รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ
การควบคุมโรคผลเน่าของลองกองหลังการเก็บเกี่ยว โดยใช้เอนไซม์ไคติเนสที่ผลิตโดยเชื้อรา *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. ธนัญชนก ไชยรินทร์

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินรายได้มหาวิทยาลัย ประเภททุนดรุณาจารย์มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
ประจำปีงบประมาณ 2/2557 รหัสโครงการ NAT570507S

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การควบคุมโรคผลเน่าของลองกองหลังการเก็บเกี่ยว โดยใช้เอนไซม์ไคติเนสที่ผลิตโดยเชื้อรา *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. ธนัญชนก ไชยรินทร์
ภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ

สารบัญ

รายการ	**หน้า**
รายการตาราง	ง
รายการภาพประกอบ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ซ
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 และปริมาณปัจจัยที่ใช้ ของสภาวะในการผลิตเอนไซม์ไคติเนสโดย *Metarhizium guizouense* PSUM04	8
2	การทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) ระดับในการทดลอง และปริมาณปัจจัยที่ใช้ ของปัจจัยในการใช้เอนไซม์ไคติเนสเพื่อควบคุมการเจริญของเชื้อราก่อโรคบนอาหารเลี้ยงเชื้อ	10
3	สถานที่เก็บตัวอย่างผลลองกอง และเชื้อราก่อโรคผลเน่าของลองกองที่พบในแต่ละพื้นที่	12
4	ดัชนีความหลากหลายของชนิดเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของลองกองในแต่ละพื้นที่เก็บตัวอย่าง	13
5	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของตัวแปร/ปัจจัย แบบ response surface quadratic model ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไคติเนส	17
6	กิจกรรมของเอนไซม์ของน้ำคั้นจากเปลือกของลองกองที่ถูกกระตุ้นด้วย *M. guizhouense* PSUM04	20
7	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของตัวแปร/ปัจจัย แบบ response surface quadratic model ที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Botrytis* sp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA	23
8	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของตัวแปร/ปัจจัย แบบ response surface quadratic model ที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Fusarium* sp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA	25
9	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของตัวแปร/ปัจจัย แบบ response surface quadratic model ที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA	27

รายการภาพประกอบ

ภาพที่		หน้า
1	ไคตินที่ผลิตเป็นการค้า (a) และ ไคตินที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้ (b)	6
2	รา *Botrytis* sp.; (a) โคโลนีอายุ 3 วัน บนอาหาร PDA (b) conidia บนก้าน conidiophore และ (c) conidia (bar = 10 µm)	14
3	รา *Fusarium* sp.; (a) โคโลนีอายุ 3 วัน บนอาหาร PDA (b) macroconidia บนก้าน conidiophore และ (c) microconidia และ macroconidia (bar = 40 µm)	14
4	รา *Pestalotiopsis* sp.; (a) โคโลนีอายุ 7 วัน บนอาหาร PDA (b) acervular conidiomata with young conidia และ (c) mature conidia (bar = 10 µm)	14
5	วงใส (clear zone) บนอาหาร colloidal chitin agar โดยเชื้อรา *Metarhizium guizhouense* PSUM04	15
6	ปัจจัยที่มีผลต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์ไคติเนส; (a) อุณหภูมิ (b) ระยะเวลาในการบ่ม (c) อัตราส่วนระหว่างของแข็งและของเหลว และ (d) pH	16
7	ความสัมพันธ์ของปัจจัยที่มีผลต่อค่าการทำงานของเอนไซม์ไคติเนส; (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	ความสัมพันธ์ของปัจจัยที่มีผลต่อค่าการทำงานของเอนไซม์ไคติเนส; (a) ความสัมพันธ์ระหว่างค่า pH และ เวลา เมื่อกำหนดความเข้มข้นของสารตั้งต้นและอุณหภูมิเท่ากับ 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) ของเอนไซม์ไคติเนส	19
10	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดจากการทำปฏิกริยาของสารละลายเอนไซม์ไคติเนส	19
11	แถบโปรตีนที่ปรากฏบนเจลของ SDS-PAGE (M = protein marker, 1 = control, 2 และ 3 = น้ำคั้นจากเปลือกลองกองหลังถูกกระตุ้นด้วย *M. guizhouense* PSUM04 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ)	20
12	การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราก่อโรคผลเน่า โดยใช้น้ำคั้นจากผลลองน้ำคั้นจากเปลือกลองกองหลังถูกกระตุ้นด้วย *M. guizhouense* PSUM04 (สีเทา) และ potassium phosphate buffer pH 7.0 (สีดำ)	21
13	เชื้อรา *Botrytis* sp. ที่เจริญตามปกติบนอาหาร PDA (ภาพขวา) และ inhibition zone บนอาหาร PDA ที่เกิดจากการยับยั้งการเจริญของรา *Botrytis* sp. โดยการใช้สารละลายเอนไซม์ไคติเนสสกัดหยาบ (E) น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ (C) และ extraction buffer (B) (ภาพซ้าย)	21

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
14	เชื้อรา *Fusarium* sp. ที่เจริญตามปกติบนอาหาร PDA (ภาพขวา) และ ihibition zone บนอาหาร PDA ที่เกิดจากการยับยั้งการเจริญของรา *Fusarium* sp. โดยการใช้สารละลายเอนไซม์ไคติเนสสกัดหยาบ (E) น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ (C) และ extraction buffer (B) (ภาพซ้าย)	22
15	เชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. ที่เจริญตามปกติบนอาหาร PDA (ภาพขวา) และ inhibition zone บนอาหาร PDA ที่เกิดจากการยับยั้งการเจริญของรา *Pestalotiopsis* sp. โดยการใช้สารละลายเอนไซม์ไคติเนสสกัดหยาบ (E) น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ (C) และ extraction buffer (B) (ภาพซ้าย)	22
16	ความสัมพันธ์ของปัจจัยที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของรา *Botrytis* sp. บนอาหาร PDA; (a) ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเอนไซม์ไคติเนส และอุณหภูมิ เมื่อกำหนดเวลาในการบ่มเท่ากับ 35 นาที; (b) ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ และเวลาในการบ่มเอนไซม์ เมื่อกำหนดความเข้มข้นของเอนไซม์ 20 U/ml และ (c) ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเอนไซม์ไคติเนส และเวลาเมื่อกำหนดอุณหภูมิไว้ที่ 35 °C	24
17	ความสัมพันธ์ของปัจจัยที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของรา *Fusarium* sp. บนอาหาร PDA; (a) ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเอนไซม์ไคติเนส และอุณหภูมิ เมื่อกำหนดเวลาในการบ่มเท่ากับ 35 นาที; (b) ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ และเวลาในการบ่มเอนไซม์ เมื่อกำหนดความเข้มข้นของเอนไซม์ 20 U/ml และ (c) ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเอนไซม์ไคติเนส และเวลาเมื่อกำหนดอุณหภูมิไว้ที่ 35 °C	26
18	ความสัมพันธ์ของปัจจัยที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของรา *Pestalotiopsis* sp. บนอาหาร PDA (a) ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเอนไซม์ไคติเนส และอุณหภูมิ เมื่อกำหนดเวลาในการบ่มเท่ากับ 35 นาที; (b) ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ และเวลาในการบ่มเอนไซม์ เมื่อกำหนดความเข้มข้นของเอนไซม์ 20 U/ml และ (c) ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเอนไซม์ไคติเนส และเวลาเมื่อกำหนดอุณหภูมิไว้ที่ 35 °C	28
19	เส้นใยของรา *Botrytis* sp. ใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด; (a) และ (c) กระตุ้นด้วยน้ำเปล่า (control) และภาพ (b) และ (d) กระตุ้นด้วยน้ำคั้นจากลองกองที่กระตุ้นด้วย *M. guizhouense* PSUM04	29
20	เส้นใยของรา *Fusarium* sp. ใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด; (a) และ (c) กระตุ้นด้วยน้ำเปล่า (control) และภาพ (b) และ (d) กระตุ้นด้วยน้ำคั้นจากลองกองที่กระตุ้นด้วย *M. guizhouense* PSUM04	29
21	เส้นใยของรา *Pestalotiopsis* sp. ใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด; (a) และ (c) กระตุ้นด้วยน้ำเปล่า (control) และภาพ (b) และ (d) กระตุ้นด้วยน้ำคั้นจากลองกองที่กระตุ้นด้วย *M. guizhouense* PSUM04	30

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
22	การเจริญของของ *Botrytis* sp. บนผลลองกอง; (a-c) ชุดควบคุม หลังจากปลูกเชื้อราทดสอบ 48, 96 และ 120 ชั่วโมง ตามลำดับ, (d-f) พ่นสารละลายเอนไซม์ก่อนปลูกเชื้อราก่อโรค หลังจากปลูกเชื้อราทดสอบ 48, 96 และ 120 ชั่วโมง ตามลำดับ และ (g-i) ปลูกเชื้อราก่อโรคก่อนจากนั้นจึงพ่นสารละลายเอนไซม์หลังจากปลูกเชื้อราทดสอบ 48, 96 และ 120 ชั่วโมง ตามลำดับ	31
23	การเจริญของของ *Fusarium* sp. บนผลลองกอง; (a-c) ชุดควบคุม หลังจากปลูกเชื้อราทดสอบ 48, 96 และ 120 ชั่วโมง ตามลำดับ, (d-f) พ่นสารละลายเอนไซม์ก่อนปลูกเชื้อราก่อโรค หลังจากปลูกเชื้อราทดสอบ 48, 96 และ 120 ชั่วโมง ตามลำดับ และ (g-i) ปลูกเชื้อราก่อโรคก่อนจากนั้นจึงพ่นสารละลายเอนไซม์หลังจากปลูกเชื้อราทดสอบ 48, 96 และ 120 ชั่วโมง ตามลำดับ	31
24	การเจริญของของ *Pestalotiopsis* sp. บนผลลองกอง; (a-c) ชุดควบคุม หลังจากปลูกเชื้อราทดสอบ 24, 48 และ 96 ชั่วโมง ตามลำดับ, (d-f) พ่นสารละลายเอนไซม์ก่อนปลูกเชื้อราก่อโรค หลังจากปลูกเชื้อราทดสอบ 24, 48 และ 96 ชั่วโมง ตามลำดับ และ (g-i) ปลูกเชื้อราก่อโรคก่อนจากนั้นจึงพ่นสารละลายเอนไซม์ หลังจากปลูกเชื้อราทดสอบ 24, 48 และ 96 ชั่วโมง ตามลำดับ	31
25	ร้อยละของการเกิดโรคผลเน่าของลองกองหลังจากปลูกเชื้อ; (a) *Botrytis* sp., (b) *Fusarium* sp. และ (c) *Pestalotiopsis* sp.	32
26	ร้อยละของการเกิดโรคผลเน่าของลองกองเมื่อบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง (30 °C)	33

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินรายได้มหาวิทยาลัย ประเภททุนดรุณาจารย์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประจำปีงบประมาณ 2/2557 รหัสโครงการ NAT570507S

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

ธนัญชนก ไชยรินทร์

นักวิจัย

บทคัดย่อ

ลองกอง (*Lansium domesticum*) เป็นผลไม้เมืองร้อนที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของภาคใต้ ประเทศไทย แต่สาเหตุที่ทำให้คุณภาพของลองกองลดลงเกิดขึ้นเนื่องจากโรคหลังการเก็บเกี่ยว ซึ่งหนึ่งในโรคหลังการเก็บเกี่ยวที่สำคัญของลองกองได้แก่โรคผลเน่า การวิจัยครั้งนี้จึงเกิดขึ้นโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบประสิทธิภาพการใช้เอนไซม์ไคติเนส ที่ผลิตโดยราแมลง *Metarhizium guizhouense* PSUM04 โดยใช้เปลือกกุ้งและกระดองปูที่เหลือใช้เป็นวัตถุดิบ ในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของลองกองหลังการเก็บเกี่ยว พร้อมทั้งหาศึกษาคุณสมบัติต่างๆของเอนไซม์ไคติเนสที่ผลิตได้ และสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ไคติเนส ผลการศึกษาพบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อราบนอาหารแบบแข็ง (solid state cultivation) ด้วยรำข้าว สาลี กระดองปูบดละเอียด และ colloidal chitin ในอัตราส่วน 1.5: 1.5: 1 ที่มีอัตราส่วนระหว่างอาหารแข็งและเหลว (S/L ratio) 3:1 และ 4:2 pH 7.4 และสภาพที่เหมาะสมในการบ่มเชื้อ คืออุณหภูมิ 32°C เป็นเวลา 11 วัน มีค่ากิจกรรมไคติเนสสูงสุด 2.51 U/ml โดยค่ากิจกรรมมีความเสถียรที่อุณหภูมิ 20-40 °C และ pH 5.0-8.0 ไคติเนสที่ผลิตได้สามารถยับยั้งการเจริญของรา *Botrytis* sp., *Fusarium* sp. และ *Pestalotiopsis* sp. ที่เป็นสาเหตุโรคผลเน่าหลังการเก็บเกี่ยวของลองกองบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 44.7, 42.9 และ 43.6% ตามลำดับ และสปอร์แขวนลอยของ *M. guizhouense* PSUM04 ที่ความเข้มข้น 1 x 10^4 สปอร์/มล ยังกระตุ้นให้ผลลองกองสร้าง pathogenesis- related protein (PR protein) ขนาด 25-27 และ 43 kDa ได้แก่ไคติเนส และ บีตา-1,3- กลูคาเนส และสามารถยับยั้งการเจริญของราก่อโรคผลเน่าบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อได้เช่นกัน เมื่อตรวจสอบลักษณะเส้นใยของเชื้อราก่อโรคภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบอิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (SEM) พบว่าเส้นใยของ *Botrytis* sp., *Fusarium* sp. และ *Pestalotiopsis* sp. มีรูปร่างผิดปกติไป บิดเบี้ยว และฉีกขาด นอกจากนี้เส้นใยของ *Fusarium* sp. และ *Pestalotiopsis* sp. ยังมีความหนาแน่นลดลงอีกด้วย เมื่อพ่นสารละลายเอนไซม์ไคติเนสบนผลลองกอง 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 นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบการใช้สารละลายเอนไซม์ไคติเนส 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 dookkoo* 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 obtimal 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. guizouense* 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 x 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 ß-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. guizouense* 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.