดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วย suspension ของ *P. ultimum* และ treat เมล็ดพืชด้วย spore suspension หรือ

culture filtrate ของเชื้อรา N3-1 และติดตามการเจริญของต้นและอัตราการรอดชีวิตของต้นกล้าพริกและแตงกวาทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 7-14 วัน โดยประเมินผลการยับยั้งจากจำนวนต้นกล้าที่รอดชีวิตและคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ (มีต้นกล้า 5 ต้น/กระถาง และทำซ้ำจำนวน 3 กระถาง/treatment) และมีชุดควบคุมคือเมล็ด (ทุก treatment) ที่ปลูกในดินที่ปราศจาก *P. ultimum* โดยมีชุดควบคุมประกอบด้วย เมล็ดที่ treat ด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ, เมล็ดที่ treat ด้วย broth ที่ไม่มีเชื้อรา N3-1 และได้ปลูกเมล็ดทุก treatment ลงในดินที่ไม่มี *P. ultimum*

จากการทดลองกับเมล็ดพริก พบว่า *P. ultimum* มีผลต่อการงอกและการเจริญของต้นกล้าพริก โดยเมื่อติดตามการเจริญเติบโตเป็นเวลา 14 วันสังเกตได้ว่า โดยจะพบแผลสีน้ำตาลซ้ำที่โคนต้นและต้นกล้าส่วนใหญ่จะล้มตายไปในที่สุด มีต้นกล้าพริกเพียงประมาณ 33% เท่านั้นที่อยู่รอดได้ เมื่อเปรียบเทียบกับพืชที่มีการ treat เมล็ดด้วย spore suspension หรือ culture filtrate ของเชื้อรา N3-1 พบว่าต้นกล้าพริกมีลักษณะแข็งแรงและเจริญเติบโตได้ดี โดยการแช่เมล็ดพริกใน N3-1 spore suspension ทำให้ต้นกล้าพริกอยู่รอดได้ถึง 80% และเป็นที่น่าสนใจว่าการ treat เมล็ดด้วย culture filtrate (ซึ่งได้จากการ culture เชื้อรา N3-1 ใน liquid medium ที่มี chitin เป็นองค์ประกอบ) มีลักษณะแข็งแรงกว่า treatment อื่นๆ คือมีต้นกล้าพริกที่อยู่รอดได้ถึง 100% ซึ่งอาจเป็นผลจาก culture filtrate ที่ใช้นั้นได้มาจาก culture ของเชื้อรา N3-1 ที่บ่มใน liquid medium ที่มี colloidal chitin นาน 6 วัน ดังนั้น ณ เวลาที่ใช้ในการ treat พืช culture filtrate น่าจะมีเอนไซม์หรือ metabolites อื่นๆ ที่มีผลต่อ *P. ultimum* อยู่ใน culture filtrate แล้วเมื่อเปรียบเทียบการนำ spore suspension ของเชื้อรา N3-1 มาใช้โดยตรงซึ่งเชื้อรา N3-1 อาจต้องใช้เวลาในการสร้างเอนไซม์และ metabolites สำหรับ treatment ด้วยการคลุก N3-1 spore suspension ลงในดินที่มี *P. ultimum* พบว่า N3-1 ยังช่วยลดอาการของโรคได้ชัดเจนได้ชัดโดยต้นกล้าส่วนมากเจริญได้ดี มีเพียงส่วนน้อยที่มีแผลสีน้ำตาลเกิดที่โคนต้นประมาณวันที่ 3-4 และต้นกล้าพริกอยู่รอดได้ถึง 66.67% (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 ผลการทดสอบการทดสอบความสามารถของเชื้อรา N3-1 ในการยับยั้งเชื้อรา *P. ultimum* ในต้นกล้าพริก

| Treatment ของพริก | Pythium       | N3-1                            | % normal plant |
|-------------------|---------------|---------------------------------|----------------|
| NA                | ไม่มี (N)     | ไม่มี (A)                       | 100%           |
| NB                | ไม่มี (N)     | แช่เมล็ดใน spore suspension (B) | 100%           |
| NC                | ไม่มี (N)     | คลุก spore suspension ในดิน (C) | 93.33%         |
| ND                | ไม่มี (N)     | แช่เมล็ดใน culture filtrate (D) | 100%           |
| PA                | คลุกในดิน (P) | ไม่มี (A)                       | 33.33%         |
| PB                | คลุกในดิน (P) | แช่เมล็ดใน spore suspension (B) | 80%            |
| PC                | คลุกในดิน (P) | คลุก spore suspension ในดิน (C) | 66.67%         |
| PD                | คลุกในดิน (P) | แช่เมล็ดใน culture filtrate (D) | 100%           |

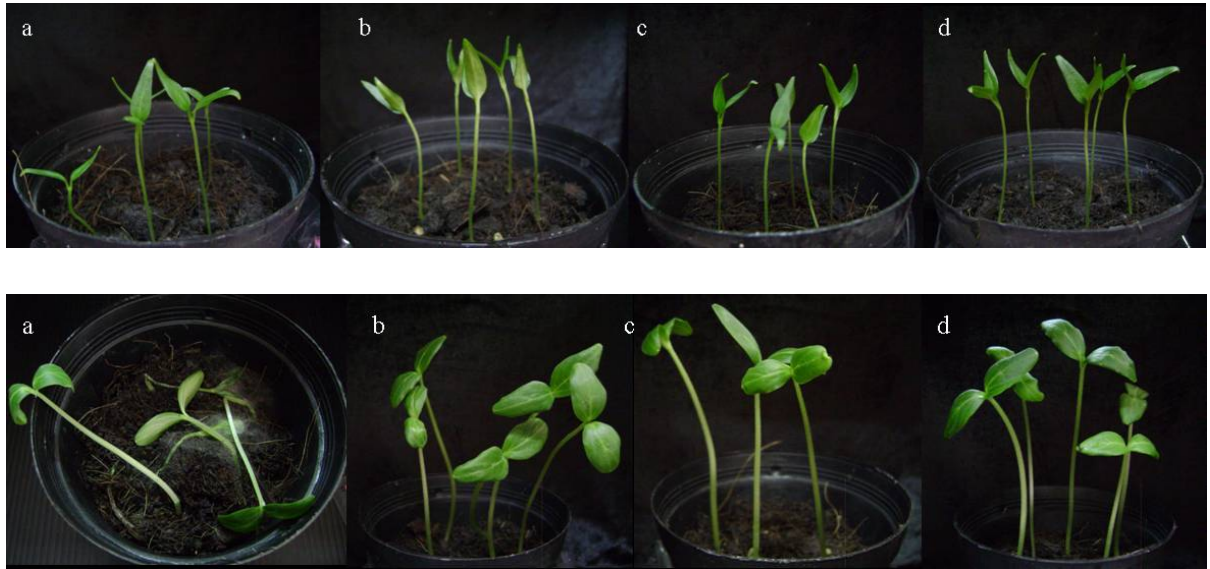
Note: treatment แสดงในตารางและรูปที่ 20 โดย N = ไม่มี *P. ultimum*; P = มี *P. ultimum* และ treatment ต่างๆ คือ A = ไม่ได้ treated ด้วย N3-1; B = treated เมล็ดด้วย N3-1 spore suspension; C = คลุก N3-1 spore suspension ลงในดิน และ D = treated เมล็ดด้วย N3-1 culture filtrate โดย % normal plant คำนวณจากต้นกล้าที่รอดชีวิตจากการทดลองทั้ง 3 replicates (5 เมล็ด/กระถาง/replates)

จากการทดลองในต้นกล้าแตงกวานั้น *P. ultimum* มีผลต่อการงอกของเมล็ดแตงกวาและเจริญเติบโตของต้นกล้าแตงกวา โดยสังเกตเห็นผลช้าใส่ที่โคนต้น หลังจากนั้นประมาณ 2-3 วันต้นกล้าส่วนใหญ่ล้มตายไป มีต้นกล้าแตงกวาเพียง 27% เท่านั้นที่รอดและเจริญได้ตลอดระยะการทดลอง เมื่อเปรียบเทียบกับพืชที่มีการ treat เมล็ดด้วย spore suspension ของเชื้อรา N3-1 โดยการแช่เมล็ดหรือคลุกลงในดินพบว่าต้นกล้าแตงกวามีอัตราการงอกสูงขึ้นและลักษณะการเจริญแข็งแรง สำหรับการ treat เมล็ดด้วย N3-1 culture filtrate พบว่าต้นแตงกวามีการเจริญเติบโตดีกว่า treatment ที่ใช้ spore suspension ดังแสดงในตารางที่ 8

**ตารางที่ 8** ผลการทดสอบการทดสอบความสามารถของเชื้อรา N3-1 ในการยับยั้งเชื้อรา *P. ultimum* ในต้นกล้าแตงกวา

| Treatment ของ<br>แตงกวา | <i>P. ultimum</i> | N3-1                        | % normal plant |
|-------------------------|-------------------|-----------------------------|----------------|
| NA                      | ไม่มี             | ไม่มี                       | 93.33%         |
| NB                      | ไม่มี             | แช่เมล็ดใน spore suspension | 93.33%         |
| NC                      | ไม่มี             | คลุก spore suspension ในดิน | 93.33%         |
| ND                      | ไม่มี             | แช่เมล็ดใน culture filtrate | 100%           |
| PA                      | คลุกในดิน         | ไม่มี                       | 27%            |
| PB                      | คลุกในดิน         | แช่เมล็ดใน spore suspension | 66.67%         |
| PC                      | คลุกในดิน         | คลุก spore suspension ในดิน | 67%            |
| PD                      | คลุกในดิน         | แช่เมล็ดใน culture filtrate | 100%           |

Note: treatment แสดงในตารางและรูปที่ 20 โดย N = ไม่มี *P. ultimum*; P = มี *P. ultimum* และ treatment ต่างๆ คือ A = ไม่ได้ treated ด้วย N3-1; B = treated เมล็ดด้วย N3-1 spore suspension; C = คลุก N3-1 spore suspension ลงในดิน และ D = treated เมล็ดด้วย N3-1 culture filtrate โดย % normal plant คำนวณจากต้นกล้าที่รอดชีวิตจากการทดลองทั้ง 3 replicates (5 เมล็ด/กระถาง/replates)



รูปที่ 20 ตัวอย่างผลการทดสอบการทดสอบความสามารถของเชื้อรา N3-1 ในการยับยั้งเชื้อรา *P. ultimum* ในต้นกล้าพริก (บน) และต้นกล้าแตงกวา (ล่าง) treatments ต่างๆ ในภาพประกอบด้วย a) เมล็ดพืชปลูกในดินที่มี *P. ultimum* (PA), b) เมล็ดพืช treated ด้วย N3-1 spore suspension ของเชื้อรา *Trichoderma* sp. ปลูกในดินที่มี *P. ultimum* (PB), c) เมล็ดพืชปลูกในดินที่คลุก N3-1 spore suspension และมี *P. ultimum* (PC) และ d) เมล็ดพืช treated ด้วย N3-1 culture filtrate ปลูกในดินที่มี *P. ultimum* (PD)

## บทวิจารณ์

ในโครงการวิจัยนี้ผู้วิจัยต้องการค้นหาเชื้อราที่สามารถเป็น antagonist ต่อเชื้อราโรคพืช และต้องการค้นหาเชื้อราที่สร้างเอนไซม์ที่สลายผนังเซลล์โดยเฉพาะเอนไซม์ chitinase ที่มีประสิทธิภาพสูงจากเชื้อราซึ่งสามารถนำไปใช้ในการเพิ่มความสามารถในการควบคุมโรคและศัตรูพืชของ biological control agent ได้ โดยผู้วิจัยได้แยกเชื้อราจากตัวอย่างดินจากแหล่งต่างๆ จากนั้นจึงนำเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้ทั้งหมด 127 isolates ไปทดสอบคัดกรองหาเชื้อราที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ chitinase โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อราแต่ละ isolate ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ chitin selective medium พบเชื้อราจำนวน 37 isolates ที่สามารถเจริญได้ดีบน chitin selective medium และมีการสร้าง clear zone บน chitin selective medium หรือทำให้อาหาร chitin selective medium สีขึ้นอย่างเห็นได้ชัด เมื่อนำเชื้อราที่สร้าง chitinase ทั้ง 37 isolates มาทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราก่อโรคด้วยวิธี dual cultures กับเชื้อรา 4 สายพันธุ์ คือ *Aspergillus fumigatus* ซึ่งเป็นเชื้อราที่พบได้ทั่วไปและสามารถก่อให้เกิดอาการภูมิแพ้และ aspergillosis ในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่องได้ และ เชื้อราที่ก่อโรคในพืช 3 ชนิด ได้แก่ *C. heterostrophus* ซึ่งก่อให้เกิดโรค Southern corn leaf blight ในข้าวโพด, *C. gloeosporioides* ซึ่งก่อโรค anthracnose ในพืชหลายชนิด และ *P. ultimum* ซึ่งก่อโรคเน่าในพืชหลายชนิด พบว่ามีถึง 33 isolates ที่มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ใช้ในการทดสอบอย่างน้อยหนึ่งชนิด ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อราที่สร้าง chitinase เป็นเชื้อราที่มีความน่าสนใจอย่างยิ่งในการนำมาใช้เป็น biological control agent จากนั้นนำเชื้อราที่สร้าง chitinase มาทำการศึกษาทางอนุชีววิทยาโดยนำมาสกัด DNA และทำ PCR โดยใช้ primers ITS 1 และ ITS4 ซึ่งจำเพาะต่อยีน ribosomal RNA (rDNA) ของเชื้อรา หลังจากทำ PCR product ที่ได้นั้นให้บริสุทธิ์แล้วได้นำ PCR product ไปทำ sequencing พบว่าส่วนใหญ่เป็นเชื้อราใน genera *Aspergillus* และ *Trichoderma* ทั้งนี้ผู้วิจัยเมื่อได้นำ PCR products ที่ purified แล้ว มาทำการทดลองจัดกลุ่มของเชื้อราที่มี sequence คล้ายคลึงกันในเบื้องต้นด้วยการทำ amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) โดยย่อย purified products ของเชื้อราที่คัดเลือกมาด้วย restriction enzymes *HaeIII* และ *HinfI* และแยกขนาดบน agarose gel แล้วจัดกลุ่มของเชื้อราตาม restriction pattern พบว่าสามารถสังเกตเห็น pattern การย่อยของ *HaeIII* และ *HinfI* ที่แตกต่างกันได้ระหว่าง patterns ของเชื้อราใน genera *Trichoderma* และ *Aspergillus* แสดงให้เห็นถึงประโยชน์ของการนำ ARDRA มาประยุกต์ใช้ในการจัดกลุ่มเชื้อราเบื้องต้นก่อนเพื่อลดการซ้ำซ้อนของการทำ sequencing ของเชื้อราในกลุ่มเดียวกัน อย่างไรก็ตามการจะจัดกลุ่มเชื้อราอย่างละเอียดขึ้นอาจจะต้องอาศัย primers และ restriction enzymes อื่นเพิ่มเติม

ในการวิเคราะห์ความสามารถในการสร้าง chitinase ได้คัดเลือกเชื้อราที่ผ่านการคัดกรอง ว่าเจริญได้ดีบนอาหาร chitin selective medium และย่อย chitin ในอาหารจนเกิดเป็น clear zone มา purify เชื้อราที่คัดเลือกมาด้วย hyphal tips method แล้วจึงนำ มาวิเคราะห์การสร้างเอนไซม์ chitinase โดยการวัดค่า N-acetyl glucosamine และคำนวณค่า activity โดย เอนไซม์ 1 Unit = ปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้เกิด N-acetylglucosamine 1  $\mu$ mole ใน 1 นาที พบว่าเชื้อราที่คัดเลือกมาส่วนใหญ่สามารถสังเกตการสร้างเอนไซม์เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนหลังจาก inoculation เป็นเวลา 96 ชั่วโมงและส่วนใหญ่สังเกตค่า activity สูงสุดของ chitinase ได้หลังจาก inoculation เป็นเวลา 144 ชั่วโมง โดยเชื้อราที่มี activity สูงที่สุดคือเชื้อราสายพันธุ์ N6-1, N5-5 และ N3-2 (*Aspergillus* spp.) และเชื้อราสายพันธุ์ N3-1, N1-1 and N2-1 (*Trichoderma* spp.) ตามลำดับ

ถึงแม้ isolates ที่มีค่า activity สูงสุดคือ N6-1, N5-5 และ N3-2 แต่จากผลการวิเคราะห์ทางอนุชีววิทยาบ่งชี้ว่าเชื้อราดังกล่าวเป็น *A. fumigatus* ซึ่งอาจมีการสร้างสารพิษ นอกจากนี้ยังได้มีงานวิจัยที่มีการ clone ยีน chitinase จาก *A. fumigatus* แล้ว ดังนั้นผู้วิจัยจึงคัดเลือกเชื้อรา isolate N3-1 ซึ่งมี chitinase activity สูงรองลงมาและผลการวิเคราะห์ทางอนุชีววิทยาบ่งชี้ว่าเป็น *Trichoderma* sp. โดยมีความใกล้เคียงกับ *T. longibrachiatrum* เพื่อใช้ในการ clone ยีน chitinase ต่อไป โดยเตรียม cDNA library จาก mycelium ของ N3-1 ณ เวลาที่มีการแสดงออกของยีน chitinase แล้วค้นหา clone ที่มีส่วนของยีน chitinase โดยการทำการ PCR-based screening ในงานวิจัยนี้ได้ใช้ primer ซึ่งจำเพาะต่อ conserved region ของ family 18 chitinase ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. คู่กับ primer T3 ซึ่งมี annealing site บน vector ที่ใช้ในการสร้าง cDNA library โดยจากการคัดกรองพบว่าได้ผล positive ใน phage suspension pools เป็นจำนวนมาก และได้คัดเลือก plaques จากการคัดกรองโดย PCR-based screening นี้ที่คาดว่าจะมี chitinase cDNA อยู่ ซึ่งขณะที่เตรียมรายงานนี้ยังอยู่ในระหว่างการรอผลการบ่งชี้ plaques ที่มียีน chitinase จากการทดลองนี้การที่มีผล positive ใน pools ของ phage จำนวนมากนั้นอาจเป็นเนื่องมาจากการที่ con2F ซึ่งออกแบบจาก conserved region ของยีน chitinase มี nonspecificity สูง ดังนั้นการใช้ primers ที่มี specificity สูงขึ้นอาจทำให้ได้ผลที่ชัดเจนยิ่งขึ้น

สำหรับ clone ยีน chitinase จาก genomic DNA นั้นทำโดยการออกแบบ primers จาก alignment ของยีนที่ encode chitinase ขนาด 42 kDa และ homologs ของยีนนี้จากเชื้อรา *Trichoderma* spp. สายพันธุ์ต่างๆ เนื่องจากมีรายงานว่ายีนนี้บทบาทต่อความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคพืชและความสามารถในการเป็น biological control agent จากการทดลองพบว่าสามารถ clone fragment ของยีน chitinase ขนาดประมาณ 1.2 kb ได้ โดยมี sequence ที่มีความคล้ายคลึงสูงที่สุดกับยีน chitinase 18-5 (chi18-5) ของ *Hypocrea jecorina* (accession number: BK006078, 85% identity) (Seidl et al, 2005) ซึ่งยีน chi18-5 ของ *H. jecorina* (*T. reesei*) นี้ encode chitinase ขนาด 46 kDa และเป็น ortholog ยีนของ *Trichoderma* spp. ที่ encode endochitinase ขนาด 42 kDa ซึ่งใช้ในการออกแบบ primers G42F, G42R ในงานวิจัยนี้ ซึ่งขณะนี้กำลังทำการ clone fragment ที่คาดว่าจะเป็ full length fragment ของยีนนี้ซึ่งมีขนาดประมาณ 1.5 kb ซึ่งขณะที่เตรียมรายงานนี้กำลังอยู่ในระหว่างการรอผลการทำ sequencing โดยคาดว่าจะยีนนี้จะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีนเพื่อการสร้าง chitinase ได้ต่อไปในอนาคต

นอกจากนี้ยังได้ศึกษาความสามารถของเชื้อรา N3-1 ในยับยั้งเชื้อราก่อโรคในพืช โดยทำการศึกษาในระยะ post harvest และระยะต้นกล้า ผลจากการทดลองแสดงให้เห็นว่า เชื้อรา N3-1 สามารถลดอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ในผลพริกชี้ฟ้าและพริกหยวกได้ โดยสังเกตเห็นผลการยับยั้งชัดเจนต่อเชื้อรา *C. capsici* C-1511 แสดงให้เห็นถึงความน่าสนใจในการประยุกต์ใช้เชื้อรานี้และเชื้อราที่มีความสามารถในการสร้าง chitinase เป็น biological control agent เพื่อต่อต้านโรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา ทั้งนี้ นอกจากเชื้อราก่อโรคพืชที่เป็น true fungi แล้วยังพบว่าเชื้อราที่คัดกรองมาในงานวิจัยนี้จำนวนมากมีผลยับยั้งการเจริญของ *P. ultimum* ซึ่งเป็นเชื้อ oomycete ที่ก่อโรคในพืชอีกด้วยซึ่งอาจเนื่องมาจากเชื้อราที่นำมาศึกษาสามารถสร้างเอนไซม์อื่นเช่น protease และ cellulase หรือ metabolites อื่นๆ ที่มีผลต่อการเจริญ *P. ultimum* ได้ด้วย ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจศึกษาถึงความสามารถของเชื้อราที่คัดเลือกมาใช้ในการทดลองนี้ว่ามีความเป็นไปได้ที่จะใช้ในการควบคุมโรคพืชที่เกิดจาก *P. ultimum* หรือไม่ โดยจากการทดลองในต้นกล้าพริกและแตงกวา พบว่าทั้ง spore suspension และ culture filtrate ของเชื้อรา N3-1 ช่วยลดอาการของโรคที่เกิดจาก *P. ultimum* ได้ โดยเป็นที่น่าสังเกตว่าการ treat เมล็ดด้วย culture filtrate (ซึ่งได้จากการ culture เชื้อรา N3-1 ใน liquid medium ที่มี chitin เป็นองค์ประกอบ) ทำให้ต้นกล้ามีลักษณะแข็งแรงกว่า treatment อื่นๆ ซึ่งอาจเป็นผลจาก culture filtrate ที่ใช้นั้นได้มาจาก culture ของเชื้อรา N3-1 ที่บ่มใน liquid

medium ที่มี colloidal chitin นาน 6 วัน ดังนั้น ณ. เวลาที่ใช้ในการ treat พืช culture filtrate น่าจะมีเอนไซม์ หรือ metabolites อื่นๆ ที่มีผลต่อ *P. ultimum* อยู่ใน culture filtrate แล้วเมื่อเปรียบเทียบการนำ spore suspension มาใช้โดยตรงเชื่อว่าอาจต้องใช้เวลาในการเจริญสร้างเอนไซม์และ metabolites นานกว่า

## เอกสารอ้างอิง

1. Ait-Lahsen A, Soler A, Rey M, De La Cruz J, Monte E, Llobella. 2001. An Antifungal Exo- $\alpha$ -1,3-Glucanase (AGN13.1) from the Biocontrol Fungus *Trichoderma harzianum*. Appl Microbiol Biotechnol: 5833–5839.
2. Alfandari D and Darribere T. 1994. PCR Methods Appl. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA. 4: 46-49.
3. Baratto CM, Silva MV, Santi L, Passaglia L, Schrank IS, Vainstein MH, Schrank A. 2003. Expression and characterization of the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* 42 kDa chitinase in *Escherichia coli*. Can. J. Microbiol. 49: 723–726.
4. Barreto CC, Staats CC, Schrank A, Vainstein MH. 2004. Distribution of chitinases in the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and effect of N-acetylglucosamine in protein secretion. Curr. Microbiol. 48: 102–107.
5. Binod P, Sukumaran RK, Shirke SV, Rajput JC, Pandey A. 2007. Evaluation of fungal culture filtrate containing chitinase as a biocontrol agent against *Helicoverpa armigera*. J Appl Microbiol. 103(5): 1845-52.
6. Deng S, Lorito M, Penttilä M, Harman GE. 2007. Overexpression of an endochitinase gene (*ThEn-42*) in *Trichoderma atroviride* for increased production of antifungal enzymes and enhanced antagonist action against pathogenic fungi. Appl Biochem Biotechnol. 142(1): 81-94.
7. Duo-Chuan LI, Chen S, Jing LU. 2005. Purification and partial characterization of two chitinases from the mycoparasitic fungus *Talaromyces flavus*. Mycopathologia 159: 223–229.
8. Fang W, Leng B, Xiao Y, Jin K, Ma J, Fan Y, Feng J, Yang X, Zhang Y, Pei Y. 2005. Cloning of *Beauveria bassiana* chitinase gene *Bbchit1* and its application to improve fungal strain virulence.
9. Gan Z, Yang J, Tao N, Yu Z, Zhang KQ. 2007. Cloning and expression analysis of a chitinase gene *Crchi1* from the mycoparasitic fungus *Clonostachys rosea* (syn. *Gliocladium roseum*). J Microbiol. 45(5): 422-30.
10. Howell CR. 2003. Mechanisms Employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The History and Evolution of Current Concepts. Plant Disease 87 (1): 4-10.
11. Hunt J, Boddy L, Randerson PF, Rogers HJ. 2004. An evaluation of 18S rDNA approaches for the study of fungal diversity in grassland soils. Microbial Ecol. 47: 385–395.
12. Ike M, Nagamatsu K, Shioya A, Nogawa M, Ogasawara W, Okada H, Morikawa Y. 2006. Purification, characterization, and gene cloning of 46 kDa chitinase (Chi46) from *Trichoderma reesei* PC-3-7 and its expression in *Escherichia coli*. Appl Microbiol Biotechnol 71: 294–303.
13. Israel DI. 2003. PCR-based Method for Screening Libraries. In PCR Primer, 2nd edition (eds. Dieffenbach and Dveksler), Chapter 24. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
14. Janisiewicz WJ and Korsten L. Biological control of postharvest diseases of fruits. Annu. Rev. Phytopathol. 2002. 40:411–41

15. Kim DJ, Baek JM, Uribe P, Kenerley CM, Cook DR. 2002. Cloning and characterization of multiple glycosyl hydrolase genes from *Trichoderma virens*. *Curr Genet* 40:374–384.
16. Klemsdal SS, Clarke JL, Hoell IA, Eijssink VG, Brurberg MB. 2006. Molecular cloning, characterization, and expression studies of a novel chitinase gene (*ech30*) from the mycoparasite *Trichoderma atroviride* strain P1. *FEMS Microbiol Lett* 256: 282–289.
17. Limón MC, Chacón MR, Mejías R, Delgado-Jarana J, Rincón AM, Codón AC, Benítez T. 2004. Increased antifungal and chitinase specific activities of *Trichoderma harzianum* CECT 2413 by addition of a cellulose binding domain. *Appl Microbiol Biotechnol* 64: 675–685.
18. Liu D, Coloe S, Baird R, Pedersen J. 2000. Rapid Mini-Preparation of Fungal DNA for PCR. *J Clin Microbiol*: 471
19. Liu PG and Yang Q. 2005. Identification of genes with a biocontrol function in *Trichoderma harzianum* mycelium using the expressed sequence tag approach. *Research in Microbiol.* 156: 416–423.
20. Punja ZK and Utkhed RS. 2003. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. *TRENDS in Biotechnology* 21(9):400-407.
21. Rast DM, Baumgartner D, Mayer C, Hollenstein GO. 2003. Cell wall associated enzymes in fungi. *Phytochemistry* 64: 339–366.
22. Sambrook J. and Russell D.W. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual*, 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
23. Seidl V, Huemer B, Seiboth B, Kubicek CP. 2005. A complete survey of *Trichoderma* chitinases reveals three distinct subgroups of family 18 chitinases. *FEBS Journal* 272: 5923–5939.
24. Silva M, Santi L, Staats CC, Miura da Costa A, Colodel EM, Driemeier D, Hvainstein M, Schrank A. 2005. Cuticle-induced endo/exoacting chitinase CHIT30 from *Metarhizium anisopliae* is encoded by an ortholog of the *chi3* gene. *Research in Microbiology* 156 382–392.
25. Sul OJ, Kim JH, Park SJ, Son YJ, Park BR, Chung DK, Jeong CH, Han IS. 2004. Characterization and molecular cloning of a novel endoglucanase from *Trichoderma* sp. C-4. *Appl Microbiol Biotechnol.* 66: 63–70.
26. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR protocols: A guide to methods and applications*: 315-322. Academic Press, San Diego, CA.

**Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.**

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ : Manuscript in preparation

Expected Title: Molecular characterization of chitinase producing soil fungal isolate and potential application as biocontrol agent against fungal phytopathogens.

Journal: คาดว่าจะส่งตีพิมพ์ใน Letters in Applied Microbiology ภายในเดือนกันยายน 2551