

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การควบคุมโรคผลเน่าของลองกองหลังการเก็บเกี่ยว โดยใช้เอนไซม์ไคตินเนสที่ผลิต
โดยเชื้อรา *Metarhizium guizhouense* PSUM04
ที่ใช้ของเหลือทิ้งจากการแปรรูปกุ้งและปูเป็นแหล่งคาร์บอน

Control of postharvest fruit rot of longkong using chitinase produced
by *Metarhizium guizhouense* PSUM04 with shrimp and crab wastes as
carbon sources

ผู้วิจัย

ดร. ธัญชนก ไชยรินทร์

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินรายได้มหาวิทยาลัย ประเภททุนอุดหนุน
จารย์มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
ประจำปีงบประมาณ 2/2557 รหัสโครงการ NAT570507S

[ข]

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การควบคุมโรคผลเน่าของลองกองหลังการเก็บเกี่ยว โดยใช้เอนไซม์ไคตินเนสที่ผลิตโดยเชื้อรา *Metarhizium guizhouense* PSUM04 ที่ใช้ของเหลือทิ้งจากการแปรรูปกุ้งและปูเป็นแหล่งคาร์บอน

(ภาษาอังกฤษ) Control of postharvest fruit rot of longkong using chitinase produced by *Metarhizium guizhouense* PSUM04 with shrimp and crab wastes as carbon sources

ชื่อคณะผู้วิจัย ดร. ธัญชนก ไชยรินทร์
ภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ

สารบัญ

รายการ	หน้า
รายการตาราง	ง
รายการภาพประกอบ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ช
บทคัดย่อ	1
Abstract	2
บทนำ	3
วัตถุประสงค์ของโครงการ	4
ตรวจเอกสาร	4
วิธีการทดลอง	6
ผลการทดลองและวิจารณ์	11
สรุปผลการทดลอง	33
เอกสารอ้างอิง	34
ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะสำหรับการวิจัยต่อไป	37
ภาคผนวก	
บทความที่ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ	38

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) ระดับในการทดลอง และ ปริมาณปัจจัยที่ใช้ ของสภาวะในการผลิตเอนไซม์โคติเนสโดย <i>Metarhizium guizhouense</i> PSUM04	8
2	การทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) ระดับในการทดลอง และ ปริมาณปัจจัยที่ใช้ ของปัจจัยในการใช้เอนไซม์โคติเนสเพื่อควบคุมการเจริญของ เชื้อราก่อโรคบนอาหารเลี้ยงเชื้อ	10
3	สถานที่เก็บตัวอย่างผลลองกอง และเชื้อราก่อโรคผลเน่าของลองกองที่พบในแต่ละพื้นที่	12
4	ดัชนีความหลากหลายของชนิดเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของลองกองในแต่ละพื้นที่ เก็บตัวอย่าง	13
5	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของตัวแปร/ปัจจัย แบบ response surface quadratic model ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์โคติเนส	17
6	กิจกรรมของเอนไซม์ของน้ำคั้นจากเปลือกของลองกองที่ถูกกระตุ้นด้วย <i>M. guizhouense</i> PSUM04	20
7	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของตัวแปร/ปัจจัย แบบ response surface quadratic model ที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>Botrytis</i> sp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA	23
8	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของตัวแปร/ปัจจัย แบบ response surface quadratic model ที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>Fusarium</i> sp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA	25
9	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของตัวแปร/ปัจจัย แบบ response surface quadratic model ที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>Pestalotiopsis</i> sp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA	27

รายการภาพประกอบ

ภาพที่		หน้า
1	โคตินที่ผลิตเป็นการค้า (a) และ โคตินที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้ (b)	6
2	รา <i>Botrytis</i> sp.; (a) โคลนีอายุ 3 วัน บนอาหาร PDA (b) conidia บนก้าน conidiophore และ (c) conidia (bar = 10 μ m)	14
3	รา <i>Fusarium</i> sp.; (a) โคลนีอายุ 3 วัน บนอาหาร PDA (b) macroconidia บนก้าน conidiophore และ (c) microconidia และ macroconidia (bar = 40 μ m)	14
4	รา <i>Pestalotiopsis</i> sp.; (a) โคลนีอายุ 7 วัน บนอาหาร PDA (b) acervular conidiomata with young conidia และ (c) mature conidia (bar = 10 μ m)	14
5	วงใส (clear zone) บนอาหาร colloidal chitin agar โดยเชื้อรา <i>Metarhizium guizhouense</i> PSUM04	15
6	ปัจจัยที่มีผลต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์ไคตินเนส; (a) อุณหภูมิ (b) ระยะเวลาในการบ่ม (c) อัตราส่วนระหว่างของแข็งและของเหลว และ (d) pH	16
7	ความสัมพันธ์ของปัจจัยที่มีผลต่อค่าการทำงานของเอนไซม์ไคตินเนส; (a) ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารตั้งต้น และเวลา เมื่อกำหนด pH และอุณหภูมิเท่ากับ 7.0 และ 30 °C ตามลำดับ ; (b) ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารตั้งต้น และค่า pH เมื่อกำหนดอุณหภูมิ และเวลา เท่ากับ 30 °C และ 216 ชั่วโมง ตามลำดับ	18
8	ความสัมพันธ์ของปัจจัยที่มีผลต่อค่าการทำงานของเอนไซม์ไคตินเนส; (a) ความสัมพันธ์ระหว่างค่า pH และ เวลา เมื่อกำหนดความเข้มข้นของสารตั้งต้น และอุณหภูมิเท่ากับ 1.5% และ 30 °C ตามลำดับ ; (b) ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ และเวลา เมื่อกำหนดความเข้มข้นของสารตั้งต้น และค่า pH และเท่ากับ 1.5% และ 7.0 ตามลำดับ	18
9	ผลของอุณหภูมิ (a) และ pH (b) ต่อความเสถียร (stability) ของเอนไซม์ไคตินเนส	19
10	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาของสารละลายเอนไซม์ไคตินเนส	19
11	แถบโปรตีนที่ปรากฏบนเจลของ SDS-PAGE (M = protein marker, 1 = control, 2 และ 3 = น้ำคั้นจากเปลือกองุ่นหลังถูกกระตุ้นด้วย <i>M. guizhouense</i> PSUM04 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ)	20
12	การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราก่อโรคผลเน่า โดยใช้น้ำคั้นจากผลองุ่นน้ำคั้นจากเปลือกองุ่นหลังถูกกระตุ้นด้วย <i>M. guizhouense</i> PSUM04 (สีเทา) และ potassium phosphate buffer pH 7.0 (สีดำ)	21
13	เชื้อรา <i>Botrytis</i> sp. ที่เจริญตามปกติบนอาหาร PDA (ภาพขวา) และ inhibition zone บนอาหาร PDA ที่เกิดจากการยับยั้งการเจริญของรา <i>Botrytis</i> sp. โดยการใส่สารละลายเอนไซม์ไคตินเนสสกัดหยาบ (E) น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ (C) และ extraction buffer (B) (ภาพซ้าย)	21

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
14	เชื้อรา <i>Fusarium</i> sp. ที่เจริญตามปกติบนอาหาร PDA (ภาพขวา) และ inhibition zone บนอาหาร PDA ที่เกิดจากการยับยั้งการเจริญของรา <i>Fusarium</i> sp. โดยการใช้สารละลายเอนไซม์โคติเนสสกัดหยาบ (E) น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ (C) และ extraction buffer (B) (ภาพซ้าย)	22
15	เชื้อรา <i>Pestalotiopsis</i> sp. ที่เจริญตามปกติบนอาหาร PDA (ภาพขวา) และ inhibition zone บนอาหาร PDA ที่เกิดจากการยับยั้งการเจริญของรา <i>Pestalotiopsis</i> sp. โดยการใช้สารละลายเอนไซม์โคติเนสสกัดหยาบ (E) น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ (C) และ extraction buffer (B) (ภาพซ้าย)	22
16	ความสัมพันธ์ของปัจจัยที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของรา <i>Botrytis</i> sp. บนอาหาร PDA; (a) ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเอนไซม์โคติเนส และ อุณหภูมิ เมื่อกำหนดเวลาในการบ่มเท่ากับ 35 นาที; (b) ความสัมพันธ์ระหว่าง อุณหภูมิ และเวลาในการบ่มเอนไซม์ เมื่อกำหนดความเข้มข้นของเอนไซม์ 20 U/ml และ (c) ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเอนไซม์โคติเนส และเวลา เมื่อกำหนดอุณหภูมิไว้ที่ 35 °C	24
17	ความสัมพันธ์ของปัจจัยที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของรา <i>Fusarium</i> sp. บนอาหาร PDA; (a) ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเอนไซม์โคติเนส และ อุณหภูมิ เมื่อกำหนดเวลาในการบ่มเท่ากับ 35 นาที; (b) ความสัมพันธ์ระหว่าง อุณหภูมิ และเวลาในการบ่มเอนไซม์ เมื่อกำหนดความเข้มข้นของเอนไซม์ 20 U/ml และ (c) ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเอนไซม์โคติเนส และเวลา เมื่อกำหนดอุณหภูมิไว้ที่ 35 °C	26
18	ความสัมพันธ์ของปัจจัยที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของรา <i>Pestalotiopsis</i> sp. บนอาหาร PDA (a) ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเอนไซม์โคติเนส และ อุณหภูมิ เมื่อกำหนดเวลาในการบ่มเท่ากับ 35 นาที; (b) ความสัมพันธ์ระหว่าง อุณหภูมิ และเวลาในการบ่มเอนไซม์ เมื่อกำหนดความเข้มข้นของเอนไซม์ 20 U/ml และ (c) ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเอนไซม์โคติเนส และเวลา เมื่อกำหนดอุณหภูมิไว้ที่ 35 °C	28
19	เส้นใยของรา <i>Botrytis</i> sp. ใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด; (a) และ (c) กระตุ้นด้วยน้ำเปล่า (control) และภาพ (b) และ (d) กระตุ้นด้วยน้ำคั้นจาก ลองกองที่กระตุ้นด้วย <i>M. guizhouense</i> PSUM04	29
20	เส้นใยของรา <i>Fusarium</i> sp. ใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด; (a) และ (c) กระตุ้นด้วยน้ำเปล่า (control) และภาพ (b) และ (d) กระตุ้นด้วยน้ำคั้น จากลองกองที่กระตุ้นด้วย <i>M. guizhouense</i> PSUM04	29
21	เส้นใยของรา <i>Pestalotiopsis</i> sp. ใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด; (a) และ (c) กระตุ้นด้วยน้ำเปล่า (control) และภาพ (b) และ (d) กระตุ้นด้วยน้ำ คั้นจากลองกองที่กระตุ้นด้วย <i>M. guizhouense</i> PSUM04	30

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
22	การเจริญของของ <i>Botrytis</i> sp. บนผลลองกอง; (a-c) ชุดควบคุม หลังจากปลูกเชื้อราทดสอบ 48, 96 และ 120 ชั่วโมง ตามลำดับ, (d-f) ฟันสารละลายเอนไซม์ก่อนปลูกเชื้อราก่อโรค หลังจากปลูกเชื้อราทดสอบ 48, 96 และ 120 ชั่วโมงตามลำดับ และ (g-i) ปลูกเชื้อราก่อโรคร่อนจากนั้นจึงฟันสารละลายเอนไซม์ หลังจากปลูกเชื้อราทดสอบ 48, 96 และ 120 ชั่วโมง ตามลำดับ	31
23	การเจริญของของ <i>Fusarium</i> sp. บนผลลองกอง; (a-c) ชุดควบคุม หลังจากปลูกเชื้อราทดสอบ 48, 96 และ 120 ชั่วโมง ตามลำดับ, (d-f) ฟันสารละลายเอนไซม์ก่อนปลูกเชื้อราก่อโรค หลังจากปลูกเชื้อราทดสอบ 48, 96 และ 120 ชั่วโมงตามลำดับ และ (g-i) ปลูกเชื้อราก่อโรคร่อนจากนั้นจึงฟันสารละลายเอนไซม์ หลังจากปลูกเชื้อราทดสอบ 48, 96 และ 120 ชั่วโมง ตามลำดับ	31
24	การเจริญของของ <i>Pestalotiopsis</i> sp. บนผลลองกอง; (a-c) ชุดควบคุม หลังจากปลูกเชื้อราทดสอบ 24, 48 และ 96 ชั่วโมง ตามลำดับ, (d-f) ฟันสารละลายเอนไซม์ก่อนปลูกเชื้อราก่อโรค หลังจากปลูกเชื้อราทดสอบ 24, 48 และ 96 ชั่วโมง ตามลำดับ และ (g-i) ปลูกเชื้อราก่อโรคร่อนจากนั้นจึงฟันสารละลายเอนไซม์ หลังจากปลูกเชื้อราทดสอบ 24, 48 และ 96 ชั่วโมง ตามลำดับ	31
25	ร้อยละของการเกิดโรคผลเน่าของลองกองหลังจากปลูกเชื้อ; (a) <i>Botrytis</i> sp., (b) <i>Fusarium</i> sp. และ (c) <i>Pestalotiopsis</i> sp.	32
26	ร้อยละของการเกิดโรคผลเน่าของลองกองเมื่ออบไม้ที่อุณหภูมิห้อง (30 °C)	33

[ซ]

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินรายได้มหาวิทยาลัย ประภทพูนศุภจินดาจารย์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประจำปีงบประมาณ 2/2557 รหัสโครงการ NAT570507S

นักวิจัยขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.วสันต์ เพชรรัตน์ อาจารย์พี่เลี้ยง (mentor) ที่ให้คำปรึกษาในการวิจัยครั้งนี้ ขอขอบพระคุณบุคลากรทุกท่านของภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ ที่สนับสนุนในทุกด้านของการวิจัย และขอขอบพระคุณบุคลากรทุกท่านของคณะทรัพยากรธรรมชาติ ที่อำนวยความสะดวกในงานด้านเอกสารต่างๆ

ธัญชนก ไชยรินทร์

นักวิจัย

บทคัดย่อ

ลองกอง (*Lansium domesticum*) เป็นผลไม้เมืองร้อนที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของภาคใต้ ประเทศไทย แต่สาเหตุที่ทำให้คุณภาพของลองกองลดลงเกิดขึ้นเนื่องจากโรคหลังการเก็บเกี่ยว ซึ่งหนึ่งในโรคหลังการเก็บเกี่ยวที่สำคัญของลองกองได้แก่โรคผลเน่า การวิจัยครั้งนี้จึงเกิดขึ้นโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบประสิทธิภาพการใช้เอนไซม์ไคตินเนส ที่ผลิตโดยราแมลง *Metarhizium guizhouense* PSUM04 โดยใช้เปลือกกุ้งและกระดองปูที่เหลือใช้เป็นวัตถุดิบ ในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของลองกองหลังการเก็บเกี่ยว พร้อมทั้งหาศึกษาคุณสมบัติต่างๆของเอนไซม์ไคตินเนสที่ผลิตได้ และสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ไคตินเนส ผลการศึกษาพบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อราบนอาหารแบบแข็ง (solid state cultivation) ด้วยรำข้าวสาลี กระดองปูทะเลเย็ด และ colloidal chitin ในอัตราส่วน 1.5: 1.5: 1 ที่มีอัตราส่วนระหว่างอาหารแข็งและเหลว (S/L ratio) 3:1 และ 4:2 pH 7.4 และสภาวะที่เหมาะสมในการบ่มเชื้อ คืออุณหภูมิ 32°C เป็นเวลา 11 วัน มีค่ากิจกรรมไคตินเนสสูงสุด 2.51 U/ml โดยค่ากิจกรรมมีความเสถียรที่อุณหภูมิ 20-40 °C และ pH 5.0-8.0 ไคตินเนสที่ผลิตได้สามารถยับยั้งการเจริญของรา *Botrytis* sp., *Fusarium* sp. และ *Pestalotiopsis* sp. ที่เป็นสาเหตุโรคผลเน่าหลังการเก็บเกี่ยวของลองกองบนงานอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 44.7, 42.9 และ 43.6% ตามลำดับ และสปอร์แขวนลอยของ *M. guizhouense* PSUM04 ที่ความเข้มข้น 1×10^4 สปอร์/มล ยังกระตุ้นให้ผลลองกองสร้าง pathogenesis-related protein (PR protein) ขนาด 25-27 และ 43 kDa ได้แก่ไคตินเนส และ ปีตา-1,3- กลูคาเนส และสามารถยับยั้งการเจริญของราก่อโรคผลเน่าบนงานอาหารเลี้ยงเชื้อได้เช่นกัน เมื่อตรวจสอบลักษณะเส้นใยของเชื้อราก่อโรคภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบอิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (SEM) พบว่าเส้นใยของ *Botrytis* sp., *Fusarium* sp. และ *Pestalotiopsis* sp. มีรูปร่างผิดปกติไป บิดเบี้ยว และฉีกขาด นอกจากนี้เส้นใยของ *Fusarium* sp. และ *Pestalotiopsis* sp. ยังมีความหนาแน่นลดลงอีกด้วย เมื่อพ่นสารละลายเอนไซม์ไคตินเนสบนผลลองกอง สามารถชะลอการเกิดโรคผลเน่าเนื่องจากเชื้อรา *Botrytis* sp. ได้ 48.8 % และชะลอการเกิดผลเน่าเนื่องจากรา *Pestalotiopsis* sp. ได้ 24.3% เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ($p < 0.05$) แต่ไม่สามารถชะลอการเกิดโรคผลเน่าที่เกิดจากเชื้อรา *Fusarium* sp. ได้ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ($p > 0.05$) เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (30°C) เป็นเวลา 7 วัน นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบการใช้สารละลายเอนไซม์ไคตินเนส กับการใช้สปอร์แขวนลอยของ *M. guizhouense* PSUM04 โดยตรง และการใช้สารคาร์เบนดาซิม พบว่าที่ 24 ชั่วโมง ลองกองที่จุ่มในสปอร์เชื้อราแขวนลอย และสารเคมี ไม่แสดงอาการผลเน่า ส่วนลองกองที่จุ่มในสารละลายเอนไซม์ เกิดผลเน่าเล็กน้อยที่ 12% ต่างจากชุดควบคุมที่เกิดผลเน่า 40% แต่หลังจากนั้นลองกองแสดงอาการผลเน่าอย่างรวดเร็ว จนเน่าสมบูรณ์ 100% หลังจากบ่มไว้ 120 ชั่วโมง มีเพียงลองกองที่จุ่มในสปอร์ของเชื้อรา และที่ใช้สารเคมีเท่านั้น ที่แสดงอาการผลเน่า 79 และ 20% ตามลำดับ

Abstract

Longkong (*Aglaia dookoo* Griff.) is an important economically tropical fruit of southern Thailand. One reason of the reduction of fruit quantity and quality occur by postharvest diseases. Fruit rot is one of the most serious postharvest diseases of longkong. The objectives of this research was to control postharvest fruit rot of longkong by using chitinase produced from shrimp and crab industrial wastes by entomopathogenic fungus, *Metarhizium guizouense* PSUM04. Moreover, factors effecting on chitinase production, optimization condition for enzyme production and enzyme characterization are included. The results indicated that optimal substrate for solid state cultivation was rice bran: crab shell powder: colloidal chitin in ratio 1.5: 1.5: 1. The optimal factors for enzyme production was solid to liquid ratio (S/L ratio) 3:1 and 4:2, pH of liquid media was 7.4 and incubation temperature at 32°C for 11 days. The highest chitinase activity was 2.51 U/ml. For enzyme characteristic, the temperature stability was 20-40 °C and pH stability was 5.0-8.0. The chitinase produced from *M. guizhouense* PSUM04 inhibited mycelial growth of three fruit rot pathogens, *Botrytis* sp., *Fusarium* sp. and *Pestalotiopsis* sp. on culture plate with percentage of inhibition 44.7, 42.9 and 43.6%, respectively. Moreover, spore suspension of *M. guizhouense* PSUM04 in concentration of 1×10^4 spore/ml exhibited the induction of pathogenesis- related protein (PR protein) in longkong fruit. These proteins were 25-27 kDa of chitinase and 43 kDa of β -1,3-glucanase. The PR proteins also inhibited mycelial growth of three pathogenic fungi on culture plate. The observation from scanning electron microscope (SEM) showed abnormal shapes, swisting and cracking in *Botrytis* sp., *Fusarium* sp. and *Pestalotiopsis* sp. and less dense mycelial growth for *Fusarium* sp. and *Pestalotiopsis* sp. In addition, crude enzyme produced from *M. guizhouense* PSUM04 could delayed rotting of longkong fruit from *Botrytis* sp. for 48.8% and *Pestalotiopsis* sp. for 24.3% with significantly different from distilled water control ($p < 0.05$). However, crude enzyme could not delayed rotting of longkong fruit from *Fusarium* sp. compared with control ($p > 0.05$) when incubated at room temperature (30°C) for 7 days. In addition, the effect of crude chitinase, spore of *M. guizhouense* PSUM04 and Carbendazim, chemical fungicide for controlling fruit rot were compared. Longkong fruits were treated with fungal spores and Carbendazim were not found any fruit rot, but the fruits treated with crude chitinase and control (distilled water) presented fruit rot 12 and 40%, respectively at 24 h. After that the enzyme-treated longkong fruits rotting rapidly. However, longkong fruits were treated with fungal spores and Carbendazim showed fruit rot 79 and 20%, respectively at 120 h.

1. บทนำ

ภาคใต้ของประเทศไทยมีสภาพภูมิประเทศ และภูมิอากาศที่เหมาะสมในการปลูกไม้ผลเศรษฐกิจที่สำคัญหลายชนิด หนึ่งในนั้นคือลองกอง (*Lansium domesticum*) จากข้อมูลในปี 2559 ภาคใต้มีเนื้อที่ปลูกลองกองที่ให้ผลผลิตทั้งหมดจำนวน 232,071 ไร่ คิดเป็นผลผลิต 70,948 ตัน (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตรเขต 8 สุราษฎร์ธานี) ผลผลิตส่วนใหญ่ใช้เพื่อบริโภคภายในประเทศและส่งออก ซึ่งต้นทุนการผลิตของเกษตรกรส่วนหนึ่งที่สำคัญคือต้นทุนจากการจัดการหลังการเก็บเกี่ยว เช่น การเก็บรักษา และการขนส่ง เป็นต้น ตัวอย่างความเสียหายของผลไม้หลังการเก็บเกี่ยว คือ โรคหลังการเก็บเกี่ยว (postharvest disease) ที่ส่วนใหญ่เกิดจากการเข้าทำลายของจุลินทรีย์ทางบาดแผล หรือช่องเปิดตามธรรมชาติ โรคหลังการเก็บเกี่ยวลองกอง ที่สำคัญโรคหนึ่งได้แก่ โรคผลเน่า (fruit rot) ซึ่งเกิดจากเชื้อราสาเหตุหลายชนิด เช่น *Aspergillus*, *Botrytis*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Lasiodiplodia Pestalotiopsis*, *Phomopsis*, และ *Penicillium* sp. (Sivapaian *et al.*, 1998; Lim and Sangchote, 2003; Coates *et al.*, 2003) ซึ่งการเข้าทำลายของเชื้อราทำให้ผลลองกองเสื่อมคุณภาพอย่างรวดเร็ว อายุการเก็บรักษาสั้น และราคาตกต่ำ เกษตรกรจึงควรคำนึงถึงการจัดการหลังการเก็บเกี่ยวเพื่อลดปัญหาคุณภาพผลไม้ดังกล่าว โดยนอกเหนือจากการ ควบคุมปัจจัยทางกายภาพต่างๆ เช่น ความชื้น อุณหภูมิ และการถ่ายเทอากาศของสถานที่เก็บรักษาผลไม้แล้ว การควบคุมโรคด้วยชีววิธี เช่น การใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ สารสกัดจากพืช และสารที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ นับว่าเป็นวิธีการหนึ่งซึ่งช่วยลดความเสียหายของผลไม้หลังการเก็บเกี่ยว ช่วยให้เกษตรกรขายผลผลิตได้ราคาดี และมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคและสิ่งแวดล้อม

ไคตินเนส (chitinase) เป็นเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติในการย่อยไคติน (chitin) ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์เชื้อรา (Muzzarelli, 1997) จึงมีการนำเอาเอนไซม์ชนิดนี้มาใช้ควบคุมโรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา ซึ่งถือเป็นวิธีที่ดีและปลอดภัย เนื่องจากเอนไซม์ดังกล่าวไม่มีผลต่อเนื้อเยื่อของพืชเนื่องจากพืชไม่มีไคตินเป็นองค์ประกอบ (Neeraja *et al.*, 2010) ซึ่งจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถผลิตไคตินเนสได้ เช่น *Trichoderma harzianum* (Ulhoa and Peberdy, 1991), *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptomyces* sp. (Wang *et al.*, 1999) *Bacillus cereus* (Chang *et al.*, 2003; Hammami *et al.*, 2010) และ *Metarhizium* sp. (Leger *et al.*, 1996; Rustiguel *et al.*, 2012) โดย *Metarhizium* แม้จะเป็นเชื้อราก่อโรคแมลงที่เข้าทำลายผนังลำตัวของแมลง (Barreto *et al.*, 2004) หรือเรียกว่าราแมลง (entomopathogenic fungus) มีประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงศัตรูพืชหลายชนิด (Boucias and Pendland, 1998) แต่เนื่องจากเชื้อราชนิดนี้สามารถผลิตเอนไซม์ไคตินเนสได้ จึงมีรายงานว่า *Metarhizium* spp. สามารถควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้เช่นกัน (Matsumoto, 2006; de Carolina Sánchez-Pérez *et al.*, 2014) นอกจากนี้ *Metarhizium* บางสายพันธุ์สามารถเจริญรอบรากพืช และสร้างสารกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชได้ (Hu and St.Leger, 2002)

ประเทศไทยมีการส่งออกกุ้งเป็นจำนวนมาก โดยจากรายงานของกลุ่มวิเคราะห์การค้าสินค้าประมงระหว่างประเทศ กองประมงต่างประเทศ กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์พบว่ากุ้งปรุงแต่งเป็นสินค้าประมงที่ส่งออกมากที่สุดในปี 2554 ถึง 91,570 ตัน (ประพันธ์, 2555) จากรายงานดังกล่าวชี้ให้เห็นว่า ปริมาณหัวกุ้งและเปลือกกุ้งที่เป็นของเหลือทิ้งจากขบวนการผลิตก็มีปริมาณมากไปด้วย ก่อให้เกิดปัญหาด้านการกำจัดของเสีย ซึ่งส่วนใหญ่การกำจัดคือการนำไปตากแห้ง และใช้เป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์ แต่อย่างไรก็ตามพบว่าการตกค้างของกากเหลือทิ้งเป็นจำนวนมาก ซึ่งกุ้งและปูเป็นสัตว์ที่มีไคตินเป็นสารโพลีเมอร์อยู่ในองค์ประกอบของเปลือกและกระดอง (Synowiecki and Al-Khateeb, 2003) จึงสามารถใช้เป็นวัตถุดิบ หรือ แหล่งคาร์บอน ในการผลิตเอนไซม์ไคตินเนสและนำไปใช้ให้ก่อประโยชน์ได้ (Chang *et al.*, 2010; Abirami *et al.*, 2012)

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์ไคตินเนสที่ผลิตโดย *Metarhizium guizouense* PSUM04 เพื่อใช้ในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของลองกองหลังการเก็บเกี่ยว โดยจะใช้เปลือกกุ้งและกระดองปูที่เหลือทิ้งจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเลมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอนไซม์ไคตินเนส ตลอดจนศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการ

ทำงานของเอนไซม์ในการควบคุมเชื้อราก่อโรค และคุณสมบัติต่างๆของเอนไซม์ที่ผลิตได้ ซึ่งนอกจากจะนำเอนไซม์ที่ได้ไปใช้เพื่อควบคุมการเกิดโรคเน่าของลองกองหลังการเก็บเกี่ยว เพื่อเป็นวิธีทางเลือกหนึ่งของการควบคุมการเกิดโรค เพิ่มมูลค่าให้กับผลผลิต และมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคและสิ่งแวดล้อมแล้ว ยังจะได้นำเอาของเหลือทิ้งจากการแปรรูปอาหารทะเล (กุ้งและปู) มาใช้ให้เกิดประโยชน์อีกทางหนึ่งด้วย

2. วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อทดสอบประสิทธิภาพการใช้เอนไซม์ไคตินเนสในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของลองกองหลังการเก็บเกี่ยว พร้อมทั้งหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ไคตินเนส
2. เพื่อทดสอบความสามารถของ *Metarhizium guizhouense* ในการผลิตเอนไซม์ไคตินเนสโดยใช้เปลือกกุ้งและกระดองปูที่เหลือใช้เป็นวัตถุดิบ พร้อมทั้งหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไคตินเนส
3. เพื่อศึกษาคุณสมบัติต่างๆของเอนไซม์ไคตินเนสที่ผลิตได้

3. การตรวจเอกสาร

3.1 โรคหลังการเก็บเกี่ยว (postharvest disease)

โรคของผลไม้หลังการเก็บเกี่ยวทำให้เกิดความสูญเสียแก่ผลผลิตทั้งทางปริมาณและคุณภาพ โรคบางชนิดทำให้ผลไม้เสื่อมคุณภาพอย่างรวดเร็ว อายุการเก็บรักษาสั้น ทำให้ผลไม่ขายไม่ได้ หรือขายได้ราคาต่ำ โรคหลังการเก็บเกี่ยว มักพบเกิดจากเชื้อราเป็นส่วนใหญ่ รองลงมาได้แก่แบคทีเรีย ส่วนไวรัสจะพบน้อยมาก ส่วนใหญ่โรคหลังการเก็บเกี่ยวจะเกิดจากการเข้าทำลายของจุลินทรีย์ทางบาดแผล หรือช่องเปิดตามธรรมชาติ ซึ่งเข้าทำลายได้ทั้งในระยะก่อนการเก็บเกี่ยว ระหว่างที่เก็บเกี่ยว และหลังเก็บเกี่ยว เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมก็จะแสดงอาการของโรคออกมา เชื้อราที่ทำให้เกิดโรคหลังการเก็บเกี่ยวที่สำคัญแบ่งเป็น เชื้อราในไฟลัม *Ascomycota* ได้แก่ *Penicillium*, *Aspergillus*, *Geotrichum*, *Botrytis*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Dothiorella*, *Lasiodiplodia*, *Pestalotiopsis* และ *Phomopsis* (Sivapaian et al., 1998; Lim and Sangchote, 2003; Coates et al., 2003) ซึ่งเชื้อรา *Ascomycota* ส่วนใหญ่ที่เข้าทำลายผลไม้จะอยู่ในระยะที่สร้างเซลล์สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (asexual stage, anamorph) เชื้อราในไฟลัม *Oomycota* ที่สำคัญได้แก่ *Phytophthora* และ *Pythium* (Sivapaian et al., 1998) ซึ่งทำให้เกิดโรคหลังการเก็บเกี่ยว เช่น โรคผลเน่าสีน้ำตาล (brown rot) ของส้ม เชื้อราไฟลัม *Zygomycota* ที่ทำให้เกิดโรคหลังการเก็บเกี่ยว ได้แก่ *Rhizopus* และ *Mucor* ที่พบมากได้แก่ *R. stolonifer* ส่วนเชื้อราในไฟลัม *Basidiomycota* มักไม่พบเป็นสาเหตุของโรคหลังการเก็บเกี่ยว แต่ก็มีเชื้อรา เช่น *Sclerotium rolfsii* และ *Rhizoctonia solani* ที่มี sexual stage เป็นพวก *Basidiomycete* ที่ก่อให้เกิดโรครากับพืชผัก เช่น มะเขือเทศ และมันฝรั่ง (El-Katatny and Emam, 2012)

โรคผลเน่า (fruit rot) ของลองกองหลังการเก็บเกี่ยว เป็นโรคที่พบได้อย่างสม่ำเสมอ เนื่องจากผลลองกองมีความฉ่ำน้ำ และมีปริมาณน้ำตาลธรรมชาติสูง (Sapit et al., 2000) โดยโรคผลเน่าของลองกองมักเกิดจากเชื้อรา เช่น *Aspergillus*, *Botrytis*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Lasiodiplodia*, *Penicillium*, *Phomopsis* และ *Pestalotiopsis* (Coates et al. 2003; Kaesorn and Sangchote 2007; Lim and Sangchote 2003; Sivapaian et al. 1998) โดยมีอาการของโรคแตกต่างกัน เช่น โรคผลเน่าที่เกิดจาก *Phomopsis* sp. แผลเป็นสีน้ำตาลดำ มีลักษณะค่อนข้างกลม แผลขยายออกช้าๆ บนแผลจะไม่ปรากฏเส้นใยของเชื้อราให้เห็น ส่วนโรคผลเน่าที่เกิดจากเชื้อรา *L. theobromae* จะมีลักษณะอาการของโรคคือ เป็นจุดสีน้ำตาลเข้มลุกลามจากขั้วผลหรือบริเวณแผล แผลจะเน่าลามไปทั่วผลอย่างรวดเร็ว มีเส้นใยสีเทาดำปกคลุมบนแผล และผลเน่าจะนิ่มและแห้งดำ (กรมวิชาการเกษตร, 2556)

3.2 ไคตินและเอนไซม์ไคตินเอส

ไคตินเป็นสารพวก polysaccharide ที่พบมากตามธรรมชาติรองลงมาจากเซลลูโลส (cellulose) ไคตินเป็นองค์ประกอบหลักของโครงสร้างภายนอก (exoskeleton) ของแมลง กุ้งและปูมีไคตินเป็นองค์ประกอบของเปลือกและกระดอง (Synowiecki and Al-Khateeb, 2003) และไคตินยังเป็นส่วนประกอบสำคัญในผนังเซลล์ของเชื้อรา ที่ทำให้ผนังเซลล์มีความแข็งแรง (Neeraja *et al.*, 2010) ซึ่งที่ผนังเซลล์ของเชื้อราประกอบด้วยไคตินมากกว่าร้อยละ 20 (Ruiz-Harrera, 1991) ไคตินเกิดจากการเชื่อมต่อกันของโมเลกุล N-acetyl-D-glucosamine ด้วยพันธะ covalent ที่ตำแหน่ง β -1-4-linked เป็นโพลิเมอร์ (polymer) สายยาวที่มีความแข็งแรง เอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยไคติน คือเอนไซม์ไคตินเอสที่เป็น multi-complex enzyme ประกอบด้วย endo และ exo-chitinase โดยทั่วไป endo-chitinase (EC.3.2.1.14) จะย่อยไคตินโดยทำลายหรือตัดภายในสายโพลิเมอร์ไคตินแบบสุ่ม ได้เป็น oligomer หรือ chitobiose สายสั้น ส่วน exo-chitinase (EC.3.2.1.52) จะย่อยโพลิเมอร์สายยาวจากปลาย non-reducing และ reducing sugar ได้เป็น chitobiose หรือ N-acetylglucosamine โมเลกุลเดี่ยว (Shaikh and Despande, 1993) ตามปกติพืชชั้นสูงผลิตเอนไซม์ไคตินเอสเพื่อป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อราสาเหตุโรคพืช เมื่อถูกกระตุ้นโดยไคตินที่ทำหน้าที่เป็น elicitor ส่วนจุลินทรีย์จะผลิตเอนไซม์ไคตินเอสเมื่อต้องการใช้ไคตินเป็นแหล่งอาหาร หรือเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนในการเจริญเติบโต (Cohen-Kupiec and Chet, 1998)

จากที่กล่าวข้างต้นว่ากุ้งและปูมีไคตินเป็นองค์ประกอบของเปลือกและกระดอง ดังนั้นจึงสามารถใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอนไซม์ไคตินเอสได้ Suresh และ Chandrasekaran (1998) ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไคตินเอสโดยใช้ของเสียพวกเปลือกกุ้งตากแห้ง (sun-dried prawn waste) มาใช้เป็นวัตถุดิบ เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบของของเสียเหล่านั้นพบว่าประกอบด้วย โปรตีน 39.74% ไคติน 23.08% ไขมัน 5.05% และขี้เถ้า 21.13% หลังจากการหมักแบบแข็ง (solid stage fermentation) โดยเชื้อ *Beauveria bassiana* MTMF S10 ผลิตเอนไซม์ไคตินเอสได้สูงสุด 248 ยูนิต/กรัมของน้ำหนักแห้ง (U/gIDS) นอกจากนี้ Chang และคณะ (2003) นำเปลือกกุ้งและกระดองปูในรูปแบบผงมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตไคตินเอสโดยใช้เชื้อ *B. cereus* YQ 308 ที่แยกและคัดเลือกได้จากดินธรรมชาติ ผลการศึกษาพบว่าสามารถผลิตไคตินเอสบริสุทธิ์ได้ 151 ยูนิต *B. subtilis* W-118 ผลิตไคตินเอสโดยใช้เปลือกกุ้งและกระดองปูตบเป็นผงละเอียดเป็นส่วนผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยได้เอนไซม์ไคตินเอสที่ได้มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ 5.6 ยูนิต/มล. สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *F. oxysporum* ได้อย่างสมบูรณ์ (Wang *et al.*, 2006)

Gomaa (2012) พบว่า เชื้อแบคทีเรียสามารถผลิตไคตินเอสได้สูงสุด 16.02 ยูนิต/มล. เมื่อใช้อาหารเหลวที่มี colloidal chitin ความเข้มข้น 1.5% ผสมกับน้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้น 0.5% เป็นแหล่งคาร์บอน รองลงมา 10.33 ยูนิต/มล. เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่มี colloidal chitin และน้ำตาลกลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอน โดยการหมักแบบแข็งเพื่อผลิตเอนไซม์ไคตินเอส นอกจากนี้จะใช้ไคตินที่ได้เปลือกกุ้งและกระดองปูแล้ว ยังสามารถใช้ไคตินจากแมลงเป็นแหล่งคาร์บอนได้เช่นกัน ซึ่ง Rustiguel และคณะ (2012) พบว่าเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* ผลิตเอนไซม์ไคตินเอสได้ 7.14 ยูนิต/กรัมของสารตั้งต้น เมื่อใช้ตัวอ่อนของหนอนไหมเป็นสารตั้งต้น ทั้งนี้การหมักแบบแข็ง เหมาะสมกับการผลิตเอนไซม์ของเชื้อรา เนื่องจากสามารถเพิ่มปริมาณการผลิตได้ ให้ปริมาณเอนไซม์ที่สม่ำเสมอ มีความเสี่ยงในการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นน้อย และใช้อุปกรณ์ที่มีราคาไม่แพง (Matsumoto, 2006; Oberoi *et al.*, 2010)

3.3 การใช้เอนไซม์ไคตินเอสเพื่อยับยั้งโรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา

ไคตินเอสเป็นเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติในการย่อยไคติน ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์เชื้อรา (Muzzarelli, 1997) จึงมีงานวิจัยหลายฉบับนำเอาเอนไซม์ชนิดนี้มาใช้ควบคุมโรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา Chang และคณะ (2003) พบว่าเอนไซม์ไคตินเอสที่เชื้อ *B. cereus* YQ 308 สร้างขึ้น ปริมาณ 2 มก./มล. สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *F. oxysporum* และ *P. ultimum* ได้ เชื้อ *B. subtilis* W-118 ผลิตไคตินเอสโดยใช้เปลือกกุ้งและกระดองปูตบเป็นผงละเอียดเป็นส่วนผสมในอาหาร

เลี้ยงเชื้อ ซึ่งเอนไซม์ไคตินเนสที่ได้มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ 5.6 ยูนิต/มล. สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *F. oxysporum* ได้อย่างสมบูรณ์ (Wang *et al.*, 2006) สอดคล้องกับ Abirami และคณะ (2012) รายงานว่าไคตินเนสที่ผลิตโดย *B. licheniformis* มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคพืช *F. solani*, *R. solani*, *F. oxysporum* และ *Alternaria* sp. ในปี 2012 Gomaa ทดสอบการงอก (germination) ของเมล็ดถั่วเหลืองที่ถูกเชื้อราเข้าทำลาย พบว่าเมล็ดถั่วเหลืองที่ถูกเชื้อ *R. solanacearum*, *Aspergillus niger* และ *Fusarium* sp. เข้าทำลายมีเปอร์เซ็นต์ความงอกเพียงร้อยละ 6-15 แต่เมื่อใช้เอนไซม์ไคตินเนสที่ผลิตได้จาก *B. thuringiensis* และ *B. licheniformis* คลุกกับเมล็ดถั่วเหลือง พบว่าถั่วเหลืองมีเปอร์เซ็นต์ความงอกเพิ่มขึ้น เป็นร้อยละ 33-80 นอกจากนี้ Wang และคณะ (2013) ยังพบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการกรองเอาเซลล์แบคทีเรีย (cell-free culture filtrate) ของเชื้อ *Serratia marcescens* ที่มีเอนไซม์ไคตินเนสอยู่ ทำให้เส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา *Aspergillus parasiticus* เสียหาย และยังช่วยลดการสร้างสารอะฟลาทอกซิน ซึ่ง Anitha และ Rabeeth (2010) ตรวจสอบปริมาณน้ำตาลกลูโคสและ N-acetylglucosamine ในสารสกัดเส้นใยเชื้อรา พบว่าหลังจากใช้เอนไซม์ไคตินเนสเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum*, *A. alternata*, *R. solani* และ *F. solani* แล้ว ปริมาณน้ำตาลกลูโคสและ N-acetylglucosamine เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อปกติ ทั้งนี้เนื่องจากสายโพลีเมอร์ไคตินที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์เชื้อราถูกย่อยด้วยเอนไซม์ไคตินเนส ซึ่งให้เห็นว่าไคตินเนสมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อดังกล่าว และจากการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไคตินเนส จากการทดลองนำผลสัมพัทธ์สายน้ำผึ้งไปแช่น้ำอุ่น อุณหภูมิ $50 \pm 2^{\circ}\text{C}$ นาน 3 นาที และ $55 \pm 2^{\circ}\text{C}$ นาน 2 นาที จะไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ไคตินเนส แล้วทำให้สัมผัสเกิดโรคเน่าที่เกิดจากเชื้อ *P. digitatum* ลดลง (Inkha and Boonyakiat, 2010) สอดคล้องกับการศึกษาของ Okay และคณะ (2013) รายงานว่า pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไคตินเนสคือ pH 7.0 และ 50°C โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 36.6 และ 37.1 ยูนิต/มล. ตามลำดับ และเอนไซม์ไคตินเนสที่ผลิตได้มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อราที่อุณหภูมิห้องได้นานมากกว่า 10 วัน เอนไซม์ดังกล่าวไม่มีผลต่อเนื้อเยื่อของพืชเนื่องจากพืชไม่มีไคตินเป็นองค์ประกอบ จึงเป็นวิธีที่ดีมากในการใช้ควบคุมโรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา (Neeraja *et al.*, 2010)

4. วิธีการทดลอง

4.1 การเตรียมวัตถุดิบ

เตรียมไคตินจากเปลือกกุ้งและกระดองปู ก่อนนำไปทำเป็น colloidal chitin ซึ่งใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอนไซม์ไคตินเนส โดยเปลือกกุ้งได้รับความอนุเคราะห์จาก บริษัทสงขลาแคนนิ่ง จำกัด (มหาชน) อ.เมือง จ.สงขลา และแพะแกะกุ้งท้องถิ่น อ.ระโนด จ.สงขลา และกระดองปูได้จากแพปูท้องถิ่น อ. เมือง จ.สงขลา นำมาล้างทำความสะอาด คัดแยกส่วนที่เป็นเศษเนื้อทิ้งจนเหลือแต่เปลือก และกระดอง จากนั้นอบให้แห้งโดยใช้ความร้อนจากแสงแดด 2-3 วัน นำไปอบแห้งด้วยเครื่องอบ (oven) อุณหภูมิประมาณ 60°C เพื่อให้ตัวอย่างแห้งสนิท และนำไปบดโดยใช้เครื่องปั่นละเอียดจนได้เป็นผง (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 ไคตินที่ผลิตเป็นการค้า (a) และ ไคตินที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้ (b)

4.2 การเตรียม colloidal chitin

การเตรียม colloidal chitin ดัดแปลงจากวิธีการของ Roberts and Selitrennikoff (1988) โดยใช้ผงไคตินที่ได้จากขั้นตอนที่กล่าวมาข้างต้น 10 กรัม ละลายใน HCl 200 มิลลิลิตร และ acetone 20 มิลลิลิตร ที่แช่อยู่ในอ่างน้ำแข็ง ใช้แท่งแก้วคนจนไคตินละลาย และคนต่อเนื่องนาน 2 ชั่วโมง นำไปบ่มไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 °C ซ้ำมคืน จากนั้นเมื่อครบเวลา กรองผ่านผ้าขาวบาง 2-3 ชั้น ลงไปใน ethanol 50% พร้อมทั้งใช้แท่งแก้วคน ล้างด้วยน้ำสะอาดจนสารละลายมีค่า pH ประมาณ 7.0 และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที colloidal chitin จะมีสีขาวขุ่น เนื้อละเอียดคล้ายครีม เก็บใส่ขวดแล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave เก็บในตู้เย็นเพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นในการเลี้ยงเชื้อ และใช้ในการวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสต่อไป

4.3 การเตรียมเชื้อราสาเหตุโรคผลไม้

เก็บตัวอย่างลองกองจากสวนของเกษตรกรในจังหวัดพัทลุง นครศรีธรรมราช และสงขลา ที่เริ่มแสดงอาการผลไม้ เช่น มีจุดสีน้ำตาลบนผล เนื้อเยื่อยุบตัว ผลเน่า หรือมีเส้นใยเชื้อราปกคลุม จากนั้นแยกเชื้อราจากผลลองกองด้วยวิธีแยกจากเนื้อเยื่อพืชโดยตรง (tissue transplanting method) เชื้อเส้นใยโดยตรง หรือนำมาบ่มไว้ในกล่องชื้น (moist chamber) เพื่อกระตุ้นการเจริญของเส้นใย จากนั้นแยกเชื้อราด้วยวิธี hyphal tip isolation และ/หรือ single spore isolation หลังจากได้เส้นใยที่บริสุทธิ์จึงทดสอบความสามารถในการก่อโรค (pathogenicity test) ของเชื้อราที่แยกได้ ตามหลักการ Koch's postulation และระบุชนิดของเชื้อราด้วยวิธีทางสัณฐานวิทยา และอนุชีวโมเลกุล (molecular) สกัดดีเอ็นเอโดยใช้ DNeasy Plant Mini Kit © QIAGEN (Qiagen, Netherlands) และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีการ polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ PN3 (F) 5' CGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATC 3' และ PN16 (R) 5' TCCCTTTCAACAATTCACG 3' และเปรียบเทียบลำดับเบสในส่วน ITS กับฐานข้อมูลของ GenBank จาก National Centre for Biotechnology Information (NCBI) จากนั้นจึงคัดเลือกเชื้อราสาเหตุโรคผลไม้ของลองกองที่พบมากที่สุด 3 อันดับ เพื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์ไคติเนสต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราในห้องปฏิบัติการต่อไป

4.4 การเตรียมเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ไคติเนส

เชื้อราที่ใช้ในการทดสอบได้แก่ *Metarhizium guizhouense* PSUM02 และ PSUM04 ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไคติเนสได้จากการรายงานของ Thaochan and Chandrapatya, 2016 ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์ควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธีแห่งชาติศูนย์ภาคใต้ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ เลี้ยงเชื้อราบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 7 วัน และคัดเลือกให้เหลือเพียงหนึ่งสายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไคติเนสได้ดี โดยการทดสอบเบื้องต้นบนอาหาร chitin agar (1 ลิตร) ประกอบด้วย moist colloidal chitin (4.5 กรัม) MgSO₄·7H₂O (0.3 กรัม) (NH₄)₂SO₄ (3 กรัม) KH₂PO₄ (2 กรัม) citric acid monohydrate (1 กรัม) bromogresol purple (0.15 กรัม) tween 80 (200 ไมโครลิตร) และผงวุ้น 20 บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 5 วัน (Yumaliza *et al.*, 2014) สังเกตสีของอาหารที่เปลี่ยนไปจากสีเหลือง เป็นสีม่วง หรือสังเกตวงใส (clear zone) ที่เกิดขึ้นรอบโคโลนี

4.5 การเลี้ยงเชื้อราด้วยอาหารแบบแข็ง (solid state cultivation)

เจาะชิ้นวุ้นของเชื้อรา *M. guizhouense* บนอาหาร PDA อายุ 7 วัน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร วางลงบนอาหารแบบแข็ง (solid state medium) ที่มีส่วนผสมของ รำข้าวสาลี กระจดองปูดละเอียด และ colloidal chitin ในอัตราส่วน 1.5: 1.5: 1 ผสมกับ mineral salt solution (1 ลิตร) ประกอบด้วย (NH₄)₂SO₄ (0.2 กรัม) MgSO₄·7H₂O (0.2 กรัม) FeSO₄·7H₂O (0.01 กรัม) CaCl₂ (0.05 กรัม) K₂HPO₄ (7.5 กรัม) KH₂PO₄ (2.3 กรัม) และ yeast extract (5 กรัม) เพื่อเป็นแหล่งอาหารเสริมและให้ความชื้น ในอัตราส่วน 1:3 บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 วัน และสกัดสารละลายเอนไซม์โดยใช้ potassium phosphate buffer (KPB) pH 7.0 ความเข้มข้น 50 mM เติมน้ำลงในขวดเลี้ยงเชื้อ นำไปเขย่าที่ 140 รอบ/นาที

เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที เก็บส่วนใสและกรองแยกเซลล์แบคทีเรียด้วย syringe filter ขนาด 45 ไมโครเมตร เก็บสารละลายส่วนใสเป็นสารละลายเอนไซม์ไคตินเนสสกัดหยาบ (crude enzyme) เพื่อวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ต่อไป (Chaihan *et al.*, 2012)

4.6 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไคตินเนสโดยเชื้อรา *Metarhizium guizouense* PSUM04

หาสภาวะที่เหมาะสม (optimal condition) ในการผลิตเอนไซม์ไคตินเนส ด้วยวิธีการเลี้ยงบนอาหารแบบแข็ง โดยปัจจัยและสภาวะที่ทดสอบแบบเดี่ยว (single factor optimization) ได้แก่ อัตราส่วนระหว่างของแข็ง และของเหลว (solid to liquid ratio) 2:1, 3:1, 3:2, 4:1, 4:2 และ 4:3 ค่า pH ของ mineral salt solution ปรับค่า pH ด้วย 1 N NaOH และ 1 N HCl ให้ได้ pH 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 และ 8.0 อุณหภูมิในการบ่ม (20, 25, 30, 35 และ 40 °C) และระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ (5, 10, 15 และ 20 วัน)

การวิเคราะห์แบบหลายปัจจัย (multiple factor optimization) เพื่อหาผลการผลิตเอนไซม์เมื่อมีความสัมพันธ์ของปัจจัยหลายชนิดเข้ามาร่วมกัน ด้วยวิธีการออกแบบการทดลองแบบ central composite design; CCD (Akay, 2007) โดยปัจจัยที่ศึกษาครั้งนี้ ได้แก่ ค่า pH อุณหภูมิ ระยะเวลาในการบ่มเชื้อ และความเข้มข้นของ colloidal chitin ดังตารางที่ 1 วัดค่าการทำงานของเอนไซม์ จากนั้นวิเคราะห์ทางสถิติแบบรีเกรสชันเชิงเส้นหลายตัวแปร (multiple linear regression) ซึ่งมีทั้งหมด 25 การทดลอง การทดลองละ 3 ซ้ำ

ตารางที่ 1 การทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) ระดับในการทดลอง และปริมาณปัจจัยที่ใช้ ของสภาวะในการผลิตเอนไซม์ไคตินเนสโดย *Metarhizium guizouense* PSUM04

Coded values	-2	-1	0	1	2
Factors	Actual values				
A: Concentration of colloidal chitin (%)	0.5	1	1.5	2	2.5
B: Incubation time (hr)	72	144	216	288	360
C: pH	5	6	7	8	9
D: Temperature (°C)	20	25	30	35	40

4.7 การศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของเอนไซม์ไคตินเนส

คุณสมบัติของเอนไซม์ไคตินเนสที่ทดสอบ ได้แก่ ความเสถียรของค่ากิจกรรมเอนไซม์ต่ออุณหภูมิ (temperature stability) ความเสถียรต่อค่า pH (pH stability) และความเร็วในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ จากนั้นนำมาวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เปลี่ยนแปลงจากค่ากิจกรรมเอนไซม์เริ่มต้น (initial activity)

วิธีการวัดความเสถียรของเอนไซม์ไคตินเนสโดยนำสารละลายเอนไซม์ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน microcentrifuge tube และบ่มในเครื่องให้ความร้อน (heating box) ที่อุณหภูมิ 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 และ 80°C นาน 60 นาที

ความเสถียรของเอนไซม์ไคตินเนสต่อผลของ pH โดยนำเอนไซม์ที่ไปบ่มกับสารละลายบัฟเฟอร์เข้มข้น 100 mM ในอัตราส่วน 1:1 ได้แก่ sodium tartrate buffer (pH 2.0 และ 3.0), sodium acetate buffer (pH 3.0, 4.0, 5.0 และ 6.0), potassium phosphate buffer (pH 6.0, 7.0 และ 8.0) และ Tris-SO₄ buffer (pH 8.0, 9.0 และ 10.0) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 60 นาที

วัดความเร็วในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ โดยนำสารละลายเอนไซม์บ่มกับ colloidal chitin ความเข้มข้น 1% ใน 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) บ่มไว้ในอ่างน้ำปรับอุณหภูมิ 37 °C นาน 15, 30, 45, 60, 75 และ 90 นาที จากนั้นนำมาวัดปริมาณน้ำตาลที่ได้จากการเปลี่ยน colloidal chitin เป็น n-acetyl-d-glucosamine โดย DNS method และเทียบกับกราฟมาตรฐาน

4.8 การวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเนส

ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ (enzyme activity) วัดด้วยวิธีการหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้ด้วยวิธี dinitrosalicylic acid; DNS method (Miller, 1959) โดยใช้ 1% colloidal chitin ใน 50 mM KPB pH 7.0 เป็นสารตั้งต้น นำไปบ่มกับตัวอย่างสารละลายเอนไซม์ ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย DNS (3,5- DNS 10 กรัม ใน 2N NaOH 200 มิลลิลิตร และ sodium potassium tartrate 300 กรัม ต่อน้ำ 1 ลิตร) แล้วต้มน้ำเดือดนาน 15 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 575 นาโนเมตร และเทียบกับกราฟมาตรฐานของ N-acetyl-d-glucosamine เพื่อใช้ในการคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์ โดยหนึ่งยูนิต (U) ของเอนไซม์จะหมายถึงเอนไซม์ที่ทำให้เกิดน้ำตาลรีดิวซ์ 1 ไมโครโมล (μmol) ต่อหนึ่งนาที

4.9 การตอบสนองของผลล่องกองต่อเอนไซม์ไคตินเนสสกัดหยาบและสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *M. guizhouense*

ตรวจสอบการตอบสนองของผลล่องกองต่อสารละลายเอนไซม์ไคตินเนสที่ผลิตได้จากเชื้อรา *M. guizhouense* PSUM04 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง และสปอร์แขวนลอยของเชื้อราดังกล่าว โดยวัดปริมาณ pathogenesis-related protein (PR protein) ที่ล่องกองสร้างขึ้น ภายใน 24 ชั่วโมง หลังจากจุ่มผลล่องกองในสารละลายเอนไซม์ และสปอร์แขวนลอยความเข้มข้น 10^4 สปอร์/มล ที่ผสม 0.05% tween 80 เป็นเวลา 5 วินาที จากนั้นล้างผลล่องกองด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ และฟุ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง และนำเปลือกล่องกองไปสกัดโปรตีนหลังจากบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 24 และ 48 ชั่วโมง โดยวิธีการสกัดโปรตีนดัดแปลงจากวิธีการของ Zheng และคณะ (2007) บดเปลือกล่องกองด้วยเครื่องปั่นจากนั้นเติมสารละลายบัฟเฟอร์ 12 มิลลิลิตร (0.5% SDS, 20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA และ น้ำกลั่น 464 มิลลิลิตร) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 90-94 °C เป็นเวลา 8-10 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสผสมด้วย trichloroacetic acid (TCA), acetone, dithiothreitol (DTT) และ mercaptoethanol จากนั้นบ่มที่ -20 °C นาน 2 ชั่วโมง แล้วปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบ/นาที ล้างตะกอนด้วย acetone ฟุ้งให้แห้ง แล้วละลายด้วย SDS-PAGE sample buffer ก่อนนำไปแยกขนาดของโปรตีนด้วยวิธี Sodium dodecyl sulfate (SDS) Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) เปรียบเทียบกับชุด

4.10 Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)

เปรียบเทียบขนาดของโปรตีนที่สกัดได้จากเปลือกของล่องกองด้วยวิธี SDS-PAGE เปรียบเทียบระหว่างผลล่องกองปกติ ล่องกองที่ถูกกระตุ้นด้วยเอนไซม์ไคตินเนส และล่องกองที่ถูกกระตุ้นด้วยสปอร์แขวนลอยของ *M. guizhouense* PSUM04 ความเข้มข้น 10^4 spore/ml โดยใช้เจลขนาด 10×10 เซนติเมตร แบ่งเป็นสองส่วน โดย separating gel ความเข้มข้น 12% และ stacking gel ความเข้มข้น 4% ตามวิธีการของ Laemmli (1970) โดยใช้โปรตีนมาตรฐาน (protein marker) ขนาด 10 - 250 kDa (BioLabs Inc.)

4.11 ทดสอบการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราโรคมผลเน่าบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ทดสอบความสามารถของสารละลายเอนไซม์ไคตินเนสสกัดหยาบในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราสาเหตุโรคมผลเน่าด้วยวิธี gel diffusion โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะอาหารแข็ง PDA ให้เป็นหลุม จำนวน 3 หลุม ซึ่งทุกหลุมมีระยะห่างจากจุดศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร จากนั้นวางเชื้อราก่อโรคมผลเน่าที่อายุ 3 วัน ไว้ตรงกลางจานเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 4 วัน แล้ววัดขนาดวงใส (zone of inhibition) และวัดขนาดของเส้นใยเชื้อราที่เจริญ เพื่อคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (percentage inhibition of growth) เทียบกับชุดควบคุม (ไม่มีสารละลายเอนไซม์) ดังสมการ

$$\text{Percentage inhibition} = \frac{C-T}{C} \times 100$$

เมื่อ C หมายถึงรัศมีของเส้นใยเชื้อราของชุดควบคุม โดยวัดจากจุดศูนย์กลางไปจนถึงขอบของเส้นใย และ T คือรัศมีของเส้นใยจากจุดศูนย์กลางไปยังวงใส

4.12 ตรวจสอบลักษณะเส้นใยด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (scanning electron microscope; SEM)

ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าที่เปลี่ยนแปลงไป หลังจากการทดสอบด้วยเอนไซม์ไคตินเนส ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบอิเล็กตรอนชนิดส่องกราด โดยเจาะชั้นวุ้นที่มีเส้นใยเชื้อราก่อโรคผลเน่าในบริเวณใกล้ zone of inhibition จากการทดสอบข้างต้นแช่ลงใน 3% glutaraldehyde ที่ 4 °C นาน 24 ชั่วโมง แล้วแยกน้ำออกจากเส้นใยด้วยเอทานอล 30, 50, 60, 70, 80, 90 และ 100% ตามลำดับ จากนั้นนำตัวอย่างไปทำให้แห้งด้วยวิธี critical point drying (CPD) แล้วหุ้มด้วยทอง จากนั้นส่องด้วยกล้อง SEM (JSM-5800 LV, JEOL, USA) ณ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

4.13 การหาปัจจัยที่เหมาะสมในใช้เอนไซม์ไคตินเนสเพื่อควบคุมการเจริญของเชื้อราก่อโรคบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการใช้เอนไซม์ไคตินเนสในการควบคุมการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคลองกอง บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ แบบหลายปัจจัยพร้อมกัน โดยวางแผนการทดลองแบบ CCD ปัจจัยที่ศึกษาได้แก่ อุณหภูมิที่บ่มเอนไซม์ก่อนนำไปใช้ ค่าความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ และระยะเวลาในการบ่มเอนไซม์ (ตารางที่ 2) และวัด percentage of inhibition จากนั้นวิเคราะห์ทางสถิติแบบรีเกรสชันเชิงเส้นหลายตัวแปร (multiple linear regression) ซึ่งมีทั้งหมด 15 การทดลอง/เชื้อ และการทดลองละ 3 ซ้ำ

ตารางที่ 2 การทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) ระดับในการทดลอง และปริมาณปัจจัยที่ใช้ ของปัจจัยในการใช้เอนไซม์ไคตินเนสเพื่อควบคุมการเจริญของเชื้อราก่อโรคบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

Coded values	-a	-1	0	+1	+a
Factors	Actual values				
a: Incubation Temperature (°C)	0.5	1	1.5	2	2.5
b: Concentration of crude enzyme (U/ml)	72	144	216	288	360
c: Incubation Time (min)	5	6	7	8	9

4.14 ทดสอบการยับยั้งการเกิดโรคผลเน่าบนผลลองกอง

ผลลองกองปกติที่ได้จากสวนของเกษตรกรในจังหวัดพัทลุง นครศรีธรรมราช และสงขลา ล้างทำความสะอาดผิวลองกอง และฆ่าเชื้อบนเปลือกด้วย 70% ethanol, 1% NaOCl₂ และล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง แล้วซับให้แห้ง แล้วแบ่งเป็น 3 ชุด การทดลอง ได้แก่ (1) ฟันสารละลายเอนไซม์ก่อนปลูกเชื้อราก่อโรค (pre-inoculation) (2) ปลูกเชื้อราก่อโรคก่อนจากนั้นจึงฟันสารละลายเอนไซม์ (post-inoculation) และ (3) ชุดควบคุมซึ่งปลูกเชื้อราก่อโรคเพียงอย่างเดียว โดยฟันสารละลายเอนไซม์ที่ผสม tween 20 (0.05 %) ฟังให้แห้ง ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง ก่อนวางชั้นวุ้นเชื้อราก่อโรคขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร บนผลลองกอง จากนั้นบ่มไว้ในกล่องขึ้น วางไว้ในที่มีอุณหภูมิ 30 °C บันทึกผลการเกิดโรค วัดขนาดของแผลเทียบกับชุดควบคุม ทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 5 วัน

เปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งการเกิดโรคผลเน่าของลองกองในห้องปฏิบัติการ โดยใช้สารละลายเอนไซม์ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ กับการใช้สปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *M. guizhouense* PSUM04 ที่ความเข้มข้น 10^4 - 10^6 สปอร์/มิลลิลิตร และเปรียบเทียบการใช้สารละลายเอนไซม์ไคตินเนสกับการใช้สารเคมี ได้แก่ คาร์เบนดาซิม ตามวิธีการที่กรมวิชาการเกษตรแนะนำ คือ จุ่มผลลงในสารเคมีแล้วเป่าให้แห้งก่อนเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 11 องศาเซลเซียส (กรมวิชาการเกษตร, 2556) เทียบกับการใช้

สารละลายเอนไซม์ที่ทดสอบด้วยวิธีการเดียวกัน แล้วตรวจสอบคุณภาพต่างๆของผลลองกอง เช่น การเกิดโรค อายุการเก็บรักษา และลักษณะทางกายภาพ เช่น สีของผลที่เปลี่ยนแปลงไป

4.15 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ผลที่ได้จากการทดลองทั้งสามซ้ำจะนำมาหาเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation; SD) และวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบจำแนกทางเดียว (one-way analysis of variance; ANOVA) ด้วยวิธีของ Duncan (Duncan's multiple range test) ที่ความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS เวอร์ชัน 11.5

5. ผลการทดลองและวิจารณ์

5.1 เชื้อราสาเหตุโรคเน่าของลองกองหลังการเก็บเกี่ยว

เก็บตัวอย่างลองกองที่พบอาการผลเน่าจากสวนของเกษตรกรในจังหวัดพัทลุง นครศรีธรรมราชและ สงขลา จำนวนพื้นที่เก็บตัวอย่างลองกองทั้งสิ้น 46 จุด แบ่งเป็น 23 พื้นที่ จำแนกเป็น จังหวัดนครศรีธรรมราช จำนวน 12 พื้นที่ จังหวัดพัทลุง 12 พื้นที่ และจังหวัดสงขลา 6 พื้นที่ แยกเชื้อจากผลลองกองด้วยวิธี tissue transplating และ hyphal tip isolation ได้เชื้อราบริสุทธิ์ทั้งหมด 78 isolates และแบ่งเชื้อราได้ทั้งหมด 18 หมายเลข อย่างคร่าวๆ ตามลักษณะโคโลนิบนอาหารเลี้ยงเชื้อและสัญญาวิทยาได้กลุ่มจุลทรรศน์ หลังจากนั้นนำไปทดสอบความสามารถในการก่อโรค และตรวจสอบว่าเป็นเชื้อสาเหตุของโรคผลเน่า ตามหลักการ Koch's postulate หลังจากปลูกเชื้อราก่อโรคที่ผลลองกองโดยการตัดชิ้นวันเชื้อราทดสอบ และบ่มไว้ในกล่องขึ้นเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าลองกองแสดงอาการเนื้อเยื่อตาย (necrosis) ล้อมรอบชิ้นวันเชื้อรา ผลสีน้ำตาลขยายลูกกลม จนผลเน่า และมีเส้นใยเจริญปกคลุมผลลองกอง หลังการปลูกเชื้อ 48 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับเชื้อราที่ไม่ใช่สาเหตุโรค และชุดควบคุม ที่ผลลองกองไม่เกิดอาการผิดปกติ ซึ่งเชื้อราที่ทำให้เกิดอาการเน่าบนผลลองกองมีจำนวน 11 หมายเลข ได้แก่ หมายเลข 1, 6, 7, 8, 9, 10, 14, 15, 16,17 และ 18 และแบ่งการกระจายตามแต่ละพื้นที่เก็บตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 3

เมื่อวิเคราะห์ความหลากหลาย (density) ของเชื้อราที่ทำให้เกิดอาการผลเน่าของลองกองในแต่ละพื้นที่ของการเก็บตัวอย่าง โดยใช้ดัชนีการกระจายตัวแชนนอนไวเนอร์ (Shannon Wiener index, H') พร้อมทั้งวิเคราะห์ค่าความสม่ำเสมอของข้อมูล (evenness, J') พบว่า ตัวอย่างลองกองที่เก็บจากอำเภองหรา จังหวัดพัทลุง อำเภอนบพิตำ จ.นครศรีธรรมราช และอำเภอตะโหมด จังหวัดพัทลุง มีความหลากหลายเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของลองกองสูง โดยมีดัชนีการกระจายตัวแชนนอนไวเนอร์ เท่ากับ 1.49, 1.33 และ 1.29 ตามลำดับ และพื้นที่เก็บตัวอย่างส่วนใหญ่จะมีความสม่ำเสมอของข้อมูลอยู่สูง (>0.88 - 1.00) (ตารางที่ 4)

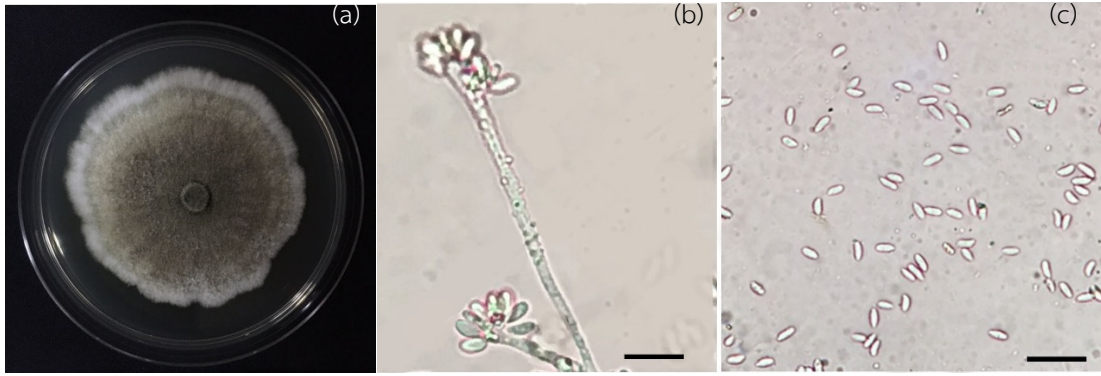
ตารางที่ 3 สถานที่เก็บตัวอย่างผลล่องกอง และเชื้อราก่อโรคผลเน่าของล่องกองที่พบในแต่ละพื้นที่

ลำดับที่	สถานที่	หมายเลขเชื้อราโรคผลเน่าของล่องกอง (ไอโซเลท)											
		1	6	7	8	9	10	14	15	16	17	18	
1	ต.ทุ่งนารี อ.ป่าบอน จ.พัทลุง						1					2	
2	ต.คลองใหญ่ อ.ตะโหมด จ.พัทลุง			1			1	1	1			1	
3	ต.กงหรา อ.กงหรา จ.พัทลุง	1					3				1	2	1
4	ต.ลำสินธุ์ อ.ศรีนครินทร์ จ.พัทลุง	1					1	1					
5	ต.ตะพาน อ.ศรีบรรพต จ.พัทลุง									2			
6	ต.ป่าพะยอม อ.ป่าพะยอม จ.พัทลุง			1						1		1	
7	ต.เกาะเต่า อ.ป่าตะยอม จ.พัทลุง											1	
8	ต.ป่าพูน อ.เมือง จ.นครศรีธรรมราช						1	2					1
9	ต.นาทราย อ.เมือง จ.นครศรีธรรมราช			1									
10	ต.กำแพงเขา อ.เมือง จ.นครศรีธรรมราช						1	1					
11	ต.ตาดี อ.ลานสกา จ.นครศรีธรรมราช	2									1		
12	ต.เสาเพรา อ.สิชล จ.นครศรีธรรมราช						1			1			
13	ต.เทพราช อ.สิชล จ.นครศรีธรรมราช			2	2	1							
14	ต.กะห่อ อ.พบพิศำ จ.นครศรีธรรมราช										1	1	
15	ต.นาแหร่ง อ.นบพิศำ จ.นครศรีธรรมราช						1	1		1		2	
16	ต.ละอาย อ.ฉวาง จ.นครศรีธรรมราช											1	
17	ต.จันดี อ.ฉวาง จ.นครศรีธรรมราช									2			
18	ต.เขาพระ อ.รัตภูมิ จ.สงขลา	1											
19	ต.วังใหญ่ อ.เทพา จ.สงขลา							2					
20	ต.เทพา อ.เทพา จ.สงขลา		1										
21	ต. คอหงส์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา				1					2			
22	ต. คลองหอยโข่ง อ.คลองหอยโข่ง จ.สงขลา							1			1	1	
23	ต. ขุนตัดหวาย อ.จะนะ จ.สงขลา		1									1	
	รวม	5	2	5	3	5	13	2	11	3	13	2	

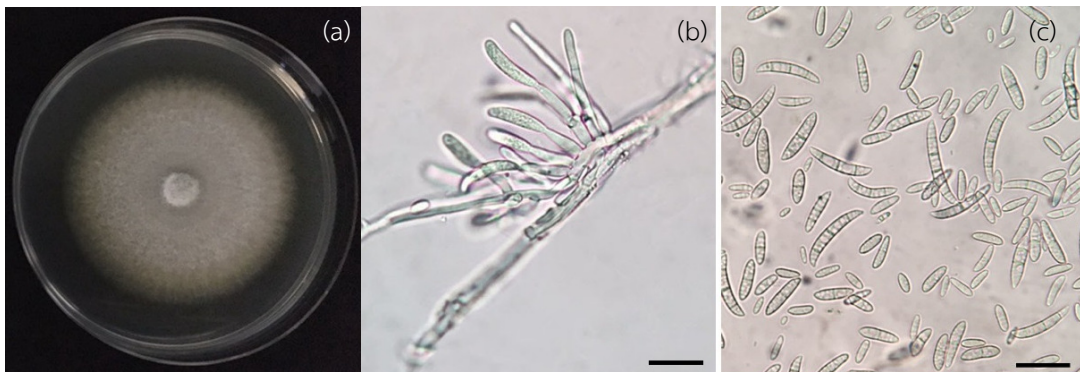
ตารางที่ 4 ดัชนีความหลากหลายของชนิดเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของลองกองในแต่ละพื้นที่เก็บตัวอย่าง

Location	Diversity parameters	
	Shannon diversity index (H')	Evenness (J')
ต.ทุ่งนารี อ.ป่าบอน จ.พัทลุง	0.64	0.92
ต.คลองใหญ่ อ.ตะโหมด จ.พัทลุง	1.29	1.00
ต.งหรา อ.งหรา จ.พัทลุง	1.49	0.88
ต.ลำสินธุ์ อ.ศรีนครินทร์ จ.พัทลุง	1.10	1.00
ต.ตะพาน อ.ศรีบรรพต จ.พัทลุง	0.00	-
ต.ป่าพะยอม อ.ป่าพะยอม จ.พัทลุง	1.10	1.00
ต.เกาะเต่า อ.ป่าตะยอม จ.พัทลุง	0.00	-
ต.ป่าพูน อ.เมือง จ.นครศรีธรรมราช	1.04	0.94
ต.นาทราย อ.เมือง จ.นครศรีธรรมราช	0.00	-
ต.กำแพงเซา อ.เมือง จ.นครศรีธรรมราช	0.69	1.00
ต.ตาดิ อ.ลานสกา จ.นครศรีธรรมราช	0.64	0.92
ต.เสาเพรา อ.สิชล จ.นครศรีธรรมราช	0.69	1.00
ต.เทพราช อ.สิชล จ.นครศรีธรรมราช	1.05	0.93
ต.กะหรอ อ.พบพิศำ จ.นครศรีธรรมราช	0.69	1.00
ต.นาแหร่ง อ.นบพิศำ จ.นครศรีธรรมราช	1.33	0.94
ต.ละอาย อ.ฉวาง จ.นครศรีธรรมราช	0.00	-
ต.จันดี อ.ฉวาง จ.นครศรีธรรมราช	0.00	-
ต.เขาพระ อ.รัตภูมิ จ.สงขลา	0.00	-
ต.วังใหญ่ อ.เทพา จ.สงขลา	0.00	-
ต.เทพา อ.เทพา จ.สงขลา	0.00	-
ต. คอหงส์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา	0.64	0.92
ต. คลองหอยโข่ง อ.คลองหอยโข่ง จ.สงขลา	1.10	1.00
ต. ชุนตัดหวาย อ.จะนะ จ.สงขลา	0.69	1.00

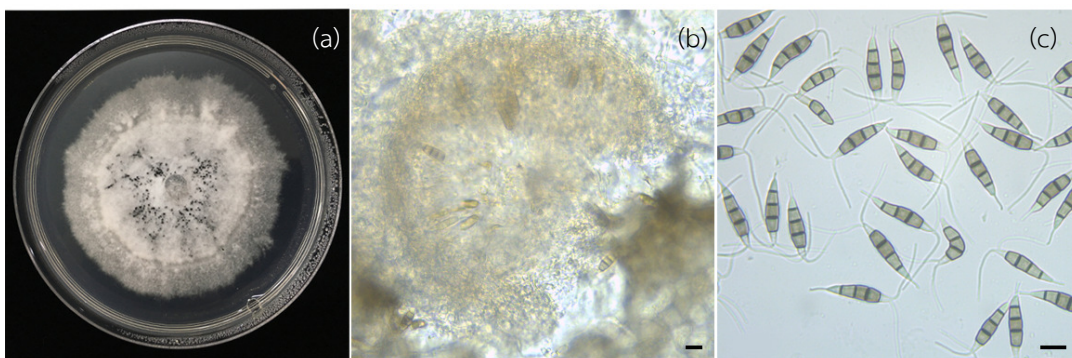
คัดเลือกเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของลองกองที่พบมากที่สุด 3 อันดับ (หมายเลข 10, 17 และ 15) จากการเก็บตัวอย่างในครั้งนี้ เพื่อนำไปจัดจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา เทียบกับ Illustrated Genera of Imperfect Fungi (Barnett and Hunter, 2006) ร่วมกับการจัดจำแนกชนิดด้วยวิธีทางอนุชีววิทยา โดยสกัดดีเอ็นเอด้วย cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) method และหลังจากได้ดีเอ็นเอตัวอย่างแล้ว จึงเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยการใช้ไพรเมอร์ PN3 (F) 5' CGTTGGTGAACACGCGGAGGGATC 3' และ PN16 (R) 5' TCCCTTTCAACAATTTACAG 3' วิเคราะห์ลำดับเบส และเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ GenBank พบว่าเชื้อราทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ *Botrytis* sp., *Fusarium* sp. และ *Pestalotiopsis* sp. (ภาพที่ 2 - 4) ซึ่งนอกจากเป็นสาเหตุของโรคผลเน่าของลองกอง ราทั้งสามชนิดมีรายงานว่าก่อให้เกิดโรคผลเน่าของผลไม้เขตร้อนหลายชนิด เช่น เงาะ มังคุด (Keith, 2008) ส้ม (Timmer et al., 2003) ทุเรียน (Lim and Sangchote, 2003) และชมพู (Maharachchikumbura et al., 2013) เป็นต้น



ภาพที่ 2 รา *Botrytis* sp.; (a) โคโลนีอายุ 3 วัน บนอาหาร PDA (b) conidia บนก้าน conidiophore และ (c) conidia (bar = 10 μ m)



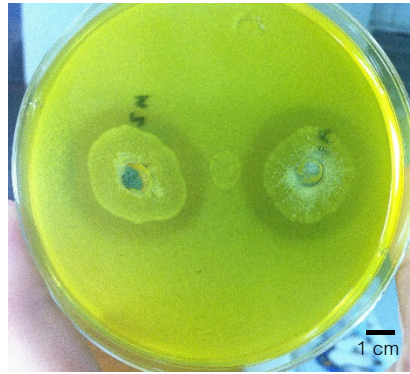
ภาพที่ 3 รา *Fusarium* sp.; (a) โคโลนีอายุ 3 วัน บนอาหาร PDA (b) macroconidia บนก้าน conidiophore และ (c) microconidia และ macroconidia (bar = 40 μ m)



ภาพที่ 4 รา *Pestalotiopsis* sp.; (a) โคโลนีอายุ 7 วัน บนอาหาร PDA (b) acervular conidiomata with young conidia และ (c) mature conidia (bar = 10 μ m)

5.2 การทดสอบการผลิตเอนไซม์ไคตินเอสเบื้องต้น ของเชื้อ *Metarhizium guizhouense* PSUM04 บนอาหารแข็ง

เชื้อรา *M. guizhouense* PSUM04 มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไคตินเอสได้ โดยเกิดเป็นวงใสรอบๆ โคลนบนอาหารทดสอบ โดยขนาดของวงใสที่เกิดขึ้น มีรัศมีของวงใส 1.0-1.5 เซนติเมตร (ภาพที่ 5) ซึ่งส่วนที่ไม่ติดสีข้อม (unstained circular zone) เกิดขึ้นเนื่องจากสีข้อมจะจับเฉพาะบริเวณที่ไคตินไม่ถูกย่อย (undigested chitin) ดังนั้นรอบโคโลนีของเชื้อที่สร้างเอนไซม์ย่อยไคติน จึงเกิดเป็นวงใสขึ้น และสามารถใช้เป็นตัวชี้วัดการสร้างเอนไซม์ไคตินเอสได้ (Zou et al., 2002)

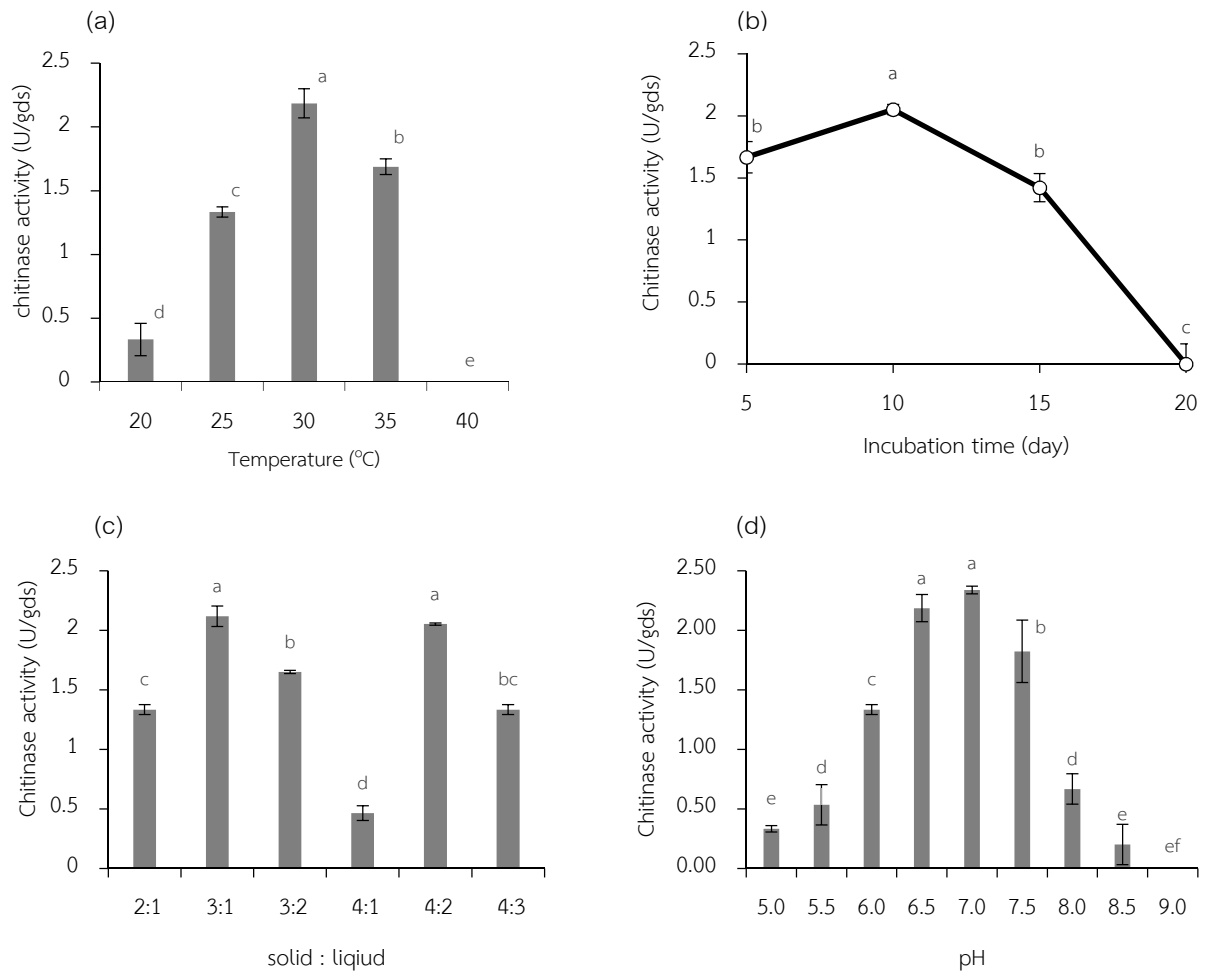


ภาพที่ 5 วงใส (clear zone) บนอาหาร colloidal chitin agar โดยเชื้อรา *Metarhizium guizhouense* PSUM04

5.3 สภาพที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไคตินเอส แบบวิเคราะห์ปัจจัยเดียว (single factors optimization)

การหาสภาพที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไคตินเอสโดย *M. guizhouense* PSUM04 ได้ทำภายใต้การเลี้ยงเชื้อราในสภาพเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารแบบแข็ง (solid state cultivation) ซึ่งการเลี้ยงเชื้อราในสภาวะเช่นนี้จะกระตุ้นการเจริญของเส้นใย เส้นใยที่ไคตินเอสของเส้นใย และการผลิตเอนไซม์จากเชื้อราได้ อีกทั้งเป็นวิธีที่ใช้พื้นที่น้อย ต้นทุนต่ำ และสามารถใช้วัสดุเหลือใช้ต่างๆ มาเป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอนไซม์ได้ (Sathish et al., 2008) ทั้งนี้มีรายงานการเลี้ยงเชื้อราด้วยวิธีการนี้เพื่อกระตุ้นการสร้างเอนไซม์หลายชนิด เช่น cellulase, laccase, pectinase, xylanase (Graminha et al., 2008; Chairin et al., 2014) รวมถึง chitinase (Sudhakar and Nagarajan, 2010; Chaiham et al., 2013)

ในการทดลองครั้งนี้ หลังจากเลี้ยงเชื้อรา *M. guizhouense* PSUM04 ด้วยอาหารแบบแข็งในขวดรูปชมพู่ พบว่าเชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์ไคตินเอสได้สูงสุดเมื่อบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 °C และเชื้อไม่สามารถผลิตไคตินเอสได้ที่อุณหภูมิมากกว่าหรือเท่ากับ 40 °C (ภาพที่ 6a) เอนไซม์มีค่ากิจกรรมสูงสุดในวันที่ 10 โดยวัดได้ 2.05 U/ml (ภาพที่ 6b) อัตราส่วนระหว่าง colloidal chitin และ mineral salt solution (solid : liquid) ที่เหมาะสมคือ 3:1 และ 4:2 โดยวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเอสได้ 2.12 และ 2.05 U/ml ตามลำดับ และไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ความเข้มข้น 95% (ภาพที่ 6c) และผลที่ได้จากการทดลอง เชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์ไคตินเอสได้สูงสุด เมื่อ pH ของ mineral salt solution มีค่าเป็นกลาง (pH 6.5-7.0) มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเอสอยู่ระหว่าง 2.18 – 2.43 U/ml (ภาพที่ 6d)



ภาพที่ 6 ปัจจัยที่มีผลต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์ไคตินเนส: (a) อุณหภูมิ (b) ระยะเวลาในการบ่ม (c) อัตราส่วนระหว่างของแข็งและของเหลว และ (d) pH

* Bar represent standard deviation of three replications and the same letter are not significantly different ($p > 0.05$) according to Duncan's multiple range test.

5.4 สภาวะที่เหมาะสมในผลิตเอนไซม์ไคตินเนสแบบวิเคราะห์หลายปัจจัย (multiple factors optimization)

ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไคตินเนสแบบหลายปัจจัยพร้อมกัน โดยวางแผนการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) ปัจจัยที่ศึกษาได้แก่ ค่า pH อุณหภูมิ ระยะเวลาในการบ่มเชื้อ และความเข้มข้นของ colloidal chitin ผลการทดลองพบว่าเมื่อวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance, ANOVA) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป สมการตัวแทน (model) มีค่า p น้อยกว่า 0.05 ซึ่งแสดงว่ามีสัมประสิทธิ์ของตัวแปรอย่างน้อย 1 ตัวแปรที่มีค่าแตกต่างจาก 0 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ตารางที่ 5) และได้สมการตัวแทน ดังนี้

$$\text{Chitinase activity (U/gds)} = -23.45 + 1.00d - 0.00072b^2 - 0.02d^2$$

โดยที่ a = ความเข้มข้นของ colloidal chitin b = ระยะเวลาในการบ่มเชื้อ c = pH และ d = อุณหภูมิ ซึ่งค่าที่ไม่มีนัยสำคัญจะไม่แสดงในสมการ

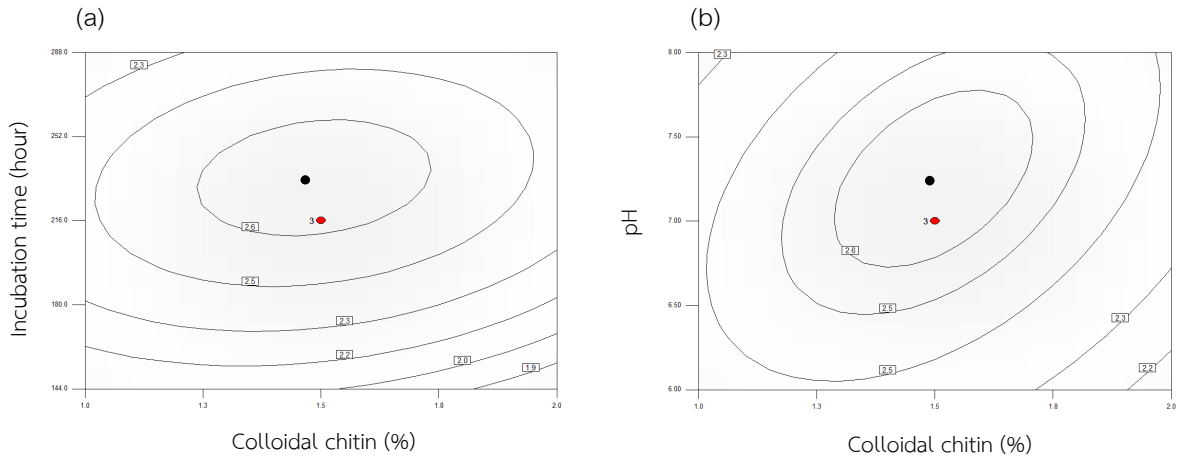
ตารางที่ 5 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของตัวแปร/ปัจจัย แบบ response surface quadratic model ที่มีผลต่อการผลิต เอนไซม์โคติเนส

Source	Mean Square	F value	Prob > F
Model	1.464	4.214	0.0085*
<i>a</i>	0.029	0.085	0.7761
<i>b</i>	0.897	2.582	0.1341
<i>c</i>	0.084	0.242	0.6318
<i>d</i>	12.995	37.399	< 0.0001*
<i>a</i> ²	0.694	1.999	0.1829
<i>b</i> ²	2.987	8.596	0.0126*
<i>c</i> ²	0.284	0.818	0.3836
<i>d</i> ²	3.572	10.279	0.0075*
<i>ab</i>	0.148	0.427	0.5260
<i>ac</i>	0.265	0.763	0.3994
<i>ad</i>	0.260	0.749	0.4039
<i>bc</i>	0.260	0.749	0.4039
<i>bd</i>	0.366	1.053	0.3250
<i>cd</i>	0.099	0.286	0.6028

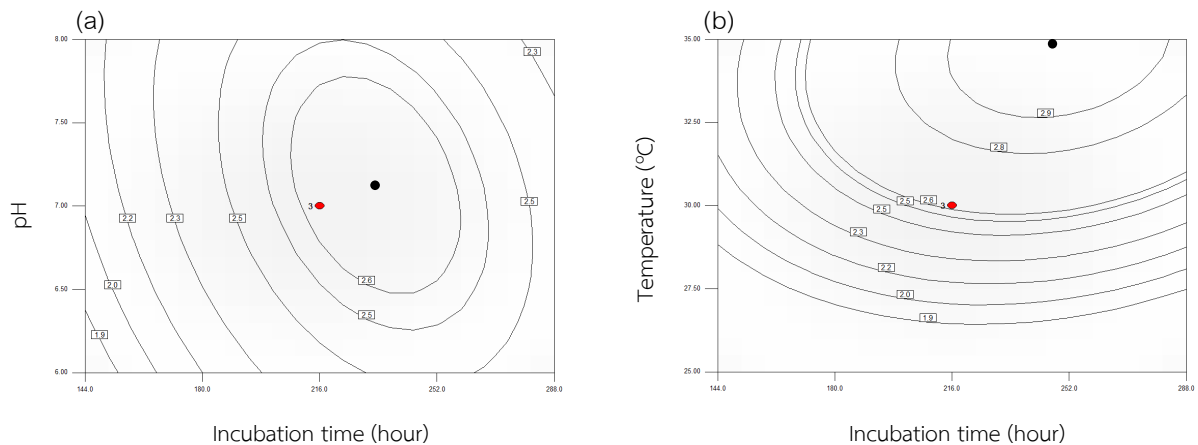
* p value < 0.05 , $R^2 = 0.8309$

เมื่อนำค่าจากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยที่มีผลต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์โคติเนส โดยแสดงเป็นกราฟพื้นผิว (response surface contour plot) (ภาพที่ 7 และ 8) แสดงให้เห็นกราฟพื้นผิวมีแนวโน้มค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงขึ้นจนถึงจุดกึ่งกลางในพื้นที่วงรี ซึ่งที่จุดกลางของวงรีก็คือจุดสูงสุด (peak) ของกราฟพื้นผิว 3 มิติ

ผลการศึกษาค่าการทำงานของเอนไซม์โคติเนสซึ่งวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรมทางสถิติ ค่าที่คาดว่าจะเป็น (predict) ของเอนไซม์โคติเนสสูงสุดเท่ากับ 2.60 U/ml เมื่อปริมาณที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยคือ ความเข้มข้นของสารตั้งต้น เท่ากับ 1.56 % ระยะเวลาในการบ่มเชื้อ 256 ชั่วโมง pH 7.4 และ อุณหภูมิ 32 °C ทั้งนี้หลังจากทำการทดสอบเพื่อยืนยันผล พบว่า ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โคติเนสที่ได้จริงเท่ากับ 2.51 U/ml ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ กับค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ทางโปรแกรมทางสถิติ



ภาพที่ 7 ความสัมพันธ์ของปัจจัยที่มีผลต่อค่าการทำงานของเอนไซม์ไคตินเนส; (a) ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารตั้งต้น และเวลา เมื่อกำหนด pH และอุณหภูมิเท่ากับ 7.0 และ 30 °C ตามลำดับ ; (b) ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารตั้งต้น และค่า pH เมื่อกำหนดอุณหภูมิ และเวลา เท่ากับ 30 °C และ 216 ชั่วโมง ตามลำดับ

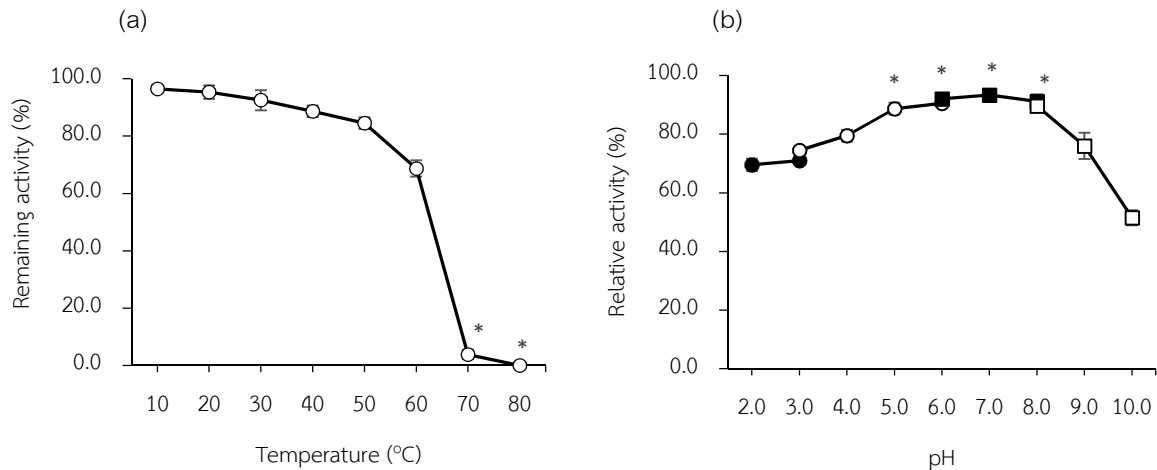


ภาพที่ 8 ความสัมพันธ์ของปัจจัยที่มีผลต่อค่าการทำงานของเอนไซม์ไคตินเนส; (a) ความสัมพันธ์ระหว่างค่า pH และ เวลา เมื่อกำหนดความเข้มข้นของสารตั้งต้น และอุณหภูมิเท่ากับ 1.5% และ 30 °C ตามลำดับ ; (b) ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ และเวลา เมื่อกำหนดความเข้มข้นของสารตั้งต้น และค่า pH และ เท่ากับ 1.5% และ 7.0 ตามลำดับ

5.5 คุณสมบัติต่างๆของเอนไซม์ไคตินเนส

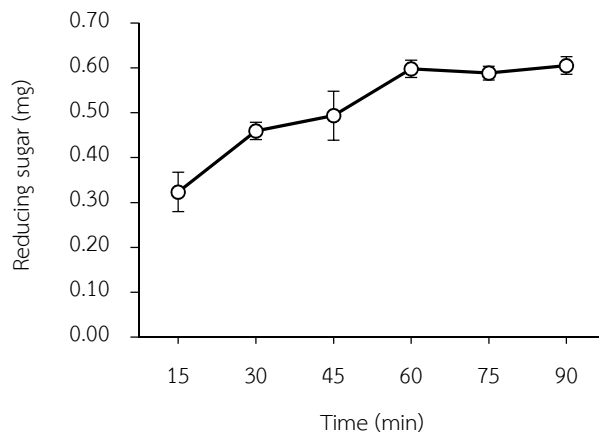
ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเนสมีความเสถียรต่ออุณหภูมิ (temperature stability) ที่ 20-40 °C จากนั้นเอนไซม์จะมีค่ากิจกรรมลดลง และไม่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ เมื่อบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 70-80 °C แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อบ่มไว้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 60 °C (ภาพที่ 9a) และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเนสมีความเสถียรต่อ pH (pH stability) ในช่วง pH 5.0-8.0 (ภาพที่ 9b) ซึ่งสอดคล้องไปในทิศทางเดียวกับการทดลองของ Cheba และคณะ (2016) ที่พบว่า เอนไซม์ไคตินเนสที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. R2 มีความเสถียรเมื่อบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 40 °C และในช่วง pH 7.0-8.0 จากนั้นค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลง 50% และ 62% เมื่อบ่มเอนไซม์ที่ 50 °C 30 นาที และ ที่ pH 9.0 ตามลำดับ

อีกหนึ่งคุณสมบัติของสารละลายเอนไซม์ไคตินเนสที่ได้ทำการศึกษา คือ ความเร็วในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ไคตินเนส เมื่อใช้ colloidal chitin 1% ใน 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) เป็นสารตั้งต้น ผลการทดลองพบว่า เอนไซม์เปลี่ยน colloidal chitin เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ได้ตั้งแต่หลังบ่ม 15 นาที และมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนมีปริมาณคงที่หลังจากบ่มไว้นาน 60 นาที (ภาพที่ 10)



ภาพที่ 9 ผลของอุณหภูมิ (a) และ pH (b) ต่อความเสถียร (stability) ของเอนไซม์ไคตินเนส

* Bar represent standard deviation of three replications and the same sign are not significantly different ($p > 0.05$) according to Duncan's multiple range test.



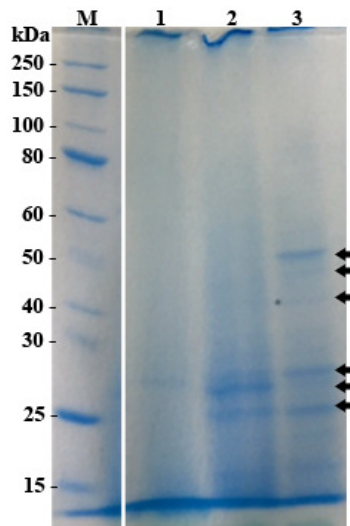
ภาพที่ 10 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาของสารละลายเอนไซม์ไคตินเนส

* Bar represent standard deviation of three replications

5.6 การตอบสนองของผลลองกองต่อเอนไซม์ไคตินเนสสกัดหยาบและสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *M. guizhouense* PSUM04

หลังจากผลลองกองถูกกระตุ้นด้วยสารละลายเอนไซม์ไคตินเนส และสปอร์แขวนลอยของเชื้อ *M. guizhouense* PSUM04 ความเข้มข้น 10^4 สปอร์/มิลลิลิตร พบว่าผลลองกองที่ถูกกระตุ้นด้วยเอนไซม์ และน้ำกลั่น (ชุดควบคุม) ไม่แสดงการเปลี่ยนแปลงใดบนผลลองกอง และเมื่อดูโปรตีนแยกตามขนาดด้วยวิธีการ SDS-PAGE ก็ไม่แสดงแถบแบนใดๆ บนเจล ส่วนผล

ลองกองที่กระตุ้นด้วยสปอร์แขวนลอยของ *M. guizhouense* PSUM04 พบจุดเนื้อเยื่อตาย (necrosis) บนเปลือกของลองกอง แต่จุดนั้นไม่ลุกลามเข้าไปจนถึงเนื้อของลองกอง และเมื่อเปรียบเทียบกับแถบแบนบนเจลตามวิธีการ SDS-PAGE พบว่ามีแถบของโปรตีนขนาดต่างๆเกิดขึ้น หลังจากถูกกระตุ้น 24 และ 48 ชั่วโมง (ภาพที่ 11) โดยโปรตีนขนาด 25-27 kDa เป็นกลุ่มของไคตินเนส ซึ่งสอดคล้องกับการค้นพบของ Daulagala (2014) ที่พบว่าโปรตีนขนาด 26 kDa เป็นไคตินเนส ที่ได้จากน้ำคั้นจากเปลือกกล้วย ส่วนโปรตีนขนาด 43 kDa เป็นกลุ่มของบีตา-1,3-กลูคาเนส ซึ่งตรงกับที่ Porat et al. (1999) รายงานไว้เมื่อศึกษาโปรตีนจากน้ำคั้นของเนื้อเยื่ออ่อน และเมื่อตรวจสอบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ พบว่ามีไคตินเนส และบีตา-1,3-กลูคาเนส 0.12 ± 0.004 และ 1.33 ± 0.09 U/ml ตามลำดับ (ตารางที่ 6) ซึ่งทั้งสองเป็นโปรตีนที่พืชสร้างขึ้นเมื่อถูกกระตุ้นจากสิ่งเร้า เรียกว่า pathogenesis-related protein (PR protein) ที่มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ยกตัวอย่างจากการศึกษาของ Chen และ Tian (2005) ที่พบว่า PR protein ที่ได้จากผลเชอร์รี่สามารถยับยั้งการเจริญของ blue mold (*Penicillium expansum*) ได้ ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้พบว่า น้ำคั้นที่ได้จากเปลือกลองกองที่กระตุ้นด้วย *M. guizhouense* PSUM04 ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Botrytis* sp., *Fusarium* sp. และ *Pestalotiopsis* sp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 34.9, 29.3 และ 30.5 % ตามลำดับ (ภาพที่ 12)

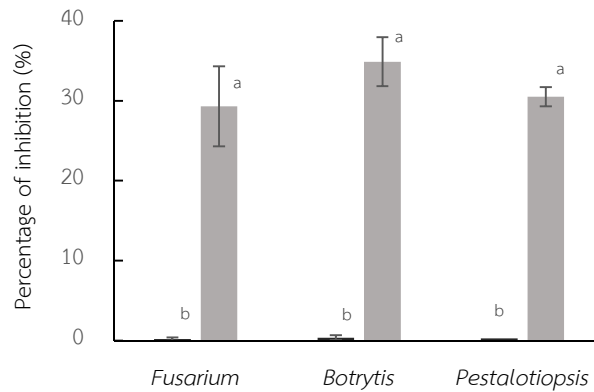


ภาพที่ 11 แถบโปรตีนที่ปรากฏบนเจลของ SDS-PAGE (M = protein marker, 1 = ชุดควบคุมที่ใช้น้ำเปล่า, 2 และ 3 = น้ำคั้นจากเปลือกลองกองหลังถูกกระตุ้นด้วย *M. guizhouense* PSUM04 เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ)

ตารางที่ 6 กิจกรรมของเอนไซม์ของน้ำคั้นจากเปลือกของลองกองที่ถูกกระตุ้นด้วย *M. guizhouense* PSUM04

Sample	Chitinase (U/ml)*		b-1,3-glucanase (U/ml)*	
	24 h	48 h	24 h	48 h
Control	0.00 ± 0.00	0.02 ± 0.001	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Inoculated	0.12 ± 0.004	0.17 ± 0.02	1.33 ± 0.09	1.51 ± 0.12

* Mean ± Standard deviation (3 replications)

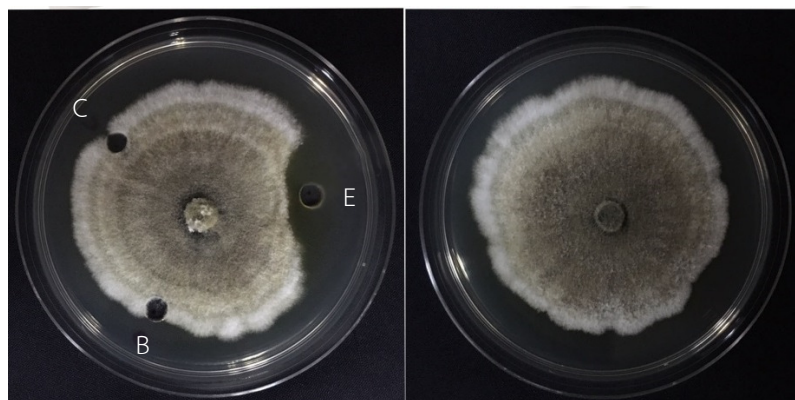


ภาพที่ 12 การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราก่อโรคผลเน่า โดยใช้น้ำคั้นจากผลองุ่นน้ำคั้นจากเปลือกองุ่นหลังถูกกระตุ้นด้วย *M. guizhouense* PSUM04 (สีเทา) และ potassium phosphate buffer pH 7.0 (สีดำ)

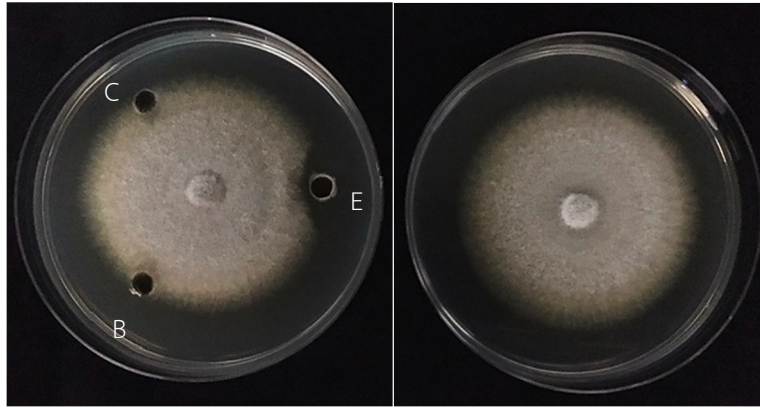
* Bar represent standard deviation of three replications and the same sign are not significantly different ($p > 0.05$) according to Duncan's multiple range test.

5.7 ประสิทธิภาพของสารละลายเอนไซม์โคติเนสในการควบคุมการเจริญของเชื้อราก่อโรคบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

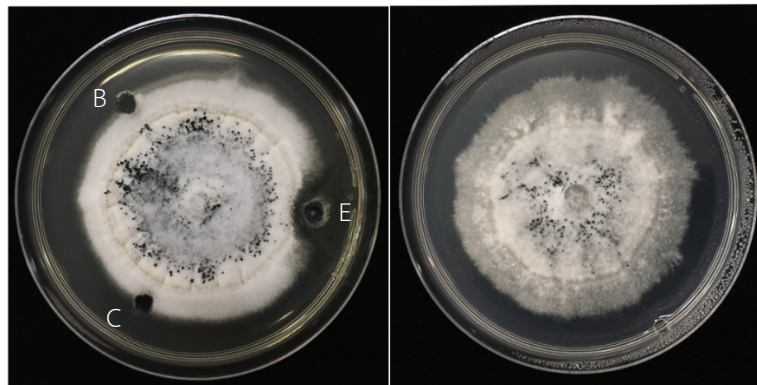
ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โคติเนสทดสอบ 36.5 ± 4.9 U/ml จากนั้นนำไปกรองด้วย millipore filter ขนาด $45 \mu\text{m}$ แล้วนำไปทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Botrytis* sp., *Fusarium* sp. และ *Pestalotiopsis* sp. ด้วยวิธี gel diffusion บนอาหารวุ้น PDA พบว่าสารละลายเอนไซม์โคติเนสสกัดหยาบสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราทั้ง 3 ชนิดได้ โดย inhibition zone ของเชื้อรา *Botrytis* sp., *Fusarium* sp. และ *Pestalotiopsis* sp. มีขนาดความกว้าง 0.26 ± 0.05 , 0.18 ± 0.03 และ 0.20 ± 0.04 เซนติเมตร หรือ percentage of inhibition เท่ากับ 44.7, 42.9 และ 43.6 % ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกรใช้น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ (control) และการใช้ extraction buffer (50 mM KPB) (ภาพที่ 13-15) นอกเหนือจากผลการศึกษาค้นคว้าที่ผ่านมามีรายงานผลของเอนไซม์โคติเนสต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคหลังเก็บเกี่ยวอีกหลายชนิด เช่น *Botrytis cinerea* (Daulagala, 2014), *Colletotrichum gloeosporioides* (Ali et al., 2014), *Penicillium expansum* (Chan and Tian, 2005), *P. digitatum* (Inkha and Boonyakiat, 2010) และ *Phomopsis asparagi* (Lu et al., 2008)



ภาพที่ 13 เชื้อรา *Botrytis* sp. ที่เจริญตามปกติบนอาหาร PDA (ภาพขวา) และ Inhibition zone ที่เกิดจากการยับยั้งการเจริญของรา *Botrytis* sp. โดยการใช้สารละลายเอนไซม์โคติเนสสกัดหยาบ (E) น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ (C) และ extraction buffer (B) (ภาพซ้าย)



ภาพที่ 14 เชื้อรา *Fusarium* sp. ที่เจริญตามปกติบนอาหาร PDA (ภาพขวา) และ Inhibition zone ที่เกิดจากการยับยั้งการเจริญของรา *Fusarium* sp. โดยการใช้สารละลายเอนไซม์โคติเนสสกัดหยาบ (E) น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ (C) และ extraction buffer (B) (ภาพซ้าย)



ภาพที่ 15 เชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. ที่เจริญตามปกติบนอาหาร PDA (ภาพขวา) และ Inhibition zone ที่เกิดจากการยับยั้งการเจริญของรา *Pestalotiopsis* sp. โดยการใช้สารละลายเอนไซม์โคติเนสสกัดหยาบ (E) น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ (C) และ extraction buffer (B) (ภาพซ้าย)

5.8 ปัจจัยที่เหมาะสมในการควบคุมการเจริญของเชื้อรากลุ่มโรคบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

เมื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการใช้เอนไซม์โคติเนสในการควบคุมการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของลองกอง 3 เชื้อ ได้แก่ *Botrytis* sp., *Fusarium* sp. และ *Pestalotiopsis* sp. แบบหลายปัจจัยพร้อมกัน (multiple factor optimization) พบว่าผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Botrytis* sp. บนอาหาร PDA เมื่อวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปสมการตัวแทนมีค่า p น้อยกว่า 0.05 ซึ่งแสดงว่ามีสัมประสิทธิ์ของตัวแปรอย่างน้อย 1 ตัวแปรที่มีค่าแตกต่างจาก 0 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ตารางที่ 7) และได้สมการตัวแทน ดังนี้

$$\text{Inhibition (\%)} \text{ of } Botrytis \text{ sp.} = -11.72 + 2.82b - 0.04b^2 \quad \text{significant, } R^2 = 0.9789$$

โดยที่ a = อุณหภูมิที่บ่มเอนไซม์ก่อนนำไปใช้ b = ค่าความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ และ c = ระยะเวลาในการบ่มเอนไซม์ ซึ่งค่าที่ไม่มีนัยสำคัญจะไม่แสดงในสมการ

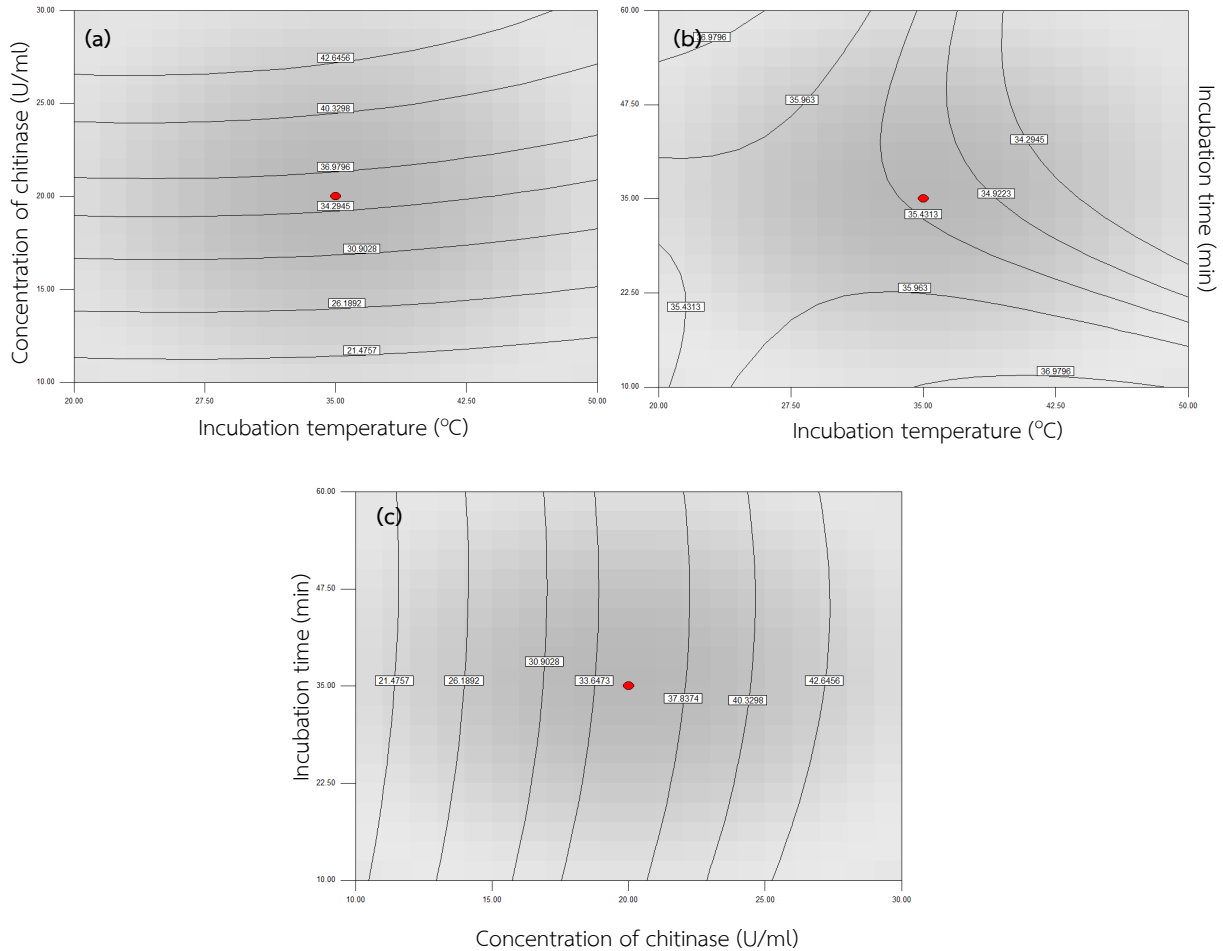
ตารางที่ 7 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของตัวแปร/ปัจจัย แบบ response surface quadratic model ที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Botrytis* sp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

Source	Mean Square	F value	Prob > F
Model	278.37	25.74	0.0011*
a	20.64	1.91	0.2256
b	2270.48	209.93	<0.001*
c	8.34	0.77	0.4201
a^2	5.36	0.50	0.5130
b^2	94.20	8.71	0.0318*
c^2	3.61	0.33	0.5884
ab	0.36	0.033	0.8622
ac	32.40	3.00	0.1440
bc	0.28	0.026	0.8782

* p value < 0.05 , R^2 = 0.9789

เมื่อนำค่าจากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Botrytis* sp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยแสดงเป็นกราฟพื้นผิว (response surface plot) แสดงให้เห็นกราฟพื้นผิวมีแนวโน้มการยับยั้งที่สูงขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ และปัจจัยแต่ละชนิดส่งผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Botrytis* sp. แบบไม่สัมพันธ์กัน (ภาพที่ 16)

ผลการใช้เอนไซม์โคติเนสสกัดหยาบเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Botrytis* sp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ซึ่งวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรมทางสถิติ มีค่าที่คาดว่าจะเป็นการยับยั้งสูงสุดเท่ากับ 44.01 % เมื่อปริมาณที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยคือ ใช้เอนไซม์โคติเนสที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ 29.5 U/ml บ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 36 °C เป็นระยะเวลา 53 นาที ก่อนนำไปใช้ ทั้งนี้หลังจากทำการทดสอบเพื่อยืนยันผล พบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์โคติเนสที่ได้จริงเท่ากับ 45.00 % ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) กับค่าที่คาดว่าจะเป็นที่ได้จากการวิเคราะห์ทางโปรแกรมทางสถิติ



ภาพที่ 16 ความสัมพันธ์ของปัจจัยที่มีผลยับยั้งการเจริญของรา *Botrytis* sp. บนอาหาร PDA; (a) ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเอนไซม์ไคตินเนส และอุณหภูมิ เมื่อกำหนดเวลาในการบ่มเท่ากับ 35 นาที; (b) ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ และเวลาในการบ่มเอนไซม์ เมื่อกำหนดความเข้มข้นของเอนไซม์ 20 U/ml และ (c) ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเอนไซม์ไคตินเนส และเวลา เมื่อกำหนดอุณหภูมิไว้ที่ 35 °C

ผลการทดสอบปัจจัยที่มีผลต่อการใช้เอนไซม์ไคตินเนสกักตยabinในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Fusarium* sp. บนอาหาร PDA พบว่าเมื่อวิเคราะห์ความแปรปรวน สมการตัวแทน (model) มีค่า p น้อยกว่า 0.05 ซึ่งแสดงว่ามีสัมประสิทธิ์ของตัวแปรอย่างน้อย 1 ตัวแปรที่มีค่าแตกต่างจาก 0 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ตารางที่ 8) และได้สมการตัวแทน ดังนี้

$$\text{Inhibition (\%)} \text{ of } \textit{Fusarium} \text{ sp.} = -13.26 + 2.76b - 0.04b^2 \quad \text{significant, } R^2 = 0.9741$$

โดยที่ a = อุณหภูมิที่บ่มเอนไซม์ก่อนนำไปใช้ b = ค่าความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ และ c = ระยะเวลาในการบ่มเอนไซม์ ซึ่งค่าที่ไม่มีนัยสำคัญจะไม่แสดงในสมการ

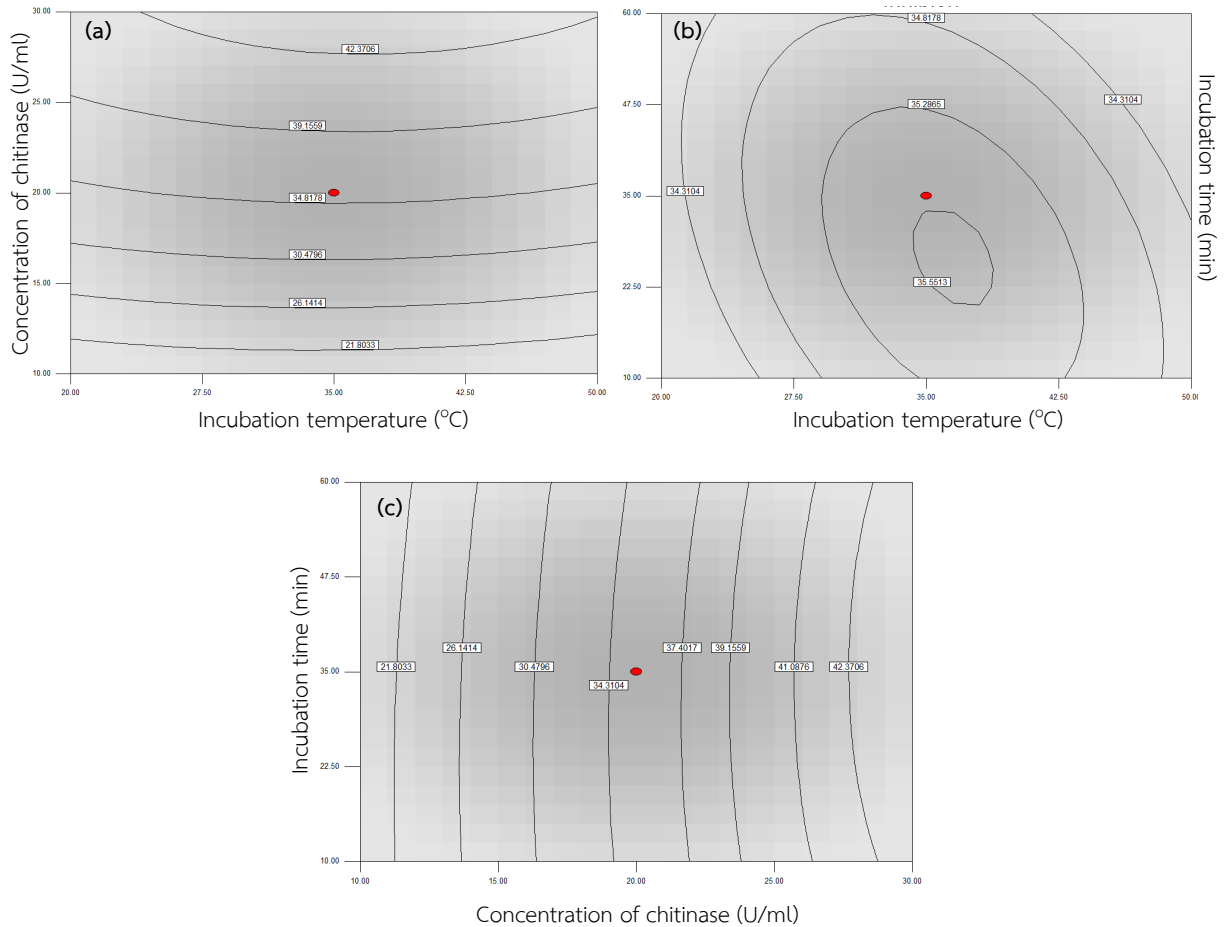
เมื่อนำค่าจากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Fusarium* sp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยแสดงเป็นกราฟพื้นผิว (response surface contour plot) แสดงให้เห็นกราฟพื้นผิวมีแนวโน้มการยับยั้งที่สูงขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ และอุณหภูมิกับเวลาในการบ่มเอนไซม์มีความสัมพันธ์กัน (ภาพที่ 17)

ผลการใช้เอนไซม์โคติเนสสกัดหยาบเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Fusarium* sp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ซึ่งวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรมทางสถิติ ค่าที่คาดว่าจะเป็น (predict) ของการยับยั้งสูงสุดเท่ากับ 42.93 % เมื่อปริมาณที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยคือ ใช้เอนไซม์โคติเนสที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ 29 U/ml บ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 38.5 °C เป็นระยะเวลา 21 นาที ก่อนนำไปใช้ ทั้งนี้หลังจากทำการทดสอบเพื่อยืนยันผล พบว่า ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โคติเนสที่ได้จริงเท่ากับ 39.78 % ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) กับค่าที่คาดว่าจะเป็นที่ได้จากวิเคราะห์ทางโปรแกรมทางสถิติ

ตารางที่ 8 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของตัวแปร/ปัจจัย แบบ response surface quadratic model ที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Fusarium* sp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

Source	Mean Square	F value	Prob > F
Model	241.6	20.9	0.0019*
a	0.065	0.0005	0.9429
b	2013.9	174.5	<0.0001*
c	1.05	0.091	0.7751
a ²	11.93	1.03	0.3560
b ²	107.51	9.31	0.0284*
c ²	1.53	0.13	0.7309
ab	1.13	0.097	0.7675
ac	3.13	0.27	0.6251
bc	1.13	0.097	0.7675

* p value < 0.05 , R^2 = 0.9741



ภาพที่ 17 ความสัมพันธ์ของปัจจัยที่มีผลยับยั้งการเจริญของรา *Fusarium* sp. บนอาหาร PDA; (a) ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเอนไซม์ไคติเนส และอุณหภูมิ เมื่อกำหนดเวลาในการบ่มเท่ากับ 35 นาที; (b) ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ และเวลาในการบ่มเอนไซม์ เมื่อกำหนดความเข้มข้นของเอนไซม์ 20 U/ml และ (c) ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเอนไซม์ไคติเนส และเวลา เมื่อกำหนดอุณหภูมิไว้ที่ 35 °C

ผลการทดสอบปัจจัยที่มีผลต่อการใช้เอนไซม์ไคติเนสสกัดหยาบ ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pestalotiosis* sp. บนอาหาร PDA พบว่าเมื่อวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป สมการตัวแทนมีค่า p น้อยกว่า 0.05 ซึ่งแสดงว่ามีสัมประสิทธิ์ของตัวแปรอย่างน้อย 1 ตัวแปรที่มีค่าแตกต่างจาก 0 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ตารางที่ 9) และได้สมการตัวแทน ดังนี้

$$\text{Inhibition (\%)} \text{ of } \textit{Pestalotiosis} \text{ sp.} = -92.54 + 3.70a - 0.07b^2 \quad \text{significant, } R^2 = 0.9159$$

โดยที่ a = อุณหภูมิที่บ่มเอนไซม์ก่อนนำไปใช้ b = ค่าความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ และ c = ระยะเวลาในการบ่มเอนไซม์ ซึ่งค่าที่ไม่มีความสำคัญจะไม่แสดงในสมการ

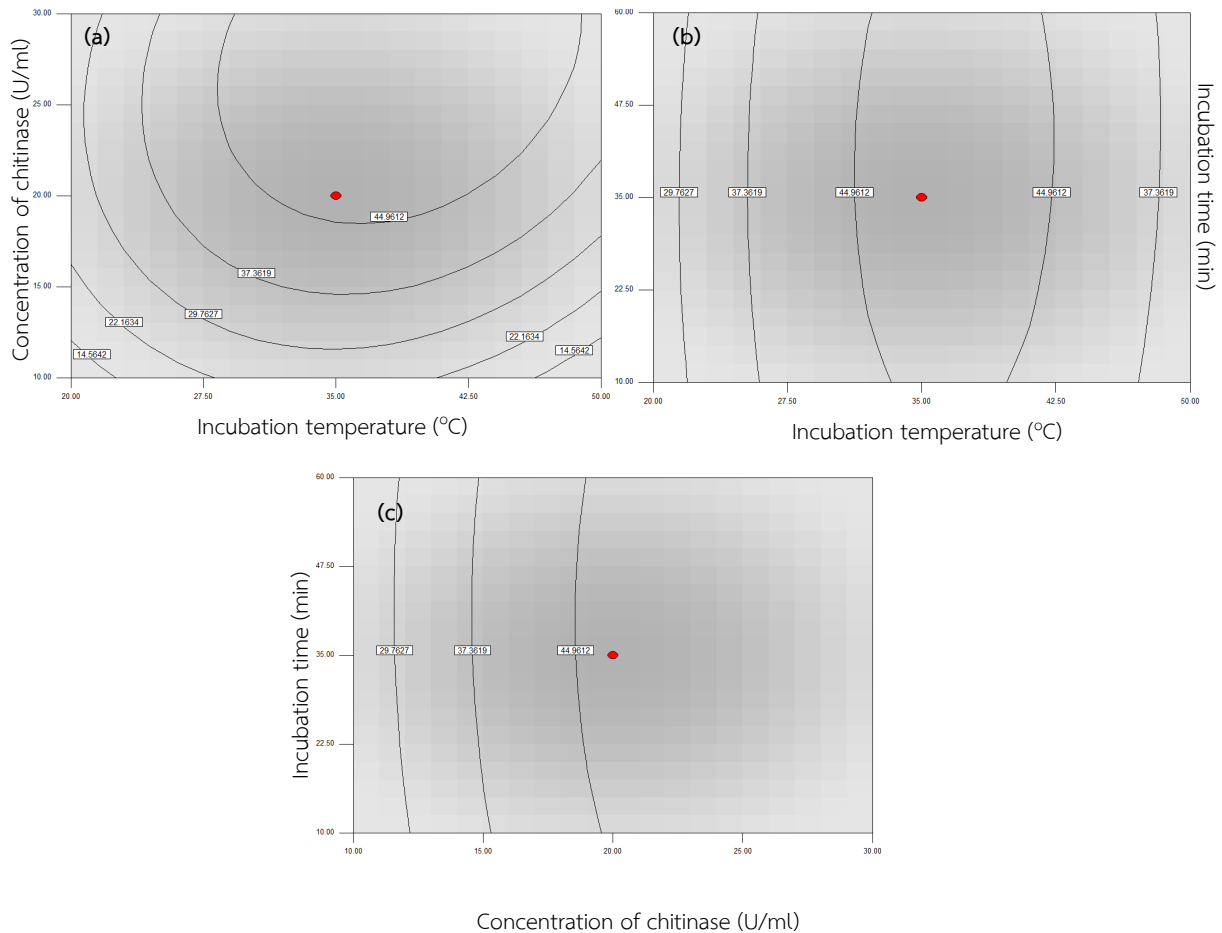
เมื่อนำค่าจากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยแสดงเป็นกราฟพื้นผิว แสดงให้เห็นกราฟพื้นผิวมีแนวโน้มการยับยั้งที่สูงขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ และปัจจัยแต่ละชนิดส่งผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบไม่สัมพันธ์กัน (ภาพที่ 18)

ผลการใช้เอนไซม์โคติเนสสกัดหยาบเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ซึ่งวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรมทางสถิติ ค่าที่คาดว่าจะเป็นการยับยั้งสูงสุดเท่ากับ 51.37 % เมื่อปริมาณที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยคือ ใช้เอนไซม์โคติเนสที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ 28.4 U/ml บ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 34.7 °C เป็นระยะเวลา 51.4 นาที ก่อนนำไปใช้ ทั้งนี้หลังจากทำการทดสอบเพื่อยืนยันผล พบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์โคติเนสที่ได้จริงเท่ากับ 48.80 % ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) กับค่าที่คาดว่าจะเป็นที่ได้จากการวิเคราะห์ทางโปรแกรมทางสถิติ

ตาราง 9 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของตัวแปร/ปัจจัย แบบ response surface quadratic model ที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

Source	Mean Square	F value	Prob > F
Model	5347.02	6.05	0.0308*
<i>a</i>	208.05	2.12	0.2052
<i>b</i>	2281.03	23.23	0.0048*
<i>c</i>	2.11	0.021	0.8893
<i>a</i> ²	1707.68	17.39	0.0087*
<i>b</i> ²	490.37	4.99	0.0757
<i>c</i> ²	6.62	0.067	0.8055
<i>ab</i>	220.50	2.25	0.1943
<i>ac</i>	2.00	0.020	0.8921
<i>bc</i>	0.50	0.005	0.9459

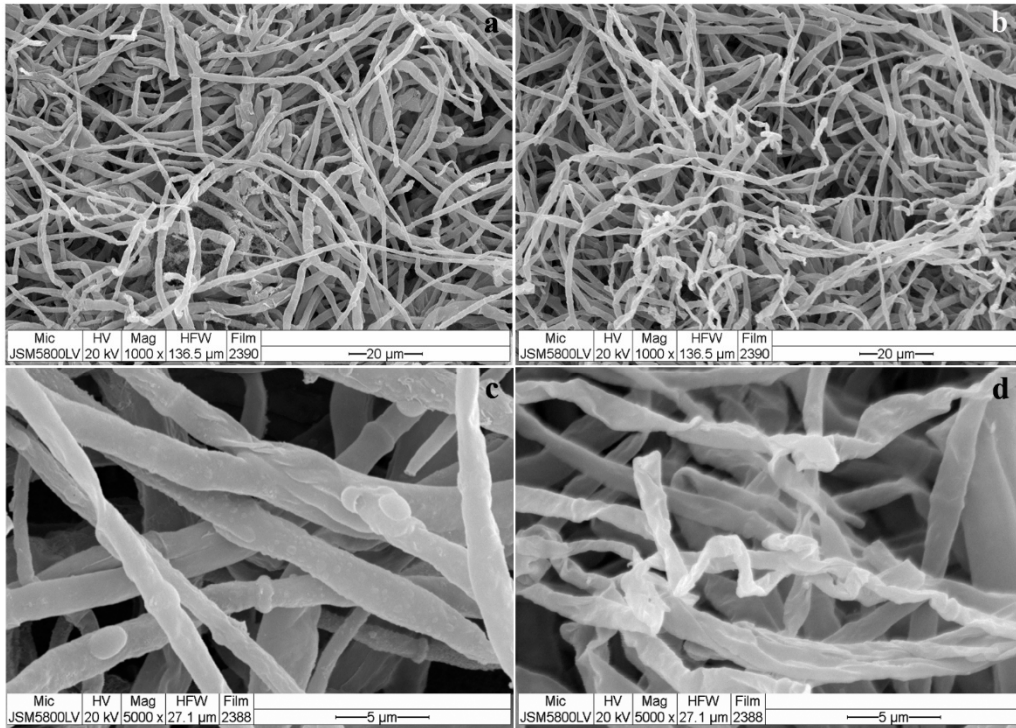
* p value < 0.05 , $R^2 = 0.9159$



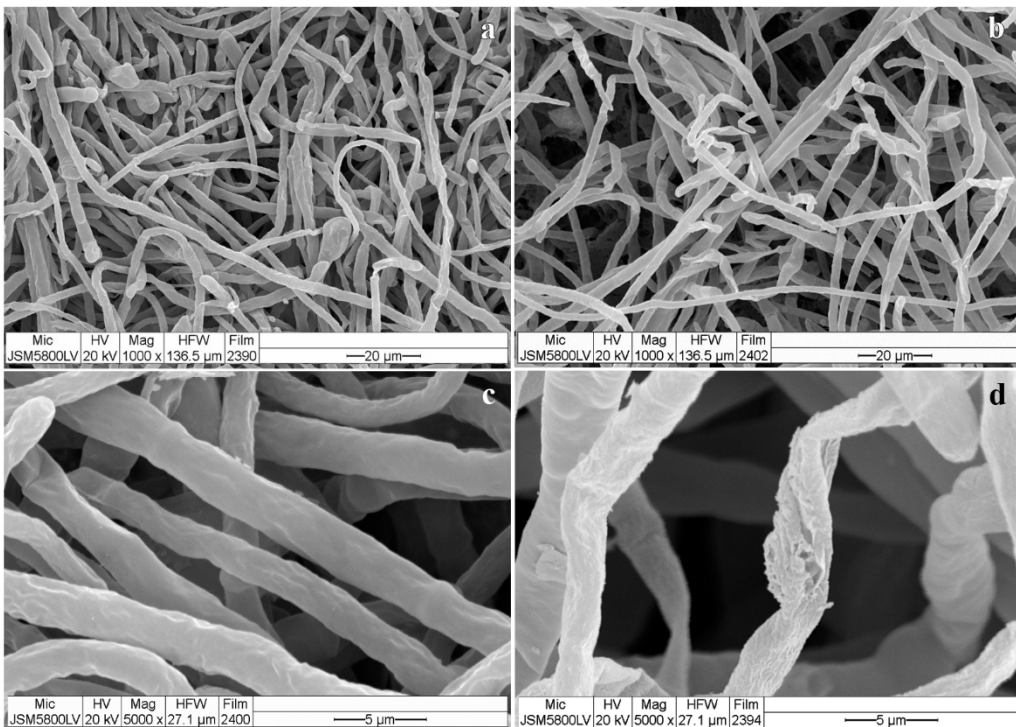
ภาพที่ 18 ความสัมพันธ์ของปัจจัยที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของรา *Pestalotiopsis* sp. บนอาหาร PDA (a) ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเอนไซม์ไคติเนส และอุณหภูมิ เมื่อกำหนดเวลาในการบ่มเท่ากับ 35 นาที; (b) ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ และเวลาในการบ่มเอนไซม์ เมื่อกำหนดความเข้มข้นของเอนไซม์ 20 U/ml และ (c) ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเอนไซม์ไคติเนส และเวลา เมื่อกำหนดอุณหภูมิไว้ที่ 35 °C

5.9 ลักษณะเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (scanning electron microscope; SEM)

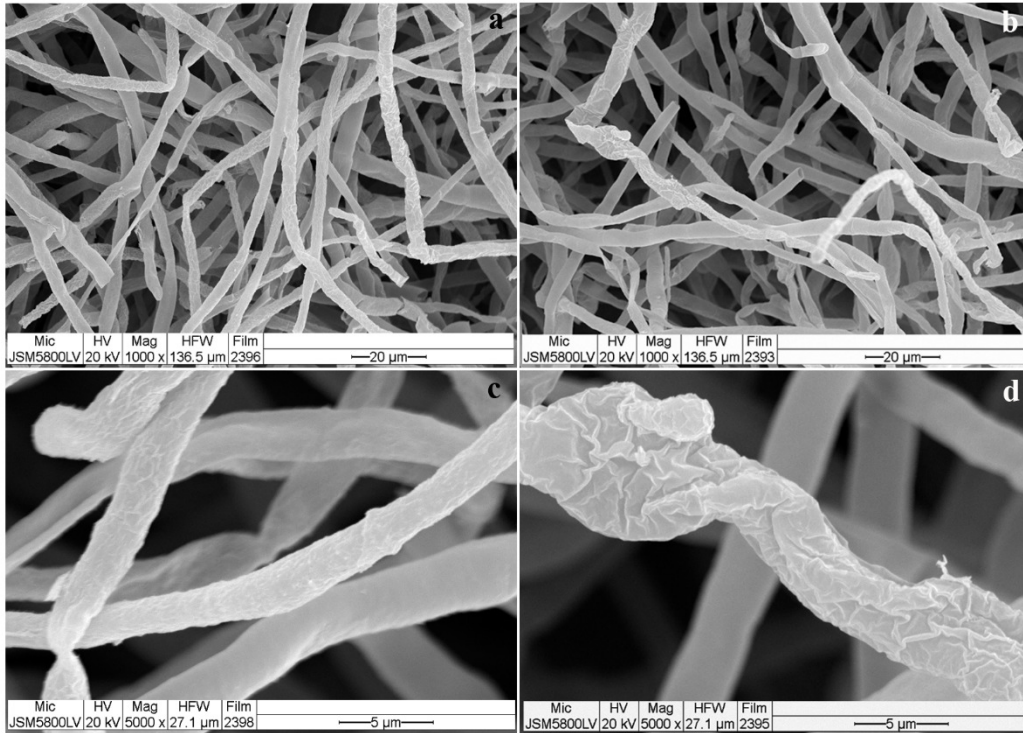
ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าเปลี่ยนแปลงไปหลังจากการทดสอบด้วยเอนไซม์ไคติเนส โดยเมื่อดูลักษณะเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบอิเล็กตรอนชนิดส่องกราด พบว่าเส้นใยของ *Botrytis* sp., *Fusarium* sp. และ *Pestalotiopsis* sp. มีรูปร่างผิดปกติไป บิดเบี้ยว และฉีกขาด นอกจากนี้เส้นใยของ *Fusarium* sp. และ *Pestalotiopsis* sp. ยังมีความหนาแน่นลดลงอีกด้วย (ภาพที่ 19-21)



ภาพที่ 19 เส้นใยของรา *Botrytis* sp. ใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด; (a) และ (c) กระจุนด้วยน้ำเปล่า (control) และภาพ (b) และ (d) กระจุนด้วยน้ำคั้นจากกองที่กระจุนด้วย *M. guizhouense* PSUM04



ภาพที่ 20 เส้นใยของรา *Fusarium* sp. ใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด; (a) และ (c) กระจุนด้วยน้ำเปล่า (control) และภาพ (b) และ (d) กระจุนด้วยน้ำคั้นจากกองที่กระจุนด้วย *M. guizhouense* PSUM04



ภาพที่ 21 เส้นใยของรา *Peatalotiopsis* sp. ใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด; (a) และ (c) กระตุ้นด้วยน้ำเปล่า (control) และภาพ (b) และ (d) กระตุ้นด้วยน้ำคั้นจากกองที่กระตุ้นด้วย *M. guizhouense* PSUM04

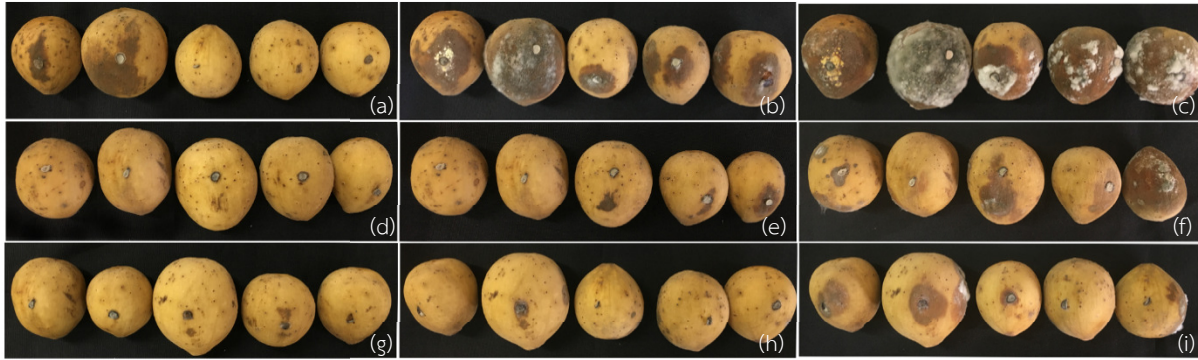
5.10 ผลของสารละลายเอนไซม์ไคตินเอสต่อการยับยั้งการเกิดโรคผลเน่าบนผลลองกอง

แบ่งเป็น 3 ชุดการทดลอง ได้แก่ (1) ฟันสารละลายเอนไซม์ก่อนปลูกเชื้อราก่อโรค (pre-inoculation) (2) ปลูกเชื้อราก่อโรคก่อนจากนั้นจึงฟันสารละลายเอนไซม์ (post-inoculation) และ (3) ชุดควบคุมซึ่งปลูกเชื้อราก่อโรคเพียงอย่างเดียว สังเกตผลการเกิดโรคหลังจากปลูกเชื้อราก่อโรคทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 5 วัน

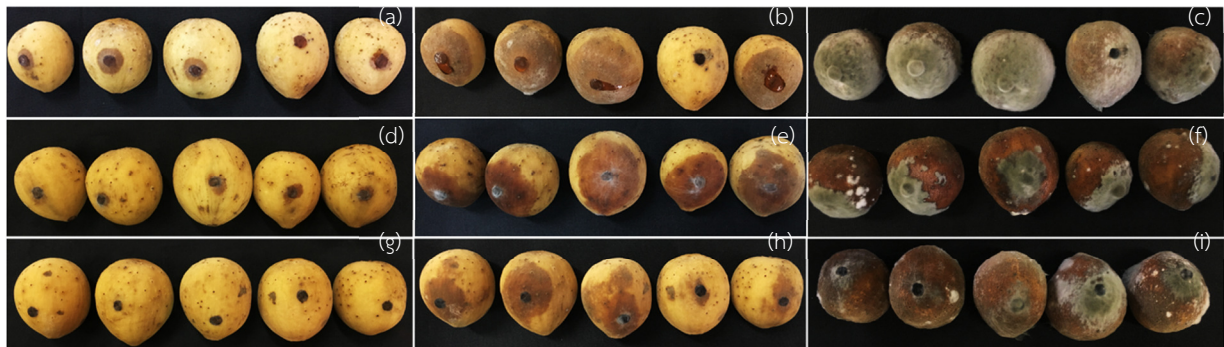
หลังจากปลูกเชื้อรา *Botrytis* sp. พบว่าลองกองในชุดควบคุมเริ่มแสดงอาการผลเน่าหลังจากปลูกเชื้อ 48 ชั่วโมง ส่วนลองกองที่ฟันสารละลายเอนไซม์ก่อนและหลังการปลูกเชื้อราก่อโรค เริ่มแสดงอาการผลเน่าหลังจากปลูกเชื้อ 72 ชั่วโมง และแผลสีน้ำตาลลูกกลม มีขนาดใหญ่ขึ้น หลังจากการปลูกเชื้อได้ 120 ชั่วโมง ชุดควบคุม และลองกองที่ฟันสารละลายเอนไซม์ก่อนปลูกเชื้อ เกิดแผลสีน้ำตาลเกือบทั่วทั้งผล และมีเส้นใยของเชื้อราสีขาวปนเทาเจริญปกคลุม (ภาพที่ 22)

รา *Fusarium* sp. ในทุกชุดการทดลอง หลังจากปลูกเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลลองกองยังไม่แสดงอาการใด แต่หลังจาก 48 ชั่วโมง เกิดแผลสีน้ำตาลล้อมรอบขึ้นวันของเชื้อราในชุดควบคุม และลองกองที่ฟันสารละลายเอนไซม์ก่อนปลูกเชื้อราก่อโรค จากนั้นแผลสีน้ำตาลลูกกลม มีขนาดใหญ่ขึ้น ในเวลา 72-96 ชั่วโมงต่อมา และหลังจากการปลูกเชื้อได้ 120 ชั่วโมง พบว่าทุกชุดการทดลอง เกิดแผลสีน้ำตาลเกือบทั่วทั้งผล มีเส้นใยของเชื้อราสีขาวเจริญปกคลุม จากนั้นเส้นใยเปลี่ยนเป็นสีเทาอมดำ และเนื้อเยื่อยุบตัว (ภาพที่ 23)

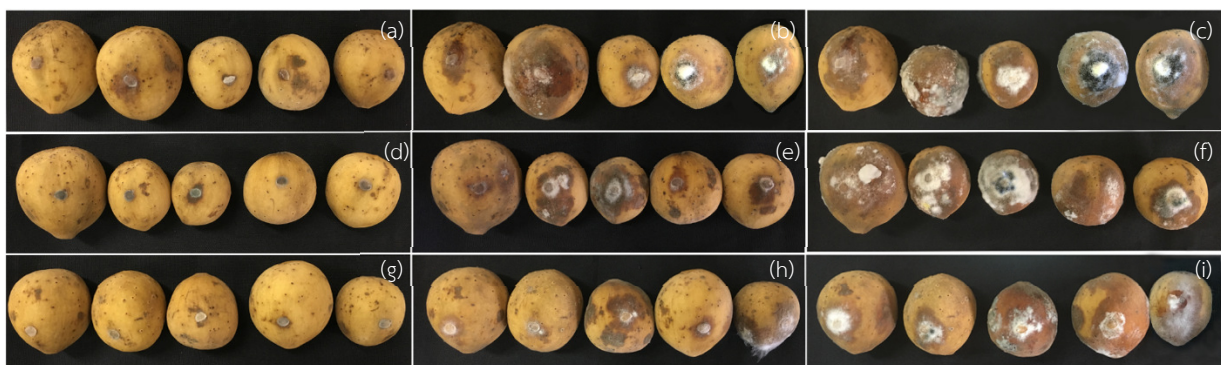
เกิดแผลสีน้ำตาลบนผลลองกองบริเวณรอบขึ้นวันเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. ในระยะเวลา 24 ชั่วโมงหลังการปลูกเชื้อราในชุดควบคุม และลองกองที่ฟันสารละลายเอนไซม์ก่อน ส่วนผลลองกองที่ฟันสารละลายเอนไซม์หลังจากการปลูกเชื้อราก่อโรค เริ่มแสดงอาการผลเน่า หลังจากการปลูกเชื้อ 48 ชั่วโมง จากนั้นลองกองในทุกชุดการทดลองแผลสีน้ำตาลลูกกลม มีขนาดใหญ่ขึ้นอย่างรวดเร็ว มีเส้นใยของเชื้อราสีขาวเจริญปกคลุม และพบ acervular conidiomata สีดำ เป็นกลุ่มบนแผลหลังจากการปลูกเชื้อเพียง 96 ชั่วโมง (ภาพที่ 24)



ภาพที่ 22 การเจริญของของ *Botrytis* sp. บนผลลองกอง; (a-c) ชุดควบคุม หลังจากปลูกเชื้อราทดสอบ 48, 96 และ 120 ชั่วโมง ตามลำดับ, (d-f) ฟันสารละลายเอนไซม์ก่อนปลูกเชื้อร่าก่อโรค หลังจากปลูกเชื้อราทดสอบ 48, 96 และ 120 ชั่วโมง ตามลำดับ และ (g-i) ปลูกเชื้อร่าก่อโรคก่อนจากนั้นจึงฟันสารละลายเอนไซม์ หลังจากปลูกเชื้อราทดสอบ 48, 96 และ 120 ชั่วโมง ตามลำดับ

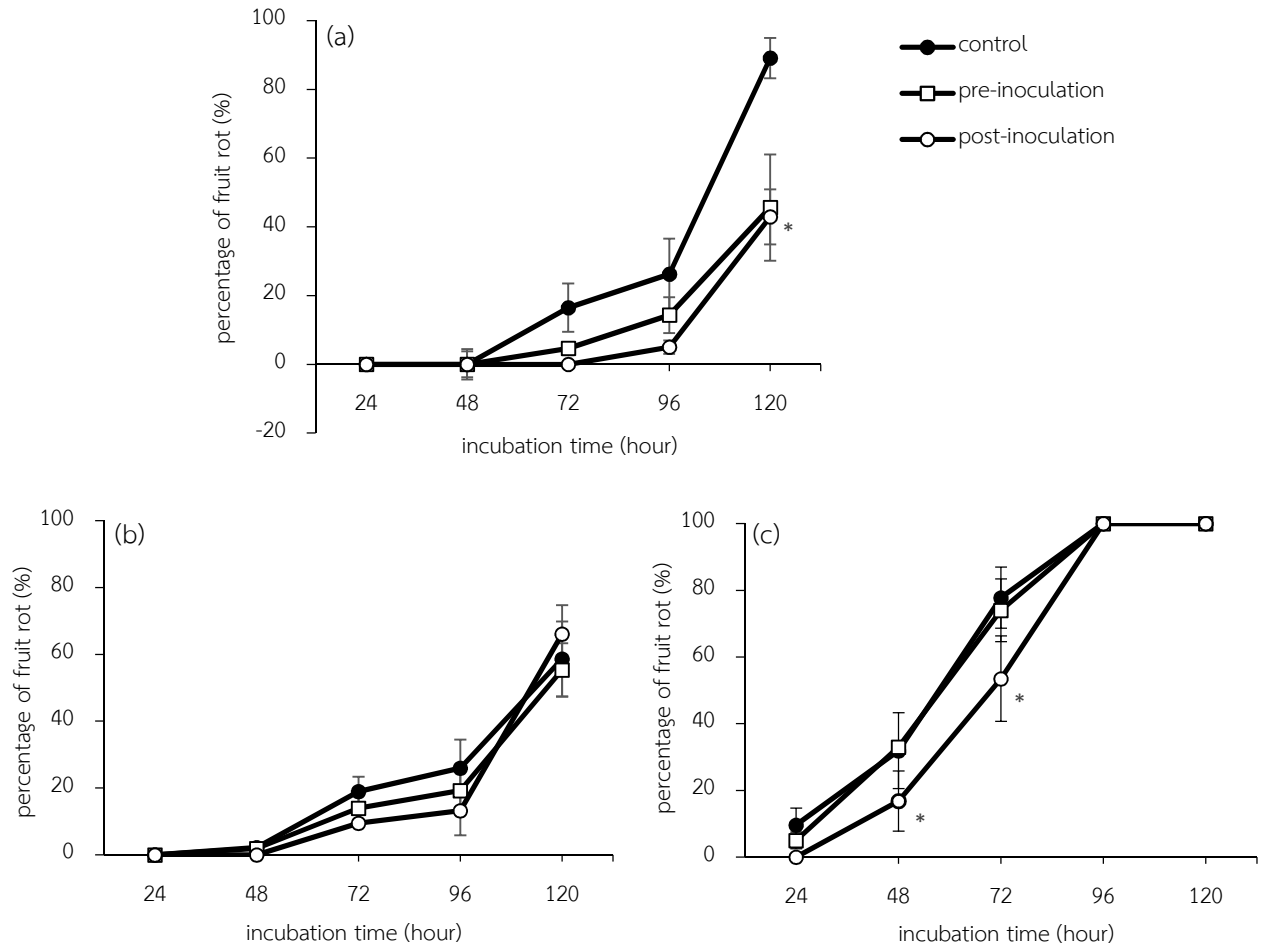


ภาพที่ 23 การเจริญของของ *Fusarium* sp. บนผลลองกอง; (a-c) ชุดควบคุม หลังจากปลูกเชื้อราทดสอบ 48, 96 และ 120 ชั่วโมง ตามลำดับ, (d-f) ฟันสารละลายเอนไซม์ก่อนปลูกเชื้อร่าก่อโรค หลังจากปลูกเชื้อราทดสอบ 48, 96 และ 120 ชั่วโมง ตามลำดับ และ (g-i) ปลูกเชื้อร่าก่อโรคก่อนจากนั้นจึงฟันสารละลายเอนไซม์ หลังจากปลูกเชื้อราทดสอบ 48, 96 และ 120 ชั่วโมง ตามลำดับ



ภาพที่ 24 การเจริญของของ *Pestalotiopsis* sp. บนผลลองกอง; (a-c) ชุดควบคุม หลังจากปลูกเชื้อราทดสอบ 24, 48 และ 96 ชั่วโมง ตามลำดับ, (d-f) ฟันสารละลายเอนไซม์ก่อนปลูกเชื้อร่าก่อโรค หลังจากปลูกเชื้อราทดสอบ 24, 48 และ 96 ชั่วโมง ตามลำดับ และ (g-i) ปลูกเชื้อร่าก่อโรคก่อนจากนั้นจึงฟันสารละลายเอนไซม์ หลังจากปลูกเชื้อราทดสอบ 24, 48 และ 96 ชั่วโมง ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบร้อยละของการเกิดผลเน่า พบว่าการพ่นสารละลายเอนไซม์ไคตินเนสบนผลลองกอง สามารถชะลอการเกิดโรคผลเน่าเนื่องจากเชื้อรา *Botrytis* sp. ได้ 48.8 % เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม หลังการปลูกเชื้อรา 120 ชั่วโมง (ภาพที่ 25a) แต่สารละลายเอนไซม์ไคตินเนสไม่สามารถชะลอการเกิดโรคผลเน่าที่เกิดจากเชื้อรา *Fusarium* sp. ได้ เนื่องจากมีร้อยละของการเกิดผลเน่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ภาพที่ 25b) ส่วนการพ่นสารละลายเอนไซม์หลังจากการปลูกเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. สามารถชะลอการเกิดผลเน่าได้ 24.3% หลังจากปลูกเชื้อ 72 ชั่วโมง และหลังจากนั้นลองกองเกิดอาการผลเน่าอย่างรวดเร็ว (ภาพที่ 25c)



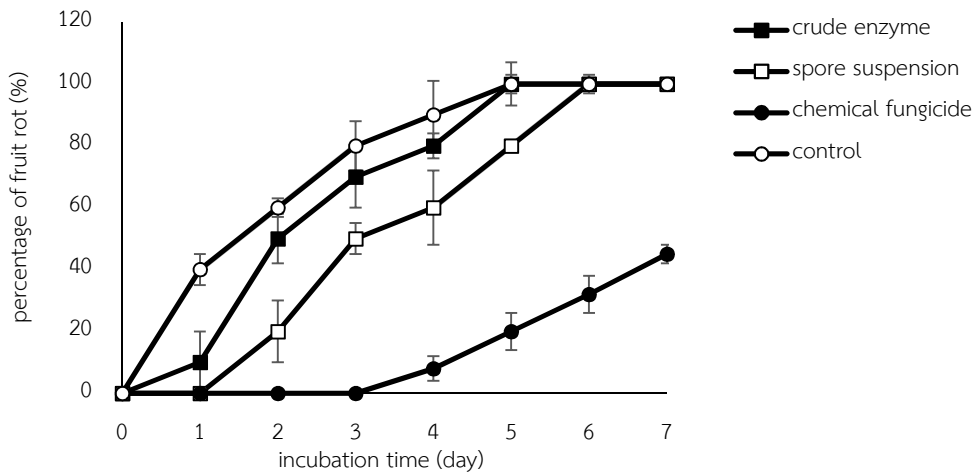
ภาพที่ 25 ร้อยละของการเกิดโรคผลเน่าลองกองหลังจากปลูกเชื้อ; (a) *Botrytis* sp., (b) *Fusarium* sp. และ (c) *Pestalotiopsis* sp.

* Bar represent standard deviation of three replications and mean in the same x axis (incubation time) are significantly different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$)

5.11 เปรียบเทียบผลของสารละลายเอนไซม์ไคตินเนส การใช้สปอร์แขวนลอยของ *M. guizhouense* PSUM04 และ สารเคมี ต่อการยับยั้งการเกิดโรคผลเน่าบนผลลองกอง

เมื่อจุ่มผลลองกองลงในสปอร์แขวนลอยของ *M. guizhouense* PSUM04 พบว่ายิ่งเพิ่มความเข้มข้นของสปอร์แขวนลอยมากขึ้น ($10^4 - 10^6$ สปอร์/มิลลิลิตร) ทำให้ผลลองกองเกิดอาการเนื้อเยื่อตาย (necrosis) มีลักษณะเป็นจุดหรือปื้นสีน้ำตาลบนเปลือก แต่ไม่ลุกลามไปจนถึงเนื้อลองกอง จึงเลือกใช้สปอร์แขวนลอยของเชื้อรา ที่ความเข้มข้น 10^4 สปอร์/มิลลิลิตร ในการทดสอบเปรียบเทียบกับการใช้สารละลายเอนไซม์

เมื่อนำลองกองที่จุ่มสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *M. guizhouense* PSUM04 สารละลายเอนไซม์ไคตินเนส สารคาร์เบนดาซิม และน้ำเปล่า (ชุดควบคุม) ไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง (30 °C) ผลการทดลองพบว่า ลองกองเริ่มแสดงอาการผลเน่า 24 ชั่วโมง หลังจากการเก็บรักษา โดยชุดควบคุมเกิดผลเน่า 40 % ลองกองที่จุ่มสารละลายเอนไซม์ไคตินเนสแสดงอาการผลเน่า 12 % ส่วนลองกองที่จุ่มสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา และสารเคมี ไม่แสดงอาการผลเน่า จากนั้นในวันที่ 5 ลองกองในชุดควบคุมและลองกองที่จุ่มสารละลายเอนไซม์ไคตินเนส แสดงอาการผลเน่า 100 % ส่วนลองกองที่จุ่มในสปอร์แขวนลอย และลองกองที่ใช้สารเคมี แสดงอาการผลเน่า 79 และ 20 % ตามลำดับ (ภาพที่ 26) แต่เมื่อนำลองกองไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 10 °C ทั้ง 4 ชุดการทดลอง เริ่มแสดงอาการผลเน่าหลังจากเก็บรักษาไว้เป็นเวลา 13 วัน และเกิดการเน่าสูงสุดในวันที่ 21 ของการเก็บรักษา นอกจากนี้เปลือกลองกองมีสีน้ำตาล (browning) ตั้งแต่วันที่ 3 ของการเก็บรักษา โดยการเกิดสีน้ำตาลเกิดจากกระบวนการออกซิไดซ์ของสารจำพวกโหมโนฟีนอล โดยการทำงานของเอนไซม์ (enzymatic browning) ได้แก่ polyphenol oxidase และ peroxidase ซึ่งมักพบในผักและผลไม้ (Ioannou and Ghoul, 2013) จากการศึกษาของเย็นจิตต์ และคณะ (ม.ป.ป.) รายงานว่าลองกองเกิดการเน่าของผลมากขึ้นเมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 7 วัน และที่อุณหภูมิ 15 °C เกิดการเน่ามากกว่าที่ 18 °C เนื่องจากที่อุณหภูมิต่ำ ลองกองเกิดอาการสะท้านหนาว (chilling injury) โดยทำให้เกิดความผิดปกติทางสรีรวิทยา ทำให้เซลล์เสื่อมสภาพ และง่ายต่อการเข้าทำลายของจุลินทรีย์



ภาพที่ 26 ร้อยละของการเกิดโรคผลเน่าของลองกองเมื่อบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง (30 °C)

* Bar represent standard deviation of three replications

6. สรุปผลการทดลอง

เอนไซม์ไคตินเนสที่ผลิตได้โดยราแมลง *Metarhizium guizhouense* PSUM04 ที่ใช้ไคตินจากเปลือกกุ้งและกระดองปู เป็นวัตถุดิบ สามารถยับยั้งการเจริญของรา *Botrytis* sp., *Fusarium* sp. และ *Pestalotiopsis* sp. ที่เป็นสาเหตุโรคผลเน่า หลังการเก็บเกี่ยวของลองกองบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อได้ และสปอร์แขวนลอยของ *M. guizhouense* PSUM04 ยังกระตุ้นให้ผลลองกองสร้าง PR protein ชนิดไคตินเนส และ บีตา-1,3-กลูคาเนส ที่สามารถยับยั้งการเจริญของราก่อโรคผลเน่าบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อได้เช่นกัน นอกจากนี้การใช้สารละลายเอนไซม์ไคตินเนสพ่นบนผลลองกอง สามารถชะลอการเกิดโรคผลเน่าเนื่องจากเชื้อรา *Botrytis* sp. ได้ 48.8 % และชะลอการเกิดผลเน่าเนื่องจากรา *Pestalotiopsis* sp. ได้ 24.3% เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ($p < 0.05$) แต่สารละลายเอนไซม์ไคตินเนสไม่สามารถชะลอการเกิดโรคผลเน่าที่เกิดจากเชื้อรา *Fusarium* sp. ได้ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ($p > 0.05$) เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (30 °C) เป็นเวลา 7 วัน และทั้งนี้การใช้เอนไซม์ไคตินเนสสกัดหยาบในการควบคุมโรคผลเน่าลองกองยังได้ผลลัพธ์ที่ไม่ดีเท่าที่ควร เมื่อเปรียบเทียบกับสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *M. guizhouense* PSUM04 และสารกำจัดเชื้อรา

7. เอกสารอ้างอิง

- กรมวิชาการเกษตร (2556). โรคผลไม้หลังการเก็บเกี่ยว. (ระบบออนไลน์) ที่มา <http://www.doa.go.th/pprdo/download/text2.pdf>. (23 กุมภาพันธ์ 2557).
- ประพันธ์ โนระดี (2555). การค้าสินค้าประมงระหว่างประเทศ. รายงานของกลุ่มวิเคราะห์การค้าสินค้าประมงระหว่างประเทศ กองประมงต่างประเทศ กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ (ระบบออนไลน์) ที่มา <http://www.fisheries.go.th/foreign> (20 กุมภาพันธ์ 2557).
- เย็นจิตต์ ปิยะแสงทอง สุจริต ส่วนไพโรจน์ ปิยะ ผกามาศ และชุติมา รื่นสำราญ. (ม.ป.ป.). อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บรักษา ลองกอง (ระบบออนไลน์) ที่มา: <http://www.lib.ku.ac.th/KUCONF/KC3501004.pdf> (12 สิงหาคม 2560).
- Abirami, S., Ronald, J., Kannan, M., Ranjit Singh, A.J.A. (2012). Bioconversion of shrimp shell waste by *Bacillus licheniformis* for the production of antifungal chitinase enzyme. *Res. J. Phamaceu. Biol. Chem. Sci.* 3: 790-796.
- Akay, K.U. (2007). A note on model selection in mixture experiments. *J. Math. Stat.* 3: 93-99.
- Anitha, A., Rabeeth, M. (2010). Degradation of fungal cell walls of phytopathogenic fungi by lytic enzyme of *Streptomyces griseus*. *Afr. J. Plant Sci.* 4: 61-66.
- Barreto, C.C., Staats, C.C., Achrank, A., Vainstein, M.H. (2004). Distribution of chitinase in the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and effect of N-acetylglucosamine in protein secretion. *Curr. Microbiol.* 48: 102-107.
- Boucias, D.G., Pendland, J.C. (1998). Principle of Insect Pathology. Kluwer Academic Publishers, Boston, USA.
- Chaiharn, M., Lumyoung, S., Hasan, N., Plikomol, A. (2012). Solid-state cultivation of *Bacillus thuringiensis* R176 with shrimp shells and rice straw as a substrate for chitinase production. *Ann. Microbiol.* (Published online)
- Chairin, T., Nitheranont, T., Watanabe, A., Asada, Y., Khanongnuch, C., Lumyong, S. (2014). Purification and characterization of the extracellular laccase produced by *Trametes polyzona* WR710-1 under solid-state fermentation. *J. Basic Microbiol.* 54: 35-43.
- Chan, Z., Tian, S. (2005). Induction of H₂O₂-metabolizing enzymes and total protein synthesis by antagonistic yeast and salicylic acid in harvested sweet cherry fruit. *Postharvest Biol. Tec.* 39: 314-320.
- Chang, W.T., Chen, C.S., Wang, S.L. (2003). An antifungal chitinase produced by *Bacillus cereus* with shrimp and crab shell powder as a carbon source. *Current Microb.* 47: 102-108.
- Chang, W.T., Chen, M.L., Wang, S.L. (2010). An antifungal chitinase produced by *Bacillus subtilis* using chitin waste as a carbon source. *World J Microbiol. Biotechnol.* 26: 945-950.
- Cheba, B.A., Zaghoul, T.I., El-Mahdy, A.R., El-Massry, M.H. (2016). Effect of pH and temperature on *Bacillus* sp. R2 chitinase activity and stability. *Procedia Tech.* 22: 471-477.
- Coates, L.M., Sangchote, S., Johnson, G.I., Sittigul, C. (2003). Diseases of Longan, Lychee and Rambutan. in Diseases of tropical fruit crops. R. C. Ploetz (Ed.) CABI Publishig, Cambridge, USA. 527 pp.
- Cohen-Kupiec, R., Chet, I. (1998). The molecular biology of chitin digestion. *Curr. Opin. Biotechnol.* 9: 270-277.

- Daulagala, P.W.H.K.P. (2014). Expression of chitinase with antifungal activities in ripening banana fruit. *Trop. Plant Res.* 1, 72-79.
- de Carolina Sánchez-Pérez, L., Barranco-Florido, J.E., Rodríguez-Navarro, S., Cervantes-Mayagoitia, J.F., Ramos-López, M.Á. (2014). Enzymes of entomopathogenic fungi, advances and insights. *Adv. Enzyme Res.* 2: 65-76.
- El-Katatny, M.H., Emam A.S. (2012). Control of postharvest tomato rot by spore suspension and antifungal metabolites of *Trichoderma harzianum*. *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci.* 1: 1505-1528.
- Gomaa, E.Z. (2012). Chitinase production by *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus licheniformis*: their potential in antifungal. *Biocontrol. J. Microbiol.* 50: 103-111.
- Graminha, E.B.N., Goncalves, A.Z.L., Pirota, R.D.P.B., Balsalobre, M.A.A., Da Silva, R., Gomes, E. (2008). Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. *Animal Feed Sci. Tech.* 144: 1-22.
- Hammami, I., Siala, R., Jridi, M., Ktari, N., Nasri, M., Triki, M.A. (2010). Partial purification and characterization of chIO8, a novel antifungal chitinase produced by *Bacillus cereus* IO8. *J. Applied Microbiol.* 115: 358-366.
- Hu, G., St.Leger, R. (2002). Field studies using a recombinant mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) reveal that it is rhizosphere competent. *Appl. Environ. Microb.* 68: 6383-6387.
- Inkha, S., Boonyakiat D. (2010). Induction of resistance to *Penicillium digitatum* in tangerine fruit cv.Sai Num Phung flavedo by hot water treatment. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 32: 445-451.
- Ioannou, I., Ghoul, M. (2013). Prevention of enzymatic browning in fruit and vegetables. *Euro. Sci. J.* 9: 310-341.
- Kaesorn, S., Sangchote, S. (2007). Postharvest diseases of longkong (*Aglaia dookkoo* Griff.) and effect of preharvest chemicals and biofungicide spray on the diseases. *Warasan Witthayasat Kaset:* 68-71.
- Keith, L.M. (2008). First report of *Pestalotopsis virgatula* causing pestalotiopsis fruit rot on rambutan in Hawaii. *Plant Dis.* 92: 835.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.
- Leger, R.J. ST., Joshi, L., Bidochka, M.L., Rizzo, N.W., Roberts, D.W. (1996). Characterization and ultrastructural localization of chitinases from *Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviride*, and *Beauveria bassiana* during fungal invasion of host (*Manduca sexta*) cuticle. *Appl. Environ. Microb.* 62: 907-912.
- Lim, T.-K., Sangchote, S. (2003). Diseases of durian. In *Diseases of tropical fruit crops*. R. C. Ploetz (Ed.) CABI Publishig, Cambridge, USA. 241-251.
- Maharachchikumbura, S.S.N., Guo, L.D., Chukeatirote, E., McKenzie, E.H.C., Hyde, K.D. (2013). A destructive new disease of *Syzygium samarangense* in Thailand caused by the new species *Pestalotopsis samarangensis*. *Trop. Plant Pathol.* 38: 227-235.
- Matsumoto, K.S. (2006). Fungal chitinase. In *Advances in Agricultural and Food Biotechnology*. Guevara-González, R.G. and Torres-Pacheco, I. (Ed.). Research Signpost. Kerala, India. pp. 289-304.

- Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31: 426-428.
- Muzzarelli, R.A.A. (1997). Some modified chitosans and their niche applications. *in* Chitin Handbook. R.A.A. Muzzarelli and M.G. Peter (Eds.). European Chitin Society, Italy. 47-52.
- Neeraja, C., Anil K., Purushotham, P., Suma, K., Sarma P.V.S.R.N., Moerschbacher, B.M., Podile, A.R. (2010). Biotechnological approaches to develop bacterial chitinase as a bioshield against fungal diseases of plants. *Cri. Rev. Biotechnol.* 30: 231-241.
- Oberoi, H.J., Chavan, Y., Bansai, S. Dhillon, G.S. (2010). Production of cellulase through solid state fermentation using kinnow pulp as a major substrate. *Food Bioproc. Technol.* 3: 528-536.
- Porat, R., Lers, A., Dori, S., Cohen, L., Weiss, B., Daus, A. Wilson, C.L., Droby, S. (1999). Induction of chitinase and β -1,3-endoglucanase proteins by UV irradiation and wounding in grapefruit peel tissue. *Phytoparasitica* 27: 233-238.
- Roberts, W.K. and Selitrennikoff, C.P. (1988). Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity. *J. Gen. Microbiol.* 134: 169-176.
- Ruiz-Harrera, J. 1991. Fungal cell wall: Structure, Synthesis and Assembly. CRC Press, Boca Raton.
- Rustiguel, C.B., Jorge, J.A., Guimarães, L.H.S. (2012). Optimization of the chitinase production by different *Metarhizium anisopliae* strains under solid-state fermentation with silkworm Chrysalis as substrate using CCRD. *Adv. Microb.* 2: 268-276.
- Sapii, A.T., Norlia, Y., Muda, P., Lim, T.S. 2000. Postharvest quality changes in dokong (*Lansium domesticum* Corr.) harvested at different stages of ripeness. *In* Quality Assurance in Agricultural Produce. Johnson, G.I., To L.V., Duc, N.D., Webb, M.C. (Eds.) ACIAR Proceeding, Australia. 201-205.
- Sathish, T., Lakshmi, G.S., Rao, Ch.S., Brahmaiah, P., Prakasham, R.S. (2008). Mixture design as first step for improved glutaminase production in solid –state fermentation by isolated *Bacillus* sp. RSP-GLU. *Lett. Appl. Microbiol.* 47: 256-262.
- Sivapaian, A., Metussin, R., Hamdan, F., Zain, R.M. (1998). Fungi associated with postharvest fruit rots of *Durio graveolens* and *D. kutejensis* in Brunei Darussalam. *Aus. Plant Path.* 27: 274-277.
- Shaikh, S.A., Deshpande, M.V. (1993). Chitinolytic enzymes: their contribution to basic and applied research. *World J. Microb. Biotechnol.* 9: 468-475.
- Sudhakar, P., Nagarajan, P. (2010). Production of chitinase by solid state fermentation from rice bran. *Inter J. Environ. Sci. Dev.* 1: 435-440.
- Suresh, P.V., Chandrasekaran, M. (1998). Utilization of prawn waste for chitinase production by the marine fungus *Beauveria bassiana* by solid state fermentation. *World J. Microb. Biotechnol.* 14: 655-660.
- Synowiecki, J., Al-Khateeb, N.A. (2003). Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 43: 145-171.
- Thaochan, N., Chandrapatya, A. (2016). The phenotypic and metabolic properties of *Metarhizium guizhouense* on *Corcyra cephalonica*. *Mycosphere.* 7: 214-225.
- Timmer, L.W., Garnsey, S.M., Broadbent, P. (2003). Diseases of citrus. *In* Diseases of Tropical Fruit Crops. R.C. Ploetz (Ed.). CABI Publishig, Cambridge, USA. 163-195.

- Ulhoa, C.J., Peberdy, J.F. (1991). Purification and characterization of an extracellular chitinase from *Trichoderma harzianum*. *Current Microb.* 23: 285-289.
- Wang, S.L., Yieh, T.C., Shih, I.L. (1999). Production of antifungal compounds by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 using shrimp and crab shell powder as a carbon source. *Enzyme Microb. Technol.* 25:142-148.
- Wang, S.L., Lin, T.Y., Yen, Y.H., Liao, H.F., Chen, Y.J. (2006). Bioconversion of shellfish chitin wastes for the production of *Bacillus subtilis* W-118 chitinase. *Carbohydrate Res.* 341: 2507-2515.
- Wang, K., Yan, P.-S., Cao, L.-X., Ding, Q.-L., Shao, C., Zhao T.-F. 2013. Potential of chitinolytic *Serratia marcescens* strain JPP1 for biological control of *Aspergillus parasiticus* and aflatoxin. *Biomed Res. Inter.* 1-7.
- Yumaliza, I., Aryantha, N.P., Esyanti, R.R., Susanto, A. (2014). Antagonistic activity assessment of fungal endophytes from oil palm tissues against *Ganoderma boninense* Pat. *Plant Patho. J.* 13: 257-267.
- Zheng, Q., Song, J., Doncaster, K., Rowland, E., Byers, D. (2007). Qualitative and quantitative evaluation of protocols for apple and strawberry fruit suitable for two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry analysis. *J. Agric. Food Chem.* 55: 1663-1673.
- Zou, Z., Nonogaki, H., Welbaum, G.E. (2002). A gel diffusion assay for visualization and quantification of chitinase activity. *Molecular Biotechnology* 22: 19-23.

8. ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะสำหรับการวิจัยต่อไป

ควรศึกษาโอกาสในการเพิ่มปริมาณสารละลายเอนไซม์ที่ผลิตได้จากเชื้อราชนิดนี้ในระดับที่ใหญ่ขึ้น เช่น การออกแบบถังหมัก และปัจจัยอื่นๆ ควรศึกษาการใช้เอนไซม์ในการควบคุมโรคผลเน่าของลองกอง ร่วมกับการปรับสภาพการเก็บรักษา เช่น การปรับปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ การใช้พลาสติกหุ้ม และอุณหภูมิในการเก็บรักษา เป็นต้น ควรขยายการทดสอบในสภาพแปลงเกษตรกร นำไปทดสอบกับเชื้อก่อโรคผลเน่าที่สำคัญ และร้านค้าจำหน่ายผลผลิต รวมถึงศึกษาความคุ้มค่าในการนำไปใช้ประโยชน์

9. ภาคผนวก

บทความที่ตีพิมพ์

ชื่อเรื่อง Induction of defense responses in longkong fruit (*Aglaia dookkoo* Griff.) against fruit rot fungi by *Metarhizium guizhouense*

ชื่อวารสาร Biological Control

ปีที่ 111

ปี 2017

หน้า 40-44

ภาคผนวก



Induction of defense responses in longkong fruit (*Aglaia dookkoo* Griff.) against fruit rot fungi by *Metarhizium guizhouense*



Thanunchanok Chairin^{a,b,*}, Vasun Petcharat^a

^a Department of Pest Management, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, 15 Kanjanavanich Rd., Hat Yai, Songkhla 90110, Thailand

^b Pest Management Biotechnology and Plant Physiology Laboratory, Prince of Songkla University, 15 Kanjanavanich Rd., Hat Yai, Songkhla 90110, Thailand

ARTICLE INFO

Keywords:

Metarhizium guizhouense
Plant defense response
Antifungal
 β -1,3-glucanase
Chitinase

ABSTRACT

The defense responses of longkong fruit were induced by an entomopathogenic fungus, *Metarhizium guizhouense*. The longkong fruits were dipped in a spore suspension of *M. guizhouense* PSUM04 at concentration of 10^4 spore mL^{-1} for 5 s, then an enzyme assay, a protein assay and polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) were done. It was found that the longkong fruit presented small necrotic spots on their peels within 24 h. β -1,3-glucanase and chitinase were detected in peel extracts at 1.33 ± 0.09 and 0.12 ± 0.004 U mL^{-1} , respectively. The sodium dodecyl sulphate (SDS)-PAGE showed protein bands that emerged after the fungal treatment when compared to untreated control. These proteins were a 25–27 kDa group of chitinase isoforms, and β -1,3-glucanase at 43 kDa. From gel diffusion method, crude extracted from the fruit peel inhibited the mycelial growth of *Botrytis* sp. and *Fusarium* sp. as 34.9 ± 3.1 and $29.3 \pm 5.0\%$, respectively. Moreover, the observation from scanning electron microscope (SEM) showed abnormal shapes, twisting and cracking in both fungal mycelia and less dense mycelial growth for *Fusarium* sp. Thus, *M. guizhouense* PSUM04 was not only a bio insecticide but it was also the biotic inducer of plant defense responses against pathogenic fungi.

1. Introduction

Longkong (*Aglaia dookkoo* Griff.) is an economically important tropical fruit in southern Thailand. There is a high demand of longkong because this fruit is juicy and has a pleasant taste (Sapit et al., 2000). Longkong contains a variety of nutrients, including high levels of antioxidants, carbohydrates, vitamins and minerals, while the amounts of protein and fat are low (Ketsa and Paul, 2008). However, post-harvest diseases negatively impacts longkong fruit quantity and quality. Fruit rot is one of the most serious postharvest diseases of many fruits, with pathogen infections occurring throughout postharvest processing until consumption. Most fruit rots are caused by fungi, follow by bacteria, and occasionally viruses. The fruit which drop or without stem cause fruit rot rapidly during storage. Light-brown to dark-brown lesion develop on fruit after that white or grayish fungal mycelia cover the fruit rapidly. As the fungi spread, a semisoft decay occur, resulting in large rotted areas over time. The fungal pathogens of fruit rot such as in the genera *Aspergillus*, *Botrytis*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Lasiodiplodia* and *Phomopsis* (Coates et al., 2003; Lim and Sangchote, 2003).

The plant defense responses include three main pathways: (a) hypersensitive response (HR), (b) systemic acquired resistance (SAR) that includes induction of pathogenesis-related (PR) proteins and (c)

induced systemic resistance (ISR) (Shoresh et al., 2010). Chitinase and β -1,3-glucanase are known PR proteins that hydrolyze the major components, chitin and β -1,3-glucan, of fungal cell walls and inhibit fungal growth (Droby et al., 2011). It has been suggested that chitinase and β -1,3-glucanase may function in defense against fungal pathogens such as *Botrytis cinerea* (Daulagala, 2014), *Colletotrichum gloeosporioides* (Ali et al., 2014), *Penicillium expansum* (Chan and Tian, 2005), *P. digitatum* (Inkha and Boonyakiat, 2010) and *Phomopsis asparagi* (Lu et al., 2008).

The entomopathogenic fungus *Metarhizium guizhouense* has potential to control various insect pests of plants and livestock (Boucias and Pendland, 1998). Not only it is an insect pathogen but some species of *Metarhizium* are also associated with plants that the fungus colonize the plant rhizosphere, endophytes, and possibly even plant-growth-promoting agents (Hu and St. Leger, 2002). Some studies have shown that *M. guizhouense* can produce chitinase (Thaochan and Chandrapatya, 2016). However, there is no prior report on using *M. guizhouense* as a biotic agent to induce the defense responses in plants.

The biochemical defended response in plants have been widely studied in leaves and roots, but only in a few cases in ripening fruits (Prusky et al., 2013). Thus, the purpose of this research was to investigate the induction of plant defense responses in postharvest

* Corresponding author at: Department of Pest Management, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, 15 Kanjanavanich Rd., Hat Yai, Songkhla 90110, Thailand.
E-mail address: thanunchanok.c@psu.ac.th (T. Chairin).

longkong fruit by the entomopathogenic fungus, *M. guizhouense* PSUM04 and their antifungal activity against postharvest fruit rot fungi.

2. Materials and methods

2.1. Fungal cultivation

M. guizhouense PSUM04 from National Biological Control Research Center, Southern Region, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai, Thailand (Thaochan and Chandrapatya, 2016), was selected for use as the biotic inducer in this study. *M. guizhouense* PSUM04 was cultured by solid state cultivation, modified from the method of Thongkeawyan and Chairin (2016). Three mycelial plugs of 7-day-old *M. guizhouense* PSUM04 on potato dextrose agar (PDA) were transferred to colloidal chitin media and incubated at 30 °C, under static conditions for 10 days. Spores of the fungus were suspended in 20 mL of 50 mM potassium phosphate buffer (KPB) at pH 7.0, and this suspension was used as the spore suspension.

Fruit rot pathogens, *Botrytis* sp. and *Fusarium* sp., isolated from postharvest rotting longkong fruit collected from local orchards in Phatthalung, Nakhon Si Thammarat and Songkhla provinces, Thailand. Pure cultures of fungi were obtained as stock cultures and established on PDA (incubated at 30 °C). The 5-day-old *Botrytis* sp. and *Fusarium* sp. were used as the fungal pathogens.

2.2. Fruit preparation

Longkong fruit were harvested at their mature stage from local orchards in Phatthalung, Nakhon Si Thammarat and Songkhla provinces. Healthy longkong fruit were surfaced disinfected with 2% of NaOCl for 3 min and rinsed with distilled water. The fruit were dipped for 5 s in the spore suspension of *M. guizhouense* PSUM04, at a concentration of 1×10^4 spores mL^{-1} , containing 0.05% of tween 80, then washed with distilled water and air-dried at room temperature. The enzyme activities and SDS – PAGE banding of fungal-treated longkong were compared with untreated longkong fruit (control).

2.3. Enzyme assays

Chitinase and β -1,3-glucanase activity were measured using colloidal chitin and laminarin as the substrates, respectively following the 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) method (Miller, 1959). The reaction mixture contained 250 μL of crude sample and 1% (w/v) substrate in 250 μL of 50 mM KPB pH 7.0 for colloidal chitin and 50 mM acetate buffer pH 5.5 for laminarin and incubated for 30 min in 50 °C water bath. Reducing sugar released in mixtures were determined by recording the absorbance at 575 nm for chitinase and 550 nm for β -1,3-glucanase. One unit (U) of chitinase activity was defined as releasing 1 μmol of N-acetyl-D-glucosamine from the substrate per min and one unit of β -1,3-glucanase activity was defined as releasing 1 μmol of glucose from the laminarin per min.

2.4. Protein extraction

The extraction of total proteins was performed according to the method of Zheng et al. (2007) with slight modifications. The longkong peels were ground in a small mortar and the sample was suspended in 12 mL of SDS extraction buffer, containing 0.5% (w/v) SDS, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA and 464 mL of water. The suspended sample was incubated at 90–94 °C for 8 min and centrifuged at 8000g at 4 °C for 15 min. After that the resulting supernatant was mixed with 25 mL of 13% TCA in acetone solution, containing 10% (w/v) TCA and 20 mM DTT in 100% ice-cold acetone and 28 mM mercaptoethanol in a ratio of 1/10 (w/v). The solution was incubated at –20 °C for 2 h and the proteins were precipitated by centrifugation at 14,000g, at 4 °C for 15 min. After 2 washes with 100% ice-cold acetone, the pellet was air-

dried and re-suspended in SDS-PAGE sample buffer.

2.5. Protein assay

The total protein concentration was determined according to the procedure of Bradford (1976) using bovine serum albumin (BSA) as standard. The reaction mixture containing 0.1 mL of sample and 5 mL of protein reagent (Coomassie Brilliant Blue G-250 dissolved in 95% ethanol and 85% (w/v) of phosphoric acid added to this). The developed color was measured at 595 nm after 5 min incubation.

2.6. Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)

The apparent molecular masses of proteins were determined by SDS – PAGE analysis, both for healthy fruit and treated fruit that were compared. The SDS-PAGE was carried out on mini-gels (12% separating gel and 4% stacking gel) according to the procedure of Laemmli (1970), with marker ladder of proteins from 250 to 10 kDa (BioLabs Inc.). The samples were loaded at either end of the gel, and electrophoresis was performed at 100 V for the stacking gel and at 120 V for the separating gel.

2.7. Antifungal activity assay

Crude enzyme was extracted from longkong fruit peel and performed to assess the potential control in laboratory scale against fruit rot pathogens, *Botrytis* sp. and *Fusarium* sp. Gel diffusion method were used to investigate the mycelial growth inhibition on PDA by crude enzyme. There were 3 treatments comprised distilled water (control), extraction buffer and crude enzyme extracted from fruit peel. Tested plates were incubated at 30 °C for 4 days. The experimental design used was completely randomized design (CRD) with 3 replicates and the experiment was repeated 3 times. Growth inhibition was calculated by measuring the clearing zone between fungal colonies and crude enzyme well by using the formula:

$$\text{Percentage inhibition} = \frac{C-T}{C} \times 100$$

where C is the radial growth of fungus from the center to the control well and T is the radial growth of fungus from the center to the crude enzyme well.

2.8. Scanning electron microscope (SEM) observations

Mycelial plug samples were evaluated the effect of antifungal activity on mycelial morphological change. These plugs were after 1 h incubation at 37 °C with crude extracted from treated longkong fruit peel and control plugs were incubated with autoclaved distilled water. The mycelial plugs were fixed in 0.5 ml of 3% glutaraldehyde for 24 h at 4 °C and then dehydrated sequentially in 30, 50, 60, 70, 80, 90 and finally in 100% ethanol (three times) for 15 min at each concentration. The dehydrated samples were dried with critical point drying (CPD) method, coated with gold and observed with a SEM (JSM-5800 LV, JEOL, USA) at Scientific Equipment Center, Prince of Songkla University, Hat Yai, Thailand.

2.9. Statistical analysis

The results were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) and Duncan's multiple range test ($p < 0.05$) using SPSS version 11.5. All tests were carried out in triplicate.

3. Results and discussion

The plant defense responses include three main pathways: HR, SAR and ISR (Shoresh et al., 2010). The mechanism of entomopathogenic

Table 1
Enzyme activities of longkong fruit peel extracts at 24 and 48 h post inoculation.

Sample	Chitinase (U mL ⁻¹) ^a		β -1,3-glucanase (U mL ⁻¹) ^a	
	24 h	48 h	24 h	48 h
Control	0.00 ± 0.00	0.02 ± 0.001	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Inoculated	0.12 ± 0.004	0.17 ± 0.02	1.33 ± 0.09	1.51 ± 0.12

^a Mean ± Standard deviation (3 replications).

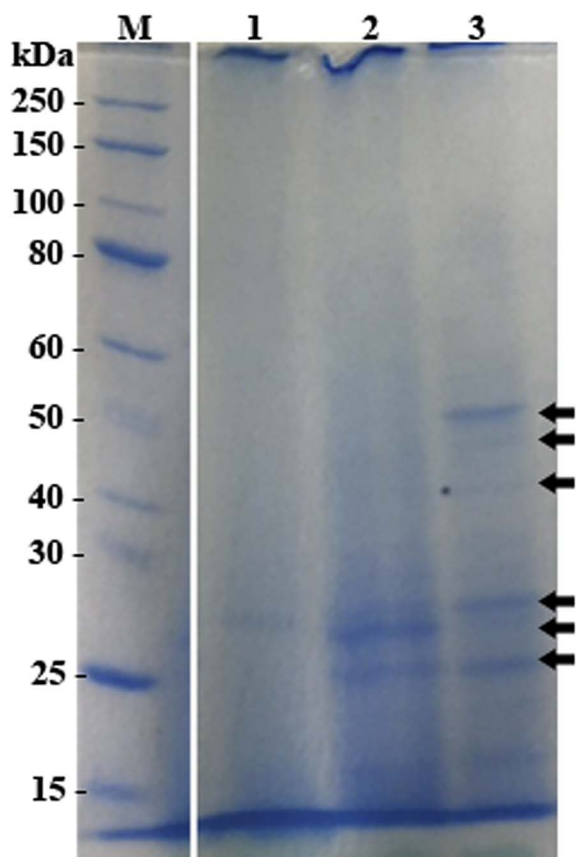


Fig. 1. Protein bands of SDS-PAGE from longkong peel extracts after *Metarhizium guizhouense* PSUM04 treatment at 24 h (lane 2) and at 48 h (lane 3), along with untreated control (lane 1). Lane M provides a calibration “ladder” formed by standard proteins of known molecular weights.

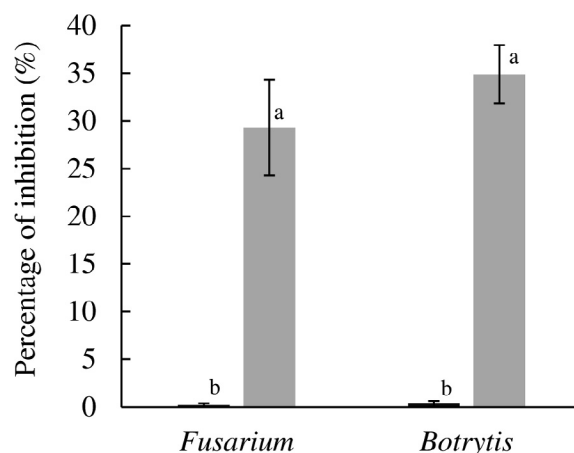


Fig. 3. Mycelial growth inhibition of *Fusarium* sp. and *Botrytis* sp. by crude extracted from longkong fruit peel (gray bar) and extraction buffer, 50 mM potassium phosphate buffer pH 7.0 (black bar). Bar represent standard deviation of three replications and the same letter are not significantly different ($p > 0.05$) according to Duncan's multiple range test.

fungus, *M. guizhouense* PSUM04 to trigger plant defense responses was not completely understood. However, in this study presented some of the defense response of longkong fruit. The fruit presented small HR or necrotic spots on the peel surfaces within 24 h after treatment with a spore suspension of *M. guizhouense* PSUM04. The necrotic spots did not invade through the peel into the fruit. The necrotic tissue had associated PR proteins production: the chitinase activity was 0.12 ± 0.004 U mL⁻¹ at 24 h and slightly increased to 0.17 ± 0.02 U mL⁻¹ at 48 h after inoculation. The activities of β -1,3-glucanase were 1.33 ± 0.09 and 1.51 ± 0.12 U mL⁻¹ at 24 and 48 h, respectively (Table 1). In observations of a similar kind by Brown and Swinburne (1980), the banana fruit responded to *Colletotrichum musae* by producing antifungal compounds that were isolated from the necrotic tissues within the peels. The β -1,3-glucanase and chitinase were detectable on the first day after fungal treatment. Ali et al. (2014) found that the Dragon fruit plant could produce β -1,3-glucanase and chitinase on the first day after *C. gloeosporioides* inoculation, with activities 0.6 and 0.1 U g⁻¹ (fresh weight), respectively, and the enzyme activities increased to maximum on day 18.

The proteins in the samples were separated by one-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and stained with Coomassie brilliant blue R-250, to observe protein bands. The SDS-PAGE analysis presented clear differences in the expression of major proteins between the fungal-treated longkong and the untreated control. The protein bands were assigned molecular weights in the 25–50 kDa range, based on a molecular weight standard (Fig. 1). It has been reported that the

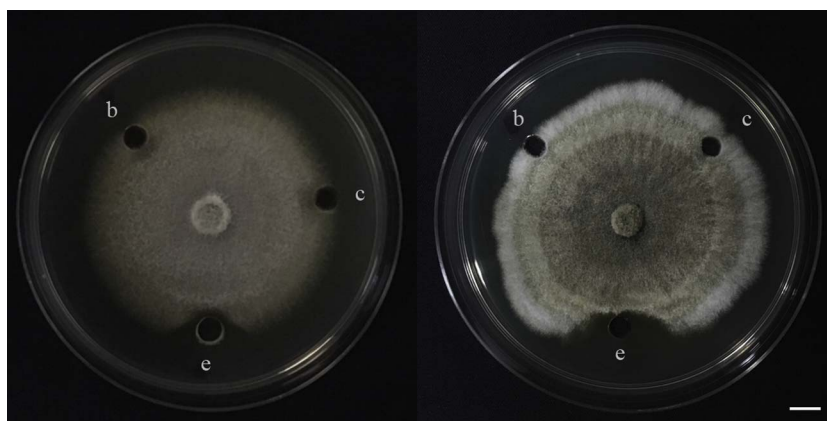


Fig. 2. Inhibition zone of crude enzyme from longkong fruit peel against mycelial growth of *Botrytis* sp. (right) and *Fusarium* sp. (left), where b means the well filled with 50 mM potassium phosphate buffer pH 7.0, c means the well filled with distilled water (control), and e means the well filled with crude enzyme. Bar = 1 cm.

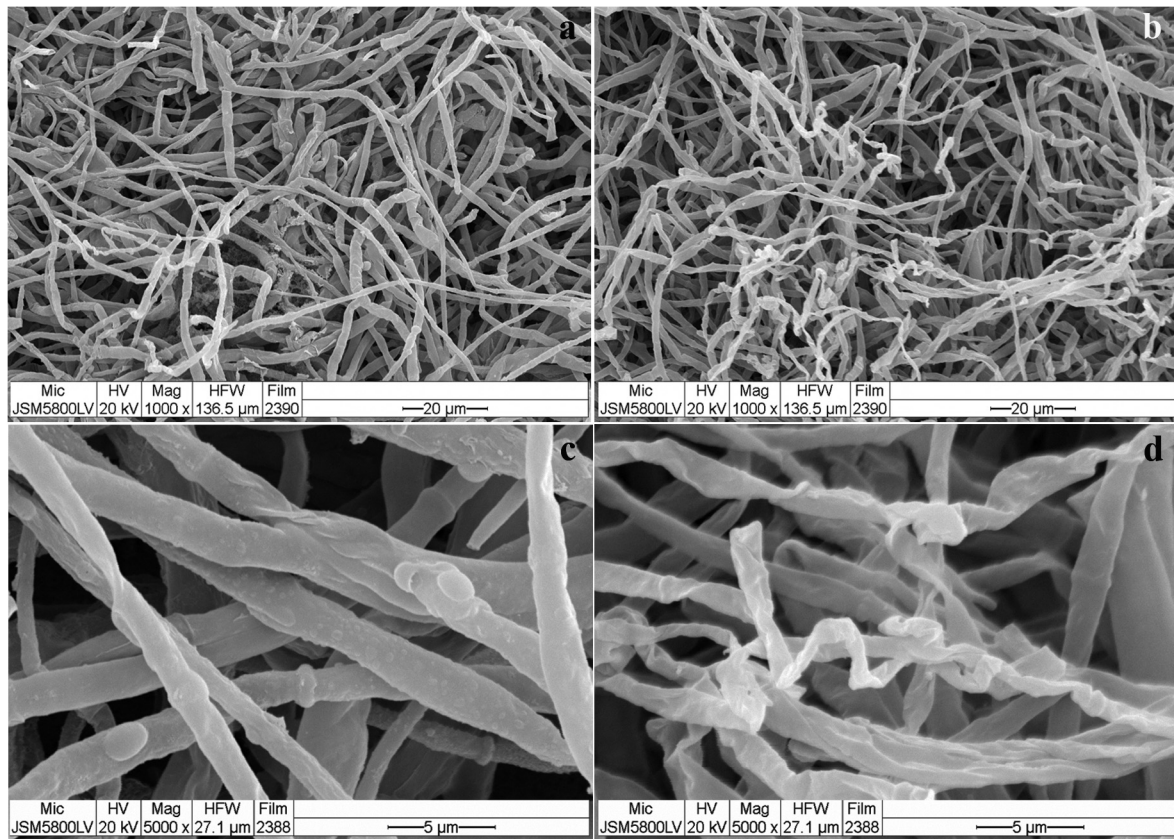


Fig. 4. Scanning electron microscope micrographs showing the mycelia of *Botrytis* sp.; (a), (c) treated with distilled water (control) and (b), (d) treated with longkong fruit peel crude extract.

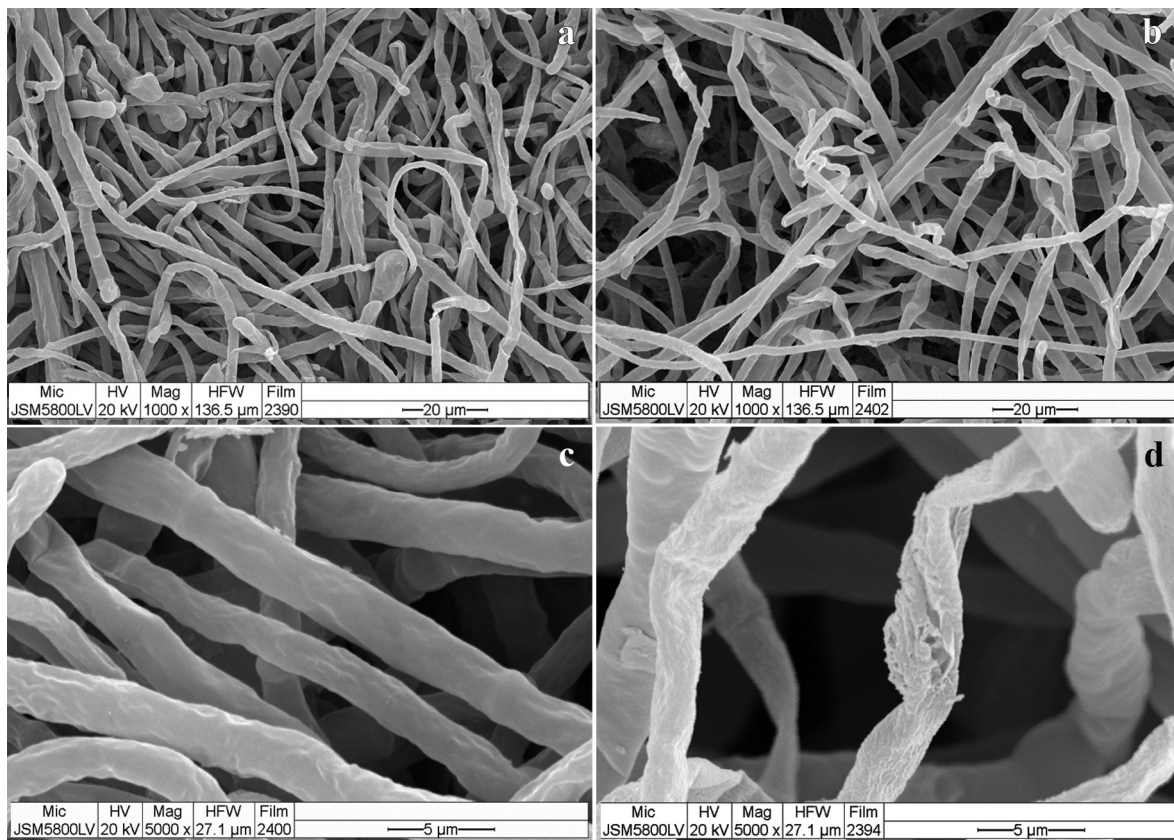


Fig. 5. Scanning electron microscope micrographs showing the mycelia of *Fusarium* sp.; (a), (c) treated with distilled water (control) and (b), (d) treated with longkong fruit peel crude extract.

25–27 kDa proteins are a group of chitinase isoforms (Punja and Zhang, 1993). In similar observations by Daulagala (2014), chitinase had apparent 26 kDa molecular mass when detected in banana pulp extracts. The 43 kDa protein was tentatively identified as β -1,3-glucanase isoform, in agreement with Porat et al. (1999) that identified the protein band at 43 kDa as β -1,3-endoglucanase, from grapefruit peel tissue subjected to SDS-PAGE.

The PR proteins, β -1,3-glucanase and chitinase have been found in some fruits, such as banana (Daulagala, 2014), grapefruit (Porat et al., 1999), orange (Inkha and Boonyakiat, 2010) and papaya (Chen et al., 2007). Although, this study is the first to report PR protein induction in longkong fruit. The induction of PR proteins helps control plant diseases (Ali et al., 2014; Inkha and Boonyakiat, 2010). Chan and Tian (2005) reported that the protein content of sweet cherry fruit plays a role in its resistance against postharvest blue mold. In this study, PR protein, β -1,3-glucanase and chitinase extracted from longkong fruit peel presented the antifungal potential, exhibited the inhibition zone against *Botrytis* sp. and *Fusarium* sp. on PDA plate. While, the fungal mycelia growth normally through the wells filled with distilled water and extraction buffer (50 mM KPB) control (Fig. 2). The percentage inhibition were 34.9 ± 3.1 and $29.3 \pm 5.0\%$ for *Botrytis* sp. and *Fusarium* sp., respectively. The inhibition rate were significantly different ($p < 0.05$) between extraction buffer control and crude which contained PR proteins (Fig. 3).

Cheng et al. (2009) presented that most pathogenic fungi have cell walls composed of complex polymer of glucans, where chitin acts as a structural backbone arranged in regularly ordered layers. Cell walls of filamentous fungi consist of up to 20% or more of chitin, which can be found throughout the whole cell wall of hyphae (Ruiz-Herrera, 1991). Thus, breakdown of the fungal cell wall plays a role to inhibit the pathogenic fungal growth. The observation from SEM in this study showed that crude extracted from the peel of *Metarhizium*-treated longkong contained the PR protein, β -1,3-glucanase and chitinase, caused morphological change of *Botrytis* sp. and *Fusarium* sp. mycelia. These observation showed abnormal shapes, twisting and cracking in both fungal mycelia (Figs. 4 and 5) and less dense mycelial growth for *Fusarium* sp. (Fig. 5b and d). Wang et al. (2013) presented the major damage of the mycelia and the spores of *Aspergillus parasiticus* caused by cultured with cell-free culture filtrate of *Serratia marcescens* which contained chitinase. In plant defense responses, the hyphal degradation or debris may related to the non-fungal hyphal recognition, which, in observations of a similar kind by Cortes et al. (1998), as suggested of the non-*Trichoderma* hyphal recognition would lead to the strong release of lytic enzymes such as β -1,3-glucanases and chitinases, resulting in the digestion of the major cell wall components.

From our preliminary test, spore suspension of *Metarhizium* and enzyme produced from *Metarhizium* under solid state cultivation could delayed rotting and browning of longkong fruit for 24 and 48 h, respectively (data not shown). Thus, *M. guizhouense* PSUM04 was not only a bio insecticide but it was also appear potential for biological control of postharvest disease in laboratory experiment and be the biotic inducer of plant defense responses against pathogenic fungi. Furthermore, the potential of *M. guizhouense* PSUM04 to control postharvest disease in the field need to be conducted.

4. Conclusions

Hypersensitive response and PR proteins production were induced by the entomopathogenic fungus, *M. guizhouense* PSUM04 in longkong fruit. Crude extracted from the peel of *Metarhizium*-treated longkong exhibited the antifungal activity against postharvest fruit rot fungi, *Botrytis* sp. and *Fusarium* sp.

Acknowledgment

This work was supported by the Research and Development Office,

Prince of Songkla University, Songkhla, Thailand [grant number NAT570507S]. Moreover, we are grateful to Associate Professor Dr. Seppo Karrila, Faculty of Science and Industrial Technology, Prince of Songkla University, Surat Thani Campus for helping to improve the draft manuscript.

References

- Ali, A., Zahid, N., Manickam, S., Siddiqui, Y., Alderson, P.G., Maqbool, M., 2014. Induction of lignin and pathogenesis related proteins in Dragon fruit plants in response to submicron chitosan dispersions. *Crop Protect.* 63, 83–88.
- Boucias, D.G., Pendland, J.C., 1998. *Principle of Insect Pathology*. Kluwer Academic Publishers, Boston, USA.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Brown, A.E., Swinburne, T.R., 1980. The resistance of immature banana fruits to anthracnose (*Colletotrichum musae* (Berk. and Curt.) Arx.). *J. Phytopathol.* 99, 70–80.
- Chan, Z., Tian, S., 2005. Induction of H₂O₂-metabolizing enzymes and total protein synthesis by antagonistic yeast and salicylic acid in harvested sweet cherry fruit. *Postharvest Biol. Tec.* 39, 314–320.
- Chen, Y., Hsu, L., Huang, I., Tsai, T., Lee, G., Shaw, J., 2007. Gene cloning and characterization of a novel recombinant antifungal chitinase from papaya (*Carica papaya*). *J. Agr. Food Chem.* 55, 714–722.
- Cheng, Y., Hong, T., Liu, C., Meng, M., 2009. Cloning and functional characterization of a complex endo- β -1,3-glucanase from *Paenibacillus* sp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81, 1051–1061.
- Coates, L.M., Sangchote, S., Johnson, G.L., Sittigul, C., 2003. Diseases of longan, lychee and rambutan. In: Ploetz, R.C. (Ed.), *Diseases of Tropical Fruit Crops*. CAB International, New York, USA, pp. 307–325.
- Cortes, C., Gutierrez, A., Olmedo, V., Inbar, J., Chet, I., Herrera-Estrella, A., 1998. The expression of genes involved in parasitism by *Trichoderma harzianum* is triggered by a diffusible factor. *Mol. Gen. Genet.* 260, 218–225.
- Daulagala, P.W.H.K.P., 2014. Expression of chitinase with antifungal activities in ripening banana fruit. *Trop. Plant Res.* 1, 72–79.
- Droby, S., Wisniewski, M., Benkeblia, N., 2011. Postharvest pathology of tropical and subtropical fruit and strategies for decay control. In: Yahia, E.M. (Ed.), *Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits*. Woodhead Publishing, Cambridge, UK, pp. 194–223.
- Hu, G., St. Leger, R., 2002. Field studies using a recombinant mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) reveal that it is rhizosphere competent. *Appl. Environ. Microb.* 68, 6383–6387.
- Inkha, S., Boonyakiat, D., 2010. Induction of resistance to *Penicillium digitatum* in tangerine fruit cv. Sai Num Phung flavedo by hot water treatment. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 32, 445–451.
- Ketsa, S., Paull, E.R., 2008. Meliaceae. In: Janick, J., Paull, E.R. (Eds.), *The Encyclopedia of Fruits and Nuts*. CAB International, New York, USA, pp. 468–472.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lim, T.-K., Sangchote, S., 2003. Diseases of durian. In: Ploetz, R.C. (Ed.), *Diseases of Tropical Fruit Crops*. CAB International, New York, USA, pp. 241–251.
- Lu, G., Jian, W., Zhang, J., Zhou, Y., Cao, J., 2008. Suppressive effect of silicon nutrient on *Phomopsis* stem blight development in Asparagus. *Hortic. Sci.* 43, 811–817.
- Miller, G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Biochem.* 31, 426–428.
- Porat, R., Lers, A., Dori, S., Cohen, L., Weiss, B., Daus, A., Wilson, C.L., Droby, S., 1999. Induction of chitinase and β -1,3-endoglucanase proteins by UV irradiation and wounding in grapefruit peel tissue. *Phytoparasitica* 27, 233–238.
- Prusky, D., Alkan, N., Mengiste, T., Fluhr, R., 2013. Quiescent and necrotrophic lifestyle choice during postharvest disease development. *Annu. Rev. Phytopathol.* 51, 155–176.
- Punja, Z.K., Zhang, Y., 1993. Plant chitinases and their roles in resistance to fungal diseases. *J. Nematol.* 25, 526–540.
- Ruiz-Herrera, J., 1991. *Fungal Cell Wall: Structure, Synthesis and Assembly*. CRC Press, Boca Raton.
- Sapit, A.T., Norlia, Y., Muda, P., Lin, T.S., 2000. Postharvest quality changes in dokong (*Lansium domesticum* Corr.) harvested at different stages of ripeness. In: Johnson, G.L., To, L.V., Duc, N.D., Webb, M.C. (Eds.), *Quality Assurance in Agricultural Produce*. ACIAR Proceeding, Australia, pp. 201–205.
- Shoresh, M., Harman, G.E., Mastouri, F., 2010. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annu. Rev. Phytopathol.* 48, 21–43.
- Thaochan, N., Chandrapatya, A., 2016. The phenotypic and metabolic properties of *Metarhizium guizhouense* on *Corcyra cephalonica*. *Mycosphere* 7, 214–225.
- Thongkeawyan, A., Chairin, T., 2016. Selection of carbon and nitrogen sources for protease production by *Metarhizium anisopliae* PSUM02 under solid state cultivation. *Khon Kaen Agric. J.* 44 (Suppl. 1), 924–929.
- Wang, K., Yan, P.-S., Cao, L.-X., Ding, Q.-L., Shao, C., Zhao, T.-f., 2013. Potential of chitinolytic *Serratia marcescens* strain JPP1 for biological control of *Aspergillus parasiticus* and aflatoxin. *Biomed Res. Inter.* 2013, 1–7.
- Zheng, Q., Song, J., Doncaster, K., Rowland, E., Byers, D., 2007. Qualitative and quantitative evaluation of protocols for apple and strawberry fruit suitable for two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry analysis. *J. Agric. Food Chem.* 55, 1663–1673.