



การโคลนยีนไคตินเนสจากเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นความต้านทานโรคใบจุดเป้าหมายในมะเขือเทศ

Chitinase Gene Cloning from Effective Isolate of *Trichoderma harzianum* for Target Spot Resistant Induction of Tomato

สุวิตา แสไพศาล*, วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์ และพัฒนา ศรีฟ้า สุนเนอร์

Suwita Saepisan*, Weerasak Saksirirat and Pattana Srifah Huehne

ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร, ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตรเพื่อเศรษฐกิจที่ยั่งยืน มหาวิทยาลัยขอนแก่น และศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สบว.) สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ (AG-BIO/PERDO-CHE)

*Correspondent author: au_suwita@hotmail.com

Received February 8, 2011

Accepted April 26, 2011

บทคัดย่อ

การโคลนยีนไคตินเนสจากเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ซึ่งเป็นไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นความต้านทานโรคใบจุดเป้าหมายในมะเขือเทศ โดยเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีนไคตินเนสด้วยเทคนิค PCR ได้ผลิตพันธุ์ PCR ที่มีขนาดประมาณ 1,200 คู่เบส เมื่อทำการโคลนยีนไคตินเนส โดยเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์ PCR กับเวกเตอร์ pGEM-T พบว่าโคลนของเชื้อรา *T. harzianum* มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *T. harzianum* chit-HAR2 gene for endochitinase-HAR2 (AB041752) ของฐานข้อมูล GenBank 99% และมีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับ endochitinase-HAR2 ของเชื้อรา *Hypocrea lixii* (BAB40590) 98 % ยีนไคตินเนสที่ได้จากการศึกษานี้สามารถนำไปใช้ในการส่งถ่ายยีนเข้าสู่มะเขือเทศเพื่อปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศให้มีความต้านทานต่อโรคของมะเขือเทศ

Abstract

Chitinase gene was cloned from the effective isolate of *T. harzianum* for target spot resistant induction of tomato. The chitinase gene was amplified by the PCR technique. The PCR product obtained was approximately 1,200 bp. PCR product was cloned using pGEM-T vector. Results showed nucleotide sequence of that the cloned gene of *T. harzianum* was similar to that of *T. harzianum* chit-HAR2 gene for endochitinase-HAR2 (AB041752) with 99% identity and for amino acid sequence 98% was similar to that of endochitinase-HAR2 from the teleomorph of *T. harzianum* (*Hypocrea lixii*), (BAB40590) based on the GenBank database. The cloned chitinase gene obtained from this study could be constructed and transferred to tomato plants for improving disease resistance.

คำสำคัญ: ยีนไคตินเนส ใบจุดเป้าหมาย มะเขือเทศ ไตรโคเดอร์มา

Keywords: Chitinase gene, target spot, tomato, *Trichoderma*

1. บทนำ

เชื้อรา *Trichoderma* spp. เป็นเชื้อราในกลุ่ม Deuteromycetes นิยมนำมาใช้ในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีเป็นอย่างมากเนื่องจากมีกลไกในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชหลายกลไก ได้แก่ การสร้างสารปฏิชีวนะที่มีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรคพืช การแก่งแย่งแข่งขันและครอบครองพื้นที่จากการเจริญเติบโตและสร้างสปอร์ได้อย่างรวดเร็วในดิน และการเป็นปรสิต โดยการสร้างเส้นใยพันรัดเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืช จากนั้นสร้างเอนไซม์ย่อยสลาย ได้แก่ เอนไซม์ chitinase, β -1,3-glucanase, protease และ cellulase ออกมาย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อราสาเหตุโรคพืช เอนไซม์ chitinase ทำหน้าที่ย่อยสลายไคตินซึ่งเป็นสารประกอบที่เกิดจากการเชื่อมต่อกันของ N-acetyl-D-glucosamine ด้วยพันธะ β -1,4-glycosidic bond (Fukamizo, 2000) chitinase เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทหลักในกลไกการเป็นปรสิต เนื่องจากผนังเซลล์ของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคพืชส่วนใหญ่มีไคตินเป็นองค์ประกอบ เช่น *Sclerotium rolfii*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium* sp. และ *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* เป็นต้น เชื้อรา *Trichoderma* ที่สามารถสร้างเอนไซม์ chitinase และมีกิจกรรมของเอนไซม์สูง มักแสดงความสามารถในการควบคุมเชื้อรา *S. rolfii* ได้ดี (El-Katatny et al., 2001) นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์ chitinase ในพืชเป็น pathogenesis-related (PR) protein มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดความต้านทานของพืช ซึ่งถูกจัดอยู่ในกลุ่มของ PR-3, PR-4, PR-8 และ PR-11 (Van Loon and Van Strien, 1999) ทั้งนี้เอนไซม์ chitinase ถูกควบคุมการสร้างโดยยีนไคตินเนส ในปัจจุบันได้มีการนำวิธีการทางเทคโนโลยีชีวภาพมาประยุกต์ใช้ประโยชน์ทางด้านเกษตรกรรมเพิ่มมากขึ้น ทำให้สามารถเพิ่มปริมาณและโคลนยีนไคตินเนสได้ (Little and Magill, 2003) ยีน

ไคตินเนสที่โคลนได้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการส่งถ่ายยีนจากเชื้อรา *Trichoderma* เข้าสู่พืช ช่วยส่งเสริมให้พืชมีความต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้หลายชนิดเพิ่มมากขึ้น (Lorito et al., 1998) ในประเทศไทยยังมีการศึกษาถึงการให้ประโยชน์ของยีนไคตินเนสจากเชื้อราปฏิปักษ์น้อยมาก ดังนั้นการวิจัยจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อโคลนยีนไคตินเนสจากเชื้อรา *T. harzianum* ไอโซเลต 162 ซึ่งเป็นไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นความต้านทานต่อโรคใบจุดเป่ากระสุนในมะเขือเทศ สำหรับนำยีนไคตินเนสที่ได้มาประยุกต์ใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศให้มีความต้านทานต่อโรคต่อไป

2. วิธีวิจัย

2.1 การสกัดอาร์เอ็นเอ

เลี้ยงเชื้อรา *T. harzianum* ไอโซเลต 162 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการกระตุ้นความต้านทานในมะเขือเทศต่อเชื้อรา *Corynespora cassicola* สาเหตุโรคใบจุดเป่ากระสุนของมะเขือเทศ (สุวิดา และคณะ, 2554; ระหว่างตีพิมพ์) ในอาหาร PDA ผสม 2.4% colloidal chitin เป็นเวลา 7 วัน นำมาสกัดอาร์เอ็นเอด้วยวิธี Trizol RNA Extraction โดยนำเส้นใยมาบดในโกร่งแช่เย็น เติมนิโตรเจนเหลวบดเส้นใยให้ละเอียดเป็นผง ตักตัวอย่างใส่หลอดไมโครทิวป์ปริมาตร 1/3 ของหลอด เติมนิโตรเจนเหลว 500 μ l ผสมให้เข้ากัน บ่มที่ 37 °C นาน 3 นาที เติมนิโตรเจนเหลว 200 μ l เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่ 37 °C นาน 3 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12000 rpm อุณหภูมิ 4 °C นาน 10 นาที ดูดส่วนใสให้หมด เติมนิโตรเจนเหลว 500 μ l ผสมให้เข้ากัน โดยพลิกหลอดกลับป้อนมา นำไปวางในน้ำแข็ง นาน 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12000 rpm อุณหภูมิ 4 °C นาน 10 นาที ดูดส่วนใสออกให้หมด ล้างตะกอนด้วย 75% ethanol 1 ml ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12000 rpm อุณหภูมิ 4 °C นาน 10 นาที เทส่วน

ใส่ทิ้งให้หมด รอให้ตะกอนแห้งประมาณ 10 นาที ละลายตะกอนด้วย DEPC 30 μ l นำไปวิเคราะห์คุณภาพและความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอที่เตรียมได้ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) เก็บอาร์เอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

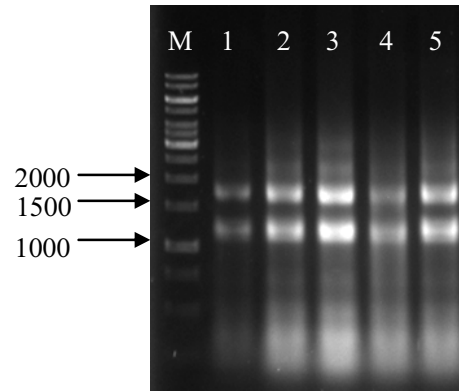
2.2 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนไคตินเนส

นำอาร์เอ็นเอที่ได้มาทำ first strand cDNA ด้วยชุด Ready-to-Go T-primed Kit (GE Healthcare, USA) จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณยีนไคตินเนสโดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบเพื่อเพิ่มปริมาณยีนไคตินเนส ขนาดน้ำหนักโมเลกุล 42 kDa ซึ่งควบคุมการสร้างเอนไซม์ endochitinase มีลำดับนิวคลีโอไทด์ คือ 5'-ACGCAAAACGCC GTCTACTTCACCAA-3' และ 5'-GCATCCC AGAACATGCTGCCTCCCA-3' ใช้โปรแกรม PCR ดังนี้ คือ 95°C 1 นาที 59°C 30 วินาที 72°C 2 นาที จำนวน 35 รอบ (Baek et al., 1999) นำผลิตภัณฑ์ PCR มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด Kit hiyield™ Gel/PCR DNA extraction Kit (Real Biotech, Taiwan)

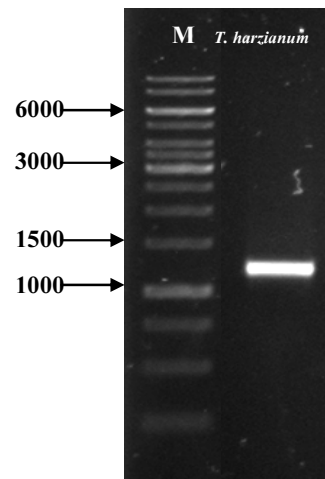
2.3 การโคลนยีนไคตินเนส

นำผลิตภัณฑ์ PCR มาเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pGEM-T โดยใช้ชุดทดสอบ pGEM-T Easy Kit (Promega, USA) สร้างยีนไคตินเนสสายผสม (recombinant DNA) เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* (XL1-blue) และนำไปเลี้ยงบนอาหาร LB-Ampicillin ที่มี IPTG และ X-gal คัดเลือกโคลนด้วยเทคนิค blue-white screening นำโคลนที่คัดเลือกได้มาสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัดพลาสมิด Kit AxyPrep Plasmid Miniprep Spin Proto-col (Axygen Biosciences, USA) ยืนยันผลการโคลนยีนด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ T7, SP6 และไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีนไคตินเนส ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR เพื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลนที่ได้มา

เปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับ



รูปที่ 1. ขนาดชิ้นส่วนอาร์เอ็นเอของเชื้อรา *Trichoderma harzianum*, แถวที่ 1-5 คือ อาร์เอ็นเอของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* และ M คือ 1KB DNA Ladder Plus

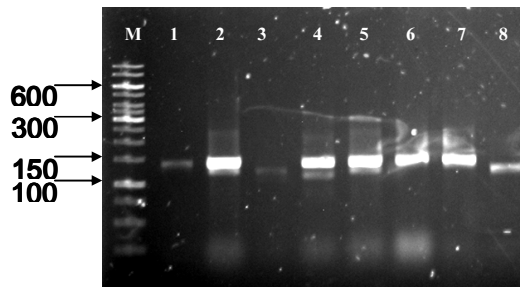


รูปที่ 2. ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ขนาด 1,200 คู่เบส เมื่อเพิ่มปริมาณในส่วนของยีนไคตินเนสด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณยีนไคตินเนส ขนาดน้ำหนักโมเลกุล 42 kDa, M คือ 1KB DNA Ladder Plus

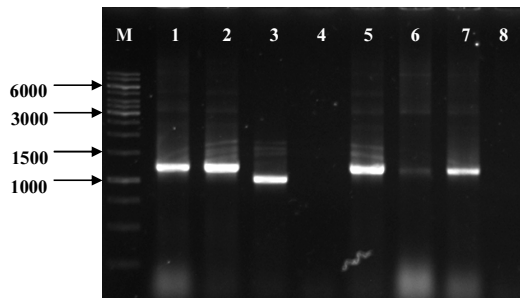
กรดอะมิโนในฐานข้อมูล GenBank

3. ผลการวิจัย

จากการสกัดอาร์เอ็นเอของเชื้อรา *T. harzianum* (รูปที่ 1) นำมาเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนไคตินเนส ได้ผลิตภัณฑ์ PCR มีขนาดประมาณ 1,200 คู่เบส (รูปที่ 2) เมื่อทำการโคลนยีนไคตินเนส สามารถคัดเลือกโคลนได้จำนวน 8 โคลน ตรวจสอบโคลนที่ได้ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้



รูปที่ 3. ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* เมื่อทำการคัดเลือกโคลนด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ T7 และ SP6, แถวที่ 1-8 คือ โคลนที่ 1-8 ของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* และ M คือ 1KB DNA Ladder Plus



รูปที่ 4. ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* เมื่อทำการยืนยันผลการโคลนด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณยีนไคตินเนส, แถวที่ 1-8 คือ โคลนที่ 1-8 ของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* และ M คือ 1KB DNA Ladder Plus

ไพรเมอร์ T7 และ SP6 พบผลิตภัณฑ์ PCR ขนาดประมาณ 1,400 คู่เบส ในโคลนที่ 1, 2, 4, 5, 6 และ 7 ส่วนโคลนที่ 3 และ 8 ผลิตภัณฑ์ PCR มีขนาดต่ำกว่า 1,400 คู่เบส (รูปที่ 3) ทำการยืนยันผลการโคลนยีนไคตินเนสอีกครั้งโดยใช้ไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนไคตินเนส พบว่าโคลนที่ 1, 2, 5, 6 และ 7 ได้ผลิตภัณฑ์ PCR ขนาดประมาณ 1,200 คู่เบส โคลนที่ 3 ได้ผลิตภัณฑ์ PCR ขนาดประมาณ 1,000 คู่เบส ส่วนโคลนที่ 4 และ 8 ไม่พบผลิตภัณฑ์ PCR (รูปที่ 4) ดังนั้นจึงได้คัดเลือกนำโคลนที่มีผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 1,200 คู่เบส ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์และทำการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนใน

ฐานข้อมูล GenBank พบว่ามีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อรา *T. harzianum* *chit-HAR2* gene for endo-chitinase-HAR2 (AB041752) 99% และมีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับ endochitinase-HAR2 ของเชื้อรา *H. lixii* (BAB40590) 98%

4. สรุปและอภิปราย

การโคลนยีนไคตินเนสจากเชื้อรา *T. harzianum* พบว่าชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนไคตินเนสสามารถเพิ่มปริมาณได้ผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 1,200 คู่เบส และสามารถโคลนยีนไคตินเนสได้จากเชื้อรา *T. harzianum* ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อรา *T. harzianum* *chit-HAR2* gene for endo-chitinase-HAR2 (AB 041752) 99% และลำดับกรดอะมิโนมีความเหมือนกับ endochitinase-HAR2 ของเชื้อรา *H. lixii* (BAB40590) 98% ซึ่งสอดคล้องกับ Jinzhu และคณะ (2005) ที่ได้ศึกษาการแสดงออกของยีนไคตินเนส โดยโคลนยีนไคตินเนส (*ech42*) ที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุล 42kDa ใกล้เคียงกับขนาดของยีนไคตินเนสที่พบในเชื้อรา *T. harzianum* (De la Cruz et al., 1992) จากเชื้อรา *T. aureoviride* และส่งถ่ายยีนเข้าสู่เชื้อรา *Saccharomyces cerevisiae* เมื่อทำการตรวจสอบยีนที่ทำการส่งถ่ายและเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล GenBank พบว่ามี accession number คือ AY 850032 มีความเหมือนกับยีน *chi42* ของเชื้อรา *T. viride* 98% ยีน *chi42* ของเชื้อรา *T. viride* สายพันธุ์ ATTC32630 91% ยีน *ech42* จากเชื้อรา *T. harzianum* 97% ยีน *chiHAR3* จากเชื้อรา *T. harzianum* SK-55 93 เปอร์เซ็นต์ และยีน *THECH42* จากเชื้อรา *T. harzianum* IMI 206040 93% และพบว่ายีน *ech42* จากเชื้อรา *T. aureoviride* นี้จะสังเคราะห์โปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 421 กรดอะมิโน ซึ่งเป็นรหัสในการสังเคราะห์เอนไซม์ chitinase

ในต่างประเทศได้มีการศึกษาการส่งถ่ายยีนไคตินเนสจากเชื้อรา *Trichoderma* เข้าสู่พืช โดย

Lorito และคณะ (1998) ได้โคลนยีน endochitinase *ThEn-42* จากเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ P1 (ATCC7 4058) และยีน *chi42* จากเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CECT 2413 โดยใช้เวกเตอร์ pBI121 ในการเชื่อม ต่อยีน *ThEn-42* ส่วนยีน *chi42* จะเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pBin19 ซึ่งทั้ง 2 เวกเตอร์มีโปรโมเตอร์ คือ CaMV35S จากนั้นนำเวกเตอร์ลูกผสมที่ได้เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ LBA 4404 และทำการส่งถ่ายยีนนี้เข้าสู่ต้นยาสูบและมะเขือเทศ พบว่ามียาสูบและมะเขือเทศที่ได้รับยีนไคตินเอสมีระดับการแสดงออกของยีนที่สูงกว่าพืชปกติ และสามารถต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อราสาเหตุโรคหลายชนิด คือ *A. alternata*, *A. solani*, *B. cinerea* และ *R. solani* เช่นเดียวกับการศึกษาของ Howell (2003) ที่พบว่ายาสูบและมันฝรั่งที่ได้รับการส่งถ่ายยีนไคตินเอส (*chit42*) จากเชื้อรา *T. harzianum* มีความต้านทานในระดับสูงต่อเชื้อราสาเหตุโรคดังกล่าว อีกทั้งบดล็อกโคลี่ที่ได้รับยีนควบคุมการสร้างเอนไซม์ endochitinase จากเชื้อรา *T. harzianum* มีความต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา *A. brassicicola* ซึ่งสอดคล้องกับ Gaetano และคณะ (2008) ได้ศึกษาการส่งถ่ายยีนไคตินเอส (*chit42*) ที่ควบคุมการแสดงออกของเอนไซม์ endochitinase จากเชื้อรา *T. harzianum* เข้าสู่เมลอน (melon) พบว่าเมลอนที่ได้รับยีน *chit42* มีความต้านทานต่อเชื้อรา *B. cinerea* สาเหตุโรค grey mold ในพืชตระกูลส้มมีกิจกรรมของเอนไซม์ endochitinase ในระดับสูงมากขึ้น และยังพบการแสดงออกของโปรตีนหลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับระบบการป้องกันตนเองของพืชในระดับสูงด้วย สำหรับในประเทศไทยนั้นพบว่าการนำยีนไคตินเอสของเชื้อรา *Trichoderma* มาประยุกต์ใช้ประโยชน์เช่นกัน จิตติมา และคณะ (2553) ได้โคลนยีน *chi42* ที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ไคตินเอสจากเชื้อรา *T. harzianum* และส่ง

ถ่ายยีนเข้าสู่ยีสต์ *Pichia pastoris* เพื่อการผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ ส่วนการส่งถ่ายยีนไคตินเอสจากเชื้อรา *Trichoderma* เข้าสู่มะเขือเทศเพิ่มความต้านทานโรคนั้นยังไม่พบรายงาน

จากการทดลองชี้ให้เห็นว่ายีนไคตินเอสของเชื้อรา *T. harzianum* สามารถเพิ่มปริมาณและโคลนยีนได้ ซึ่งจะเป็นแนวทางหนึ่งในการใช้ประโยชน์ไคตินเอสโดยการประยุกต์ใช้ร่วมกับเทคนิคทางด้านพันธุวิศวกรรมในการสร้างสายพันธุ์ มะเขือเทศให้ต้านทานต่อการเข้าทำลายจากเชื้อราสาเหตุโรคพืช โดยการส่งถ่ายยีนไคตินเอสจากเชื้อรา *T. harzianum* เข้าไปในมะเขือเทศ หรือตัดต่อยีนไคตินเอสเข้าไปในจีโนมของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ชนิดอื่นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืชให้มากยิ่งขึ้น

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตรเพื่อเศรษฐกิจที่ยั่งยืน มหาวิทยาลัยขอนแก่น และศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนานวัตกรรมการศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สว.) สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ (AG-BIO/PERDO-CHE) ที่ได้สนับสนุนทุนวิจัย และกลุ่มวิจัยการเพาะเลี้ยงไหมป่าและพัฒนาผลิตภัณฑ์เพื่อสร้างมูลค่าเพิ่ม ที่ให้ความอนุเคราะห์การใช้เครื่องมือในการวิจัย

6. เอกสารอ้างอิง

จิตติมา เอื้องกิตติกุล, วรณวิไล อินทนู, จิระเดช แจ่มสว่าง และ กนกวรรณ รมยานนท์. 2553. การโคลนยีน *chi 42* ที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ไคตินเอสจากเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ในยีสต์ *Pichia pastoris* เพื่อการผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์. วารสารวิทยาศาสตร์. 40(3): 427-438.
 สุวิดา แสไพศาล, วีระศักดิ์ สักดิ์ศิริรัตน์, และพัฒนา ศรีฟ้า สุนเอนอร์. 2554. การชักนำให้มะเขือเทศสร้างความต้านทานโรคใบจุดเปื้อนกระสุนโดยเชื้อรา *Trichoderma* spp. และ

- กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลาย. วารสารวิจัย มข. 16(3): (กำลังจัดพิมพ์).
- Baek, J.M., Howell, C.R. and Kelerney, C.M. 1999. The role of extracellular chitinase from *Trichoderma virens* GV29-8 in the biocontrol of *Rhizoctonia solani*. **Curr Genet.** 35: 41-50.
- De la Cruz, J., Hidalgo-Gallego, A., Lora, J.M., Benitez, T., Pintor-Toro, J.A. and Llobell, A.. 1992. Isolation and characterization of three chitinase from *Trichoderma harzianum*. **Eur J Biochem.** 206: 859-867.
- El-Katatny, M.H., Gudelj, M., Robra, K.H., Elnaghy, M.A. and Gübitz, G.M. 2001. Characterization of a chitinase and endo- β -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum* Rifai T24 involved in control of the phytopathogen fungi *Sclerotium rolfsii*. **Appl Microbiol Biotechnol.** 56: 137-143.
- Fukamizo, T. 2000. Chitinolytic enzymes: catalysis substrate-binding and their application. **Curr Protein Peptide.** 1: 105-124.
- Gaetano, D., La Malfa, S., Vitalev, A., Lorito, M., Deng, Z. and Gentile, A. 2008. Defence-related gene expression in transgenic lemon plants producing an antimicrobial *Trichoderma harzianum* endochitinase during fungal infection. **Transgenic Res.** 17(5): 873-879.
- Howell, C.R. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant disease: The history and evolution of current concepts. **Pl Dis.** 87(1): 4-10.
- Jinzhu, S., Qian, Y., Beidong, L. and Dianfu, C. 2005. Expression of the chitinase gene from *Trichoderma aureoviride* in *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl Microbiol Biotechnol.** 69: 39-43.
- Little, C.R. and Magill, C.W. 2003. Elicitation of defense response genes in sorghum floral tissue inflected by *Fusarium thapsinum* and *Curvularia lutana* at anthesis. **Physiol Mol Pl Pathol.** 63: 271-279.
- Lorito, M., Woo, S.L., Garcia Fernandez, I., Colucci, G., Harman, G.E., Pintor-Toro, J.A., Filippone, E., Muccifora, S., Lawrence, C.B., Zoina, A., Tuzun, S. and Scala, F. 1998. Genes from mycoparasitic fungi as a novel source for improving plant resistance to fungal pathogens. **Proc. Natl Acad Sci USA.** 95: 7860-7865.
- Van Loon, L.C. and Van Strien, E.A. 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiol Molec Pl Pathol.** 55: 85-97.