



การพัฒนาสารเคลือบผิวโคโตนานร่วมกับสารสกัดมะระขี้นกชะลอโรคแอนแทรกซ์ใน
มะม่วงน้ำดอกไม้สีทอง



นฤพร บังคำ

วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2566
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนเรศวร

การพัฒนาสารเคลือบผิวโคโตนร่วมกับสารสกัดมะระขี้นกชะลอโรคแอนแทรกซ์ใน
มะม่วงน้ำดอกไม้สีทอง



วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนครสวรรค์
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2566
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนครสวรรค์

วิทยานิพนธ์ เรื่อง "การพัฒนาสารเคลือบผิวโคโตนร่วมกับสารสกัดมะระขี้นกชะลอโรคแอนแทรก
โนสในมะม่วงน้ำดอกไม้สีทอง"

ของ นฤพร บังคำ

ได้รับการพิจารณาให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กัลยา กองเงิน)

..... ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มลิวรรณ นาคขุนทด)

..... กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
(รองศาสตราจารย์ ดร.อนุพันธ์ กงบังเกิด)

..... กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายใน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เนริสา คุณประทุม)

อนุมัติ

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.กรองกาญจน์ ชูทิพย์)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อเรื่อง	การพัฒนาสารเคลือบผิวโคโตซานร่วมกับสารสกัดมะระขี้นกชะลอโรคแอนแทรคโนสในมะม่วงน้ำดอกไม้สีทอง
ผู้วิจัย	นฤพร บังคำ
ประธานที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มลิวรรณ นาคขุนทด
กรรมการที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.อนุพันธ์ กงบังเกิด
ประเภทสารนิพนธ์	วิทยานิพนธ์ วท.ม. เทคโนโลยีชีวภาพ, มหาวิทยาลัยนเรศวร, 2566
คำสำคัญ	โรคแอนแทรคโนส, มะระขี้นก, โคโตซาน, มะม่วง

บทคัดย่อ

มะม่วงน้ำดอกไม้สีทองถือเป็นผลไม้ที่ได้รับความนิยมนำมารับประทานโดยมีชื่อเสียงทั่วโลก แต่มักประสบปัญหาเกี่ยวกับโรคแอนแทรคโนสทั้งในระยะการเจริญเติบโตและระยะสีบพันธุ์ ซึ่งอาการของโรคแอนแทรคโนสส่งผลทำให้ผลผลิตตกต่ำและเป็นอุปสรรคในการส่งออก ดังนั้นเพื่อควบคุมการเกิดโรคแอนแทรคโนสในผลมะม่วง งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาสารเคลือบผิวโคโตซานที่บริโภคร่วมกับสารสกัดจากมะระขี้นกในการควบคุมการเกิดโรคแอนแทรคโนสในมะม่วง โดยแบ่งการทดสอบเป็น 2 รูปแบบคือ การทดสอบประสิทธิภาพของสารเคลือบผิวโคโตซานที่ความเข้มข้น 0.5, 1 และ 2% ร่วมกับสารสกัดจากมะระขี้นกที่ความเข้มข้น 500 ppm ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสที่เกิดจากเชื้อรา *C. gloeosporioides* บนผลมะม่วงน้ำดอกไม้ เป็นเวลา 10 วัน ผลการศึกษาพบว่าการเคลือบผิวด้วยโคโตซานที่ผสมสารสกัดมะระขี้นกสามารถชะลอการเกิดโรคแอนแทรคโนสได้ดีกว่าการเคลือบผิวด้วยโคโตซานหรือสารสกัดมะระขี้นกเพียงอย่างเดียว โดยในวันที่ 5, 7 และ 10 หลังการเพาะเชื้อ ผลมะม่วงที่เคลือบผิวด้วยโคโตซาน 2% ผสมสารสกัดมะระขี้นกมีประสิทธิภาพในการชะลอการเกิดโรคได้ดีที่สุด อีกทั้งยังพบว่าผลมะม่วงที่เคลือบด้วยโคโตซาน 1% สามารถช่วยลดการสูญเสียน้ำหนักในผลมะม่วงได้มากที่สุด และการศึกษาการแสดงออกของยีน β -1,3- glucanase ก่อนและหลังเคลือบผิวโคโตซานร่วมกับสารสกัดมะระขี้นก ผลการศึกษาพบว่าอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากมะม่วงมีความเข้มข้นมากแต่มีความบริสุทธิ์ต่ำ อีกทั้งหลังการกำจัดอาร์เอ็นเอมีปริมาณอาร์เอ็นเอลดลงเป็นจำนวนมาก จึงไม่ประสบความสำเร็จในการสร้างซีดีเอ็นเอจึงยังไม่สามารถตรวจสอบการแสดงออกของยีนได้ จากการศึกษาชี้ให้เห็นว่าการเคลือบผิวมะม่วงด้วยโคโตซานที่ผสมสารสกัดมะระขี้นกมีศักยภาพในการช่วยลดการสูญเสีย น้ำ ช่วยลดการเกิดโรคแอนแทรคโนส และสามารถชะลอการสุกของมะม่วงได้ ดังนั้นสารเคลือบผิวโคโตซานที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากมะระขี้นกจึงจัดเป็นทางเลือกหนึ่งในการใช้ทดแทนสารเคมีเพื่อให้ผลผลิตมีคุณภาพที่ดีขึ้นก่อน

ส่งออกหรือขนส่งต่อไป



Title	DEVELOPMENT OF CHITOSAN COATING PRODUCT CONTAINING BITTER GOURD EXTRACT TO DELAY ANTHRACNOSE DISEASE IN MANGO “NAM DOK MAI SI THONG”
Author	Narueporn Bongkham
Advisor	Assistant Professor Maliwan Nakkuntod, Ph.D.
Co-Advisor	Associate Professor Anupan Kongbangkerd, Dr.rer.nat.
Academic Paper	M.S. Thesis in Biotechnology, Naresuan University, 2023
Keywords	Anthracoese disease, Bitter gourd, Chitosan, Mango

ABSTRACT

Mangifera indica cv “Nam Dok Mai Si Thong” is the most popular fruit worldwide. It often faces anthracnose disease in both vegetative and reproductive stages. This disease's symptoms lead to low yields and hinder exportation. Therefore, developing a coating to reduce anthracnose disease incidence in mango fruits is necessary. This research aimed to develop an edible chitosan coating containing bitter gourd extract to control anthracnose disease in mangoes. Two conditions had experimented. First, efficacy of chitosan coatings at 0.5%, 1%, and 2% concentrations which each containing 500 ppm of bitter gourd extract in controlling anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides* on mango fruits over 10 days was evaluated. The results demonstrated that the chitosan coatings with bitter gourd extract delayed disease progression more effectively than coatings with chitosan or bitter gourd extract alone. Notably, the 2% chitosan coating with bitter gourd extract was most effective in delaying the disease after 5, 7, and 10 days of inoculation. Furthermore, the 1% chitosan coating exhibited the most significant reduction in weight loss of the mango fruits. The expression of the β -1,3-glucanase gene in mangoes was analyzed before and after fungal infection as well as after coating with chitosan containing with bitter gourd extract. The results showed that RNA extraction from mango was high concentration but low purity. Moreover, after the removal of

RNA, there was a considerable reduction in the amount of RNA. Thus, gene expression is unsuccessful in cDNA synthesis. Our study demonstrated that chitosan coatings with bitter gourd extract effectively reduce water loss, suppress disease incidence, and delay ripening in mangoes. Therefore, this eco-friendly coating formulation presents an excellent alternative to chemical treatments, ensuring superior mango quality for export and transportation.



ประกาศคุณูปการ

ผู้วิจัยขอกราบพระคุณเป็นอย่างสูงในความกรุณาของ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มลิวรรณ นาคขุนทด ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้สละเวลาอันมีค่ามาเป็นທີ່ปรึกษา พร้อมคำแนะนำตลอดระยะเวลาในการทำวิจัยในครั้งนี้ รวมถึงชี้แนะแนวทางในการแก้ไขปัญหาต่าง ๆ และการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์นี้ให้มีความสมบูรณ์ และขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.อนุพันธ์ กงบังเกิด กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ จนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้อย่างสมบูรณ์และทรงคุณค่า

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กัลยา กองเงิน ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เนริสา คุณประทุม คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ผู้ทรงคุณวุฒิ ภายใน ที่ให้เกียรติมาเป็นกรรมการสอบในครั้งนี้ ตลอดจนให้ความรู้ และคำแนะนำในการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านที่ให้ความรู้ และคำชี้แนะ ตลอดการทำวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ให้ความกรุณาอำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือและสถานที่ในการทำวิจัยครั้งนี้ เหนือสิ่งอื่นใดขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และผู้มีอุปการะคุณทุกท่านที่คอยให้ความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ ทั้งกำลังกาย กำลังใจและทุนทรัพย์ในการสนับสนุนแก่ข้าพเจ้าเสมอมา

คุณค่าและคุณประโยชน์อันพึงจะมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบและอุทิศแต่ผู้ที่มีพระคุณทุกท่าน ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่างานวิจัยฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่สนใจ และเพื่อประโยชน์ทางเศรษฐกิจต่อไป

นฤพร บังคำ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
ประกาศคุุณุปการ.....	ช
สารบัญ.....	ซ
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	๗
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาของปัญหา.....	1
จุดมุ่งหมายของการวิจัย.....	2
ขอบเขตการวิจัย.....	2
สมมติฐานของการวิจัย.....	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
มะม่วง.....	4
วิธีการเก็บรักษามะม่วงน้ำดอกไม้.....	4
โรคแอนแทรกโนส (Anthracnose disease).....	6
วงจรชีวิตของเชื้อรา <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	9
การควบคุมโรคแอนแทรกโนส.....	11
สารเคลือบผิวผลไม้.....	12
มะระขี้นก (Bitter gourd).....	13

1. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของมะระขี้นก.....	13
2. องค์ประกอบทางเคมีในมะระขี้นก	15
3. การใช้ประโยชน์.....	15
Pathogenesis-related protein (PR)	16
1. การชักนำการทำงานของโปรตีน PR	16
2. หน้าที่ของโปรตีน PR.....	17
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	21
ตัวอย่างที่นำมาใช้ในการศึกษา.....	21
วัสดุอุปกรณ์ เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย.....	21
สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	22
การแยกเชื้อราและระบุชนิดเชื้อรา	23
การเตรียม Spore Suspension	25
การพัฒนาสารเคลือบผิว	26
1. การสกัดสารจากผลมะระขี้นก.....	26
2. การเตรียมสารเคลือบผิว.....	26
3. การตรวจสอบคุณภาพของสารเคลือบผิว.....	27
การตรวจสอบการแสดงออกของยีน.....	27
1. การออกแบบไพรเมอร์	27
2. การปลุกเชื้อราทดสอบบนผิวมะม่วง	28
3. การสกัดอาร์เอ็นเอ	29
4. การกำจัดดีเอ็นเอจากสารละลายอาร์เอ็นเอ	30
5. การสังเคราะห์ cDNA (Tetro™ cDNA Synthesis Kit, UK).....	31

6. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน β -1,3-glucanase ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)	31
7. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน Actin และยีน GAPDH ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)	31
บทที่ 4 ผลการวิจัย.....	34
ผลการแยกเชื้อราก่อโรคในมะม่วง.....	34
ผลการสกัดสารจากมะระขี้นก.....	36
ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารเคลือบผิวโคโตซานผสมสารสกัดมะระขี้นกในการควบคุมการเกิดโรคแอนแทรกคโนสบนผลมะม่วงที่ได้รับการปลูกเชื้อในห้องปฏิบัติการ.....	36
1. ขนาดรอยโรค	36
2. ลักษณะอาการรอยโรค	38
3. การสูญเสียน้ำหนักผล (Weight loss)	43
4. ความแน่นเนื้อของผล (Fruits firmness).....	44
การมีชีวิตของเนื้อเยื่อบริเวณรอยโรค.....	45
1. การสกัดอาร์เอ็นเอมะม่วง.....	45
2. การกำจัดดีเอ็นเอจากสารละลายอาร์เอ็นเอ.....	52
3. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน β -1,3-glucanase ยีน Actin และยีน GAPDH ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)	53
บทที่ 5 บทสรุป.....	55
อภิปรายผลการวิจัย.....	55
การแยกเชื้อราก่อโรคในมะม่วง.....	55
1. การจำแนกเชื้อราด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา	55

2. การจำแนกเชื้อราโดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS.....	55
การทดสอบประสิทธิภาพของสารเคลือบผิวโคโตซานผสมสารสกัดมะระขี้นกในการ ควบคุมการเกิดโรคแอนแทรกซ์ในสบนผลมะม่วงที่ได้รับการปลูกเชื้อใน ห้องปฏิบัติการ	56
1. ลักษณะอาการของโรค	56
2. การสูญเสียน้ำหนักผล	57
3. ความแน่นเนื้อ	58
การมีชีวิตของเนื้อเยื่อบริเวณรอยโรค.....	58
1. การสกัดอาร์เอ็นเอ.....	58
2. การกำจัดดีเอ็นเอจากสารละลายอาร์เอ็นเอ	59
3. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน β -1,3-glucanase ยีน Actin และยีน GAPDH ด้วย เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR).....	59
สรุปผลการวิจัย.....	59
ข้อเสนอแนะ	60
บรรณานุกรม.....	61
ประวัติผู้วิจัย	71

สารบัญตาราง

	หน้า
ตาราง 1 กลุ่มของ Pathogenesis-related protein	17
ตาราง 2 อัตราส่วนที่ใช้สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS	25
ตาราง 3 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS	25
ตาราง 4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละไพรเมอร์.....	27
ตาราง 5 การปลูกเชื้อราทดสอบบนผิวมะม่วง.....	29
ตาราง 6 ปฏิกริยาสำหรับการกำจัดดีเอ็นเอ.....	30
ตาราง 7 ส่วนผสมของปฏิกริยาสำหรับการสังเคราะห์ cDNA.....	31
ตาราง 8 อัตราส่วนที่ใช้สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ยีน β -1,3-glucanase.....	32
ตาราง 9 สภาวะสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ยีน β -1,3-glucanase.....	32
ตาราง 10 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ของยีน Actin และยีน GAPDH.....	32
ตาราง 11 อัตราส่วนที่ใช้สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ยีน Actin และยีน GAPDH	33
ตาราง 12 สภาวะสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ยีน Actin และยีน GAPDH.....	33
ตาราง 13 ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของรอยโรคแอนแทรคโนสบนผิวมะม่วงสุกพันธุ์ น้ำดอกไม้ สีทองเป็นเวลา 10 วัน	37
ตาราง 14 ค่าเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักของมะม่วงหลังการเคลือบด้วยไคโตซานและไคโตซาน ผสมสารสกัดมะระขี้นก ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน	43
ตาราง 15 ค่าการดูดกลืนแสงของอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างมะม่วงในวันที่ 0.....	46
ตาราง 16 ค่าการดูดกลืนแสงของอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างมะม่วงในวันที่ 1.....	47

ตาราง 17	ค่าการดูดกลืนแสงของอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างมะม่วงในวันที่ 3.....	48
ตาราง 18	ค่าการดูดกลืนแสงของอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างมะม่วงในวันที่ 4.....	49
ตาราง 19	ค่าการดูดกลืนแสงของอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างมะม่วงในวันที่ 5.....	51
ตาราง 20	ค่าการดูดกลืนแสงของอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างมะม่วงในวันที่ 6.....	52



สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพ 1 มะม่วงน้ำดอกไม้.....	5
ภาพ 2 อาการของโรคแอนแทรกโนสที่มีสาเหตุจากเชื้อรา <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (A) แผลสีน้ำตาลบนใบ (B) ช่อดอกแห้ง (C) จุดแผลสีดำผลมะม่วง	7
ภาพ 3 ลักษณะเชื้อรา <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (A) โคนิเดียของเชื้อรา (B) การงอกแอฟเพรสเซอร์เรียของโคนิเดีย (C) โคนิได้ออสปอร์ (D) โคลโลนีของเชื้อราที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ	9
ภาพ 4 วงจรชีวิตของโรคแอนแทรกโนสบนผลมะม่วง	10
ภาพ 5 การเข้าทำลายของเชื้อรา <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> บนผลไม้	11
ภาพ 6 โครงสร้างทางเคมีของโคโตซาน	13
ภาพ 7 ลักษณะทั่วไปของมะระขี้นก.....	14
ภาพ 8 แบบจำลองการจับของไฟรเมอร์บนยีน β -1,3-glucanase ระหว่างเอ็กซอนที่ 2 ไปจนถึงเอ็กซอนที่ 4	28
ภาพ 9 ลักษณะเชื้อรา <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (A) โคลโลนีของเชื้อราที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และ (B) โคนิเดียของเชื้อรา.....	34
ภาพ 10 แถบดีเอ็นเอที่สกัดจากเชื้อราด้วยวิธีดัดแปลง CTAB โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1kb DNA Ladder (GeneDirex, Taiwan).....	35
ภาพ 11 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์บริเวณ Internal Transcribed Spacer (ITS) โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1kb DNA Ladder (GeneDirex, Taiwan).....	35
ภาพ 12 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล NCBI.....	36

ภาพ 13 ขนาดของรอยโรคแอนแทรกคโนสบนผิวมะม่วงน้ำดอกไม้ที่เคลือบด้วยสารเคลือบผิว ไคโตซาน ที่เก็บรักษานาน 3 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (A) Chitosan 0.5% (B) Chitosan 1% (C) Chitosan 2% (D) Chitosan 0.5%+BT (E) Chitosan 1%+BT (F) Chitosan 2%+BT (G) Bitter gourd extract (H) Control.....39

ภาพ 14 ขนาดของรอยโรคแอนแทรกคโนสบนผิวมะม่วงน้ำดอกไม้ที่เคลือบด้วยสารเคลือบผิว ไคโตซาน ที่เก็บรักษานาน 5 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (A) Chitosan 0.5% (B) Chitosan 1% (C) Chitosan 2% (D) Chitosan 0.5%+BT (E) Chitosan 1% +BT (F) Chitosan 2%+BT (G) Bitter gourd extract (H) Control.....40

ภาพ 15 ขนาดของรอยโรคแอนแทรกคโนสบนผิวมะม่วงน้ำดอกไม้ที่เคลือบด้วยสารเคลือบผิว ไคโตซาน ที่เก็บรักษานาน 7 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (A) Chitosan 0.5% (B) Chitosan 1% (C) Chitosan 2% (D) Chitosan 0.5%+BT (E) Chitosan 1%+BT (F) Chitosan 2%+BT (G) Bitter gourd extract (H) Control.....41

ภาพ 16 ขนาดของรอยโรคแอนแทรกคโนสบนผิวมะม่วงน้ำดอกไม้ที่เคลือบด้วยสารเคลือบผิว ไคโตซาน ที่เก็บรักษานาน 10 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (A) Chitosan 0.5% (B) Chitosan 1% (C) Chitosan 2% (D) Chitosan 0.5%+BT (E) Chitosan 1%+BT (F) Chitosan 2%+BT (G) Bitter gourd extract (H) Control.....42

ภาพ 17 ค่าความแน่นเนื้อของมะม่วงหลังการเคลือบด้วยไคโตซานและไคโตซานผสมสารสกัดมะระขี้เหล็ก ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน.....44

ภาพ 18 ผลการสกัดอาร์เอ็นเอของมะม่วงในวันที่ 0 บน 1% Agarose gel โดย M คือ 1Kb DNA ladder (GeneOn)45

ภาพ 19 ผลการสกัดอาร์เอ็นเอของมะม่วงในวันที่ 1 บน 1% Agarose gel โดย M คือ 1Kb DNA ladder (GeneOn)46

ภาพ 20 ผลการสกัดอาร์เอ็นเอของมะม่วงในวันที่ 3 บน 1% Agarose gel โดย M คือ 1Kb DNA ladder (GeneOn)48

ภาพ 21 ผลการสกัดอาร์เอ็นเอของมะม่วงในวันที่ 4 บน 1% Agarose gel โดย M คือ 1Kb DNA ladder (GeneOn)	49
ภาพ 22 ผลการสกัดอาร์เอ็นเอของมะม่วงในวันที่ 5 บน 1% Agarose gel โดย M คือ 1Kb DNA ladder (GeneOn)	50
ภาพ 23 ผลการสกัดอาร์เอ็นเอของมะม่วงในวันที่ 6 บน 1% Agarose gel โดย M คือ 1Kb DNA ladder (GeneOn)	51
ภาพ 24 ผลการกำจัดดีเอ็นเอจากสารละลายอาร์เอ็นเอของมะม่วงในวันที่ 0 และ 1 บน 1% Agarose gel โดย M คือ 1Kb DNA ladder (GeneOn)	52
ภาพ 25 ผลการกำจัดดีเอ็นเอจากสารละลายอาร์เอ็นเอของมะม่วงในวันที่ 3, 4, 5 และ 6 บน 1% Agarose gel โดย M คือ 1Kb DNA ladder (GeneOn)	53
ภาพ 26 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน β -1,3-glucanase บน 1% Agarose gel โดย M คือ 1Kb DNA ladder (GeneOn)	53
ภาพ 27 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน Actin และยีน GAPDH บน 1% Agarose gel โดย M คือ 1Kb DNA ladder (GeneOn)	54

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาของปัญหา

มะม่วงน้ำดอกไม้จัดเป็นมะม่วงรับประทานแบบผลสุกและเปลือกบางที่ได้รับความนิยมจากตลาดทั้งภายในและต่างประเทศ โดยมีมูลค่าการส่งออกมากที่สุดกว่ามะม่วงพันธุ์อื่น ๆ อย่างไรก็ตาม ปัญหาสำคัญที่ส่งผลกระทบต่อคุณภาพของผลผลิตของมะม่วงหลังเก็บเกี่ยวคือ การเข้าทำลายจากเชื้อก่อโรคโดยเฉพาะโรคแอนแทรคโนส ซึ่งมีสาเหตุจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* เป็นเชื้อราที่พบการแพร่กระจายอยู่ทั่วโลก โดยเฉพาะอย่างยิ่งประเทศในเขตอบอุ่นจนถึงเขตร้อน เป็นเชื้อราที่เป็นปัญหาสำคัญที่ทำให้เกิดการสูญเสียของคุณภาพของพืชผักและผลไม้ทางเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย เช่น พริก มะม่วง องุ่น อะโวคาโด มะละกอ และเสาวรส เป็นต้น เชื้อราจะเข้าทำลายได้ทุกระยะการเติบโตของพืช ตั้งแต่ระยะต้นกล้าไปจนถึงระยะหลังการเก็บเกี่ยว (นิพนธ์ วิสารทานนท์, 2542) หลังจากเชื้อราเข้าทำลายผลจะปรากฏจุดดำเป็นแอ่งบวม และเริ่มมีขนาดใหญ่ขึ้นเมื่อผลมีการสุกอมมากขึ้น บริเวณกลางผลจะมีกลุ่มเมือกของสปอร์สีส้ม จากนั้นจะทำให้ผลที่มีการติดเชื้อมีลักษณะนิ่ม และเน่าในที่สุด ส่งผลให้คุณภาพ ปริมาณ และมูลค่าของผักและผลไม้ลดลง ทำให้อายุการเก็บรักษาของผลผลิตสั้นลง ไม่สามารถขนส่งระยะไกลได้จนผลผลิตเน่าเสีย การสูญเสียผลผลิตทางการเกษตรหลังการเก็บเกี่ยวที่เกิดจากโรคแอนแทรคโนสเป็นปัญหาสำคัญประการหนึ่งที่ส่งผลเสียต่อการจำหน่ายผลผลิต

ปัจจุบันมีการใช้สารเคมีในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสตั้งแต่ก่อนการเก็บเกี่ยว ได้แก่ แมนโคแซบ (Mancozeb) คาร์เบนดาซิม (Carbendazim) และอะซ็อกซิสโตรบิน (Azoxystrobin) เป็นต้น เนื่องจากมีประสิทธิภาพในการป้องกันและกำจัดเชื้อโรคสูง แต่เมื่อมีการใช้สารเคมีในปริมาณมากและใช้ติดต่อกันเป็นเวลานาน มักจะเกิดการตกค้างของสารเคมีในสิ่งแวดล้อมและเป็นอันตรายต่อสุขภาพของเกษตรกร การใช้งานที่ขาดความรู้ความเข้าใจในการใช้ผลิตภัณฑ์หรือการใช้งานอย่างไม่ระมัดระวัง รวมไปถึงการเก็บรักษาและการกำจัดภาชนะบรรจุที่ไม่ถูกวิธี นอกจากนี้ยังพบว่ามีการใช้สารเคลือบผิวที่มีส่วนผสมของสารเคมีในการชะลอการเกิดโรคหลังการเก็บเกี่ยวและยืดอายุในการเก็บรักษา ยกตัวอย่างเช่น พาราฟินแว็กซ์ (paraffin wax) และ โพลีเอทิลีนแว็กซ์ (polyethylene wax) เพื่อให้คงความสดได้นานและช่วยลดการสูญเสียน้ำ (Jutammat, 2016) สารเคลือบผิวที่มีส่วนผสมของสารเคมีเมื่อมีการสะสมในปริมาณมากอาจทำให้เกิดความเป็นพิษต่อร่างกายและในบางประเทศไม่อนุญาตให้ใช้หรือนำเข้าผลผลิตที่เคลือบผิวด้วยสารเคลือบผิวที่มีส่วนผสมของสารเคมี ซึ่งในปัจจุบันผู้บริโภคส่วนใหญ่เริ่มให้ความสำคัญในการเลือกบริโภคผลิตภัณฑ์

ผักผลไม้ที่ปลอดภัย ปลอดภัย รวมไปถึงกรรมวิธีในการยืดอายุการเก็บรักษาผักผลไม้ที่หลีกเลี่ยงการใช้สารเคมี แนวทางหนึ่งในการลดการใช้สารเคมีเพื่อรักษาคุณภาพของผลผลิตหลังการเก็บเกี่ยวคือการเลือกใช้สารจากธรรมชาติ เช่น การใช้โคโตซาน ซึ่งเป็นสารพอลิเมอร์ผลิตขึ้นจากวัสดุธรรมชาติมาใช้ทดแทนการใช้สารเคมีในการยืดอายุการเก็บรักษาและยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรค (Huang et al., 2021) แต่อย่างไรก็ตามการใช้โคโตซานที่ความเข้มข้นสูงมักพบปัญหาเกี่ยวกับการสุกของผลไม้ ถึงแม้ว่าโคโตซานสามารถเก็บรักษาผลไม้ได้นานมากขึ้นแต่ไม่สามารถพัฒนากระบวนการสุกให้เข้าสู่ระยะสุกได้ นอกจากนี้ยังส่งผลให้เกิดการดองน้ำในผลไม้มากเกินไปและอาจจะทำให้ผลไม้เหี่ยวได้ ดังนั้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคแอนแทรคโนสโดยใช้โคโตซานที่ความเข้มข้นต่ำจึงมีการเลือกใช้สารสกัดจากธรรมชาติ ซึ่งเป็นสารที่ผลิตได้จากพืชสมุนไพรหลายชนิดที่มีแนวโน้มสามารถนำมาใช้ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราได้ เนื่องจากมีสารทุติยภูมิบางชนิดที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อราสาเหตุโรคพืช เช่น พืชในวงศ์แตง (Cucurbitaceae) เป็นพืชล้มลุกชนิดไม้เถา ซึ่งจัดเป็นพืชที่สามารถใช้เป็นยาสมุนไพรป้องกันโรคและรักษาโรคได้โดยเฉพาะมะระขี้นก อีกทั้งยังมีสารออกฤทธิ์ในการต้านเชื้อราและแบคทีเรียได้อีกด้วย

ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีจุดมุ่งหมายเพื่อพัฒนาสารเคลือบผิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากมะระขี้นกในการชะลอการเกิดโรคแอนแทรคโนสและยืดอายุการเก็บรักษาผลไม้ให้นานมากขึ้น และเพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงหลังการใช้ผลิตภัณฑ์สารเคลือบผิวที่มีส่วนผสมสารสกัดจากมะระขี้นก

จุดมุ่งหมายของการวิจัย

1. เพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์สารเคลือบผิวโคโตซานที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากมะระขี้นก
2. เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนในมะม่วงหลังการเคลือบด้วยผลิตภัณฑ์สารเคลือบผิวที่มีส่วนผสมสารสกัดจากมะระขี้นก

ขอบเขตการวิจัย

1. มะม่วงน้ำดอกไม้ที่ใช้ในการศึกษาคือ พันธุ์น้ำดอกไม้สีทอง
2. พัฒนาสารเคลือบผิวที่มีส่วนผสมของโคโตซานและสารสกัดจากมะระขี้นก
3. ตรวจสอบประสิทธิภาพของสารเคลือบผิวโคโตซานผสมสารสกัดมะระขี้นกในการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*
4. ตรวจสอบฤทธิ์ของสารเคลือบผิวในการชะลอโรคแอนแทรคโนสในมะม่วงโดยใช้การตรวจสอบของยีน β -1,3-glucanase ด้วยวิธี quantitative real-time PCR

สมมติฐานของการวิจัย

1. สารเคลือบผิวสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคแอนแทรคโนสในมะม่วงน้ำดอกไม้ได้
2. สารเคลือบผิวสามารถชักนำให้เกิดความต้านทานที่เพิ่มขึ้นในมะม่วงได้หลังการเคลือบผิว



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

มะม่วง

มะม่วงมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Mangifera indica* L. อยู่ในวงศ์ Anacardiaceae เป็นพืชใบเลี้ยงคู่มีลักษณะลำต้นเป็นไม้ยืนต้น ลำต้นตั้งตรง มีกิ่งก้านแผ่ออกมาเป็นพุ่ม เป็นพืชที่มีรากแก้ว มีใบเป็นลักษณะใบเดี่ยว (Simple leaf) มีรูปร่างหลายแบบ เช่น รูปหอก (lanceolate) รูปรี (elliptic) เรียวยาว (oblong) แผ่นใบหนาแข็ง ก้านใบยาว โคนก้านบวม ขอบใบเรียบ (entire) ไม่มีขน ลักษณะดอกจะออกดอกเป็นช่อแบบ panical ที่ปลายกิ่ง ในช่อดอกประกอบไปด้วยดอกเพศผู้และดอกสมบูรณ์เพศ ผลของมะม่วงเป็นแบบ fleshy drupe สำหรับมะม่วงในประเทศไทยออกดอกช่วงเดือนธันวาคมถึงเดือนมกราคมและเก็บผลผลิตช่วงเดือนมีนาคมถึงเมษายน ผลมะม่วงสามารถนำมารับประทานได้ทั้งดิบและสุก โดยมะม่วงที่นิยมทานผลดิบได้แก่ พันธุ์เขียวเสวย แรด ฟ้าลั่น เป็นต้น และมะม่วงที่นิยมรับประทานทานผลสุกได้แก่ พันธุ์อกร่อง นวลจันทร์ และน้ำดอกไม้ เป็นต้น ซึ่งมะม่วงที่มีการส่งออกมากที่สุดคือ มะม่วงน้ำดอกไม้ (ยุทธการ กองวงศ์ และคณะ, 2565)

มะม่วงน้ำดอกไม้เป็นมะม่วงรับประทานสุก (ภาพ 1) ต้นเป็นพุ่มค่อนข้างเล็ก ใบมีขนาดใหญ่ ยาว มีผลขนาดปานกลาง ขนาดผลเฉลี่ยยาว 16 เซนติเมตร กว้าง 7.2 เซนติเมตร ทรงผลรูปไข่ค่อนข้างยาว ขั้วผลอูมรี ปลายผลแหลม ผิวเรียบ เปลือกค่อนข้างบาง ประมาณ 0.11 เซนติเมตร บอบง่าย ผลดิบมีสีเขียวนวล รสเปรี้ยวจัด ผลแก่มีสีเขียวอ่อน เนื้อนวล เห็นท่อน้ำยางบริเวณผิวชัดเจน เมื่อสุกมีสีเหลือง เนื้อแน่นและละเอียด ฉ่ำน้ำ ไม่มีเสี้ยน กลิ่นหอม เมล็ดบางมาก ใช้เวลาตั้งแต่ออกดอกจนถึงผลแก่ประมาณ 100 วัน น้ำหนักผลประมาณ 280-300 กรัม (ชัยลักษณ์ ตาสุข, 2556)

วิธีการเก็บรักษามะม่วงน้ำดอกไม้

การเก็บรักษามะม่วงมีหลากหลายวิธีซึ่งแต่ละวิธีอาจมีความเหมาะสมแตกต่างกันออกไป โดยก่อนการเก็บรักษามะม่วงต้องอยู่ในสภาพสมบูรณ์ ปราศจากโรคและแมลง หลังจากการเก็บรักษามะม่วงแล้วมะม่วงต้องมีคุณภาพเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค วิธีการเก็บรักษาที่ใช้เก็บรักษามะม่วงได้แก่

1. การเก็บรักษาในห้องเย็นหรือการเก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิต่ำ

การเก็บรักษาในห้องเย็นเพื่อชะลอกระบวนการเมแทบอลิซึมต่างๆ รักษาคุณภาพผลสด และยืดอายุการเก็บรักษา ทั้งนี้การเก็บรักษาผลมะม่วงที่อุณหภูมิต่ำกว่า 10-13 องศาเซลเซียส



ภาพ 1 มะม่วงน้ำดอกไม้

(ที่มา : กรมวิชาการเกษตร, 2566)

เป็นเวลานานอาจทำให้เกิดอาการสะท้านหนาว ซึ่งเป็นอาการผิดปกติที่มีผลทำให้คุณภาพลดลงและมีอายุการเก็บรักษาสั้น

2. การเก็บรักษาในสภาพควบคุมบรรยากาศ

การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและเคมีของมะม่วงเกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วเมื่อเก็บเกี่ยวออกมาจากต้นแล้วจึงทำให้อายุการเก็บรักษาสั้น การเก็บรักษาในสภาพควบคุมบรรยากาศนี้ นิยมใช้กับสภาพอุณหภูมิต่ำ ทำในโรงหรือห้องระบบปิด โดยทั่วไปนิยมควบคุมบรรยากาศในห้องให้มีปริมาณออกซิเจน 2-3 เปอร์เซ็นต์ คาร์บอนไดออกไซด์ 5-8 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับสภาพอุณหภูมิที่ต่ำ 3-5 องศาเซลเซียส

3. การเก็บรักษาในสภาพดัดแปลงบรรยากาศ

การเก็บรักษาในสภาพดัดแปลงบรรยากาศใช้สำหรับการยืดอายุการเก็บรักษาและรักษาคุณภาพของมะม่วง โดยการลดความเข้มข้นของออกซิเจนและเพิ่มความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ ทำให้เกิดสภาพบรรยากาศเฉพาะซึ่งถูกดัดแปลงไปจากสภาพบรรยากาศปกติ ทำให้มีอัตราการหายใจลดลง และการผลิตเอทิลีนช้าลง สามารถชะลอการเน่าเสียและการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของมะม่วงได้

4. การใช้สารเคมี

การใช้สารเคมีมีวัตถุประสงค์เพื่อลดการเน่าเสียจากเชื้อสาเหตุของโรค ชะลอการสุก และชะลอการเสื่อมสภาพของผลมะม่วง โดยการกำจัดหรือยับยั้งการผลิตเอทิลีน สารเคมีที่มีการนำมาใช้ในการยืดอายุการเก็บรักษา เช่น 1-methylcyclopropene (1-MCP) เป็นต้น

5. การใช้สารสกัดจากธรรมชาติ

ในปัจจุบันมีการเลือกใช้สารสกัดจากธรรมชาติเพื่อความปลอดภัยและไม่มีสารพิษตกค้าง โดยมีการใช้สมุนไพรที่มีสารสำคัญต่าง ๆ ที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราและเชื้อแบคทีเรีย เพื่อช่วยชะลอการเกิดโรคหลังการเก็บเกี่ยว

6. การเคลือบผิวผล

การเคลือบผิวผลไม้เพื่อลดการสูญเสียน้ำเพื่อป้องกันการเหี่ยวผิวของผลไม้และเพื่อให้ผลไม้มีความเงางาม ลดอัตราการหายใจของผลและยืดอายุการเก็บรักษา แต่การใช้สารเคลือบผิวผลมะม่วงจะเป็นตัวจำกัดการแลกเปลี่ยนก๊าซระหว่างผลมะม่วงกับบรรยากาศรอบ ๆ ทำให้มะม่วงมีการสะสมคาร์บอนไดออกไซด์ภายในเพิ่มขึ้นและไม่มีออกซิเจนใช้อย่างเพียงพอ สภาพดังกล่าวจะทำให้มะม่วงสุกช้า ถ้าสารที่ใช้เคลือบผิวบางมากเกินไปจะไม่มีผลต่อการชะลอการสุกของผลไม้ ถ้าสารที่ใช้เคลือบผิวหนาเกินไปจะทำให้ผลมะม่วงไม่สุกหรือเกิดการสุกที่ผิดปกติ ซึ่งอาจสร้างความเสียหายให้ผลมะม่วงได้ (ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว, 2566)

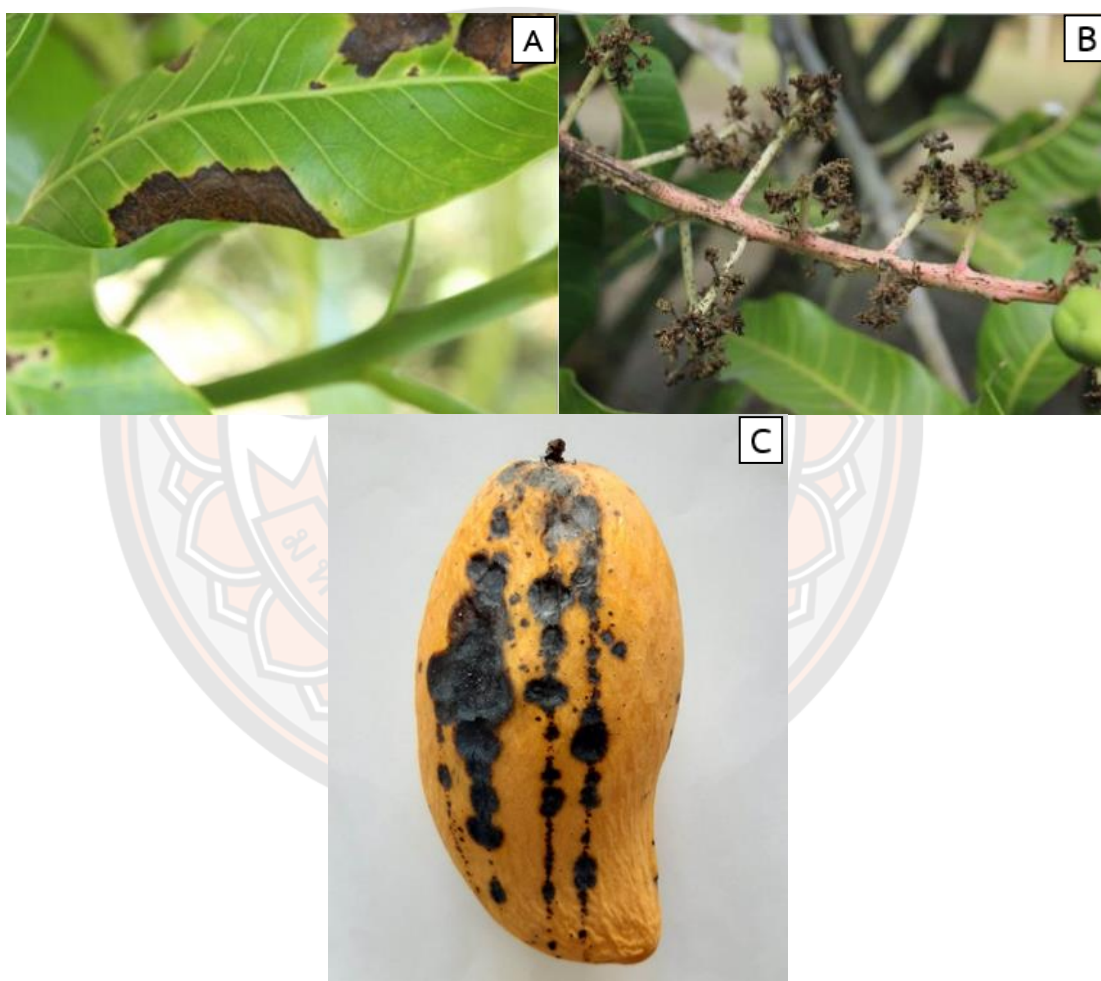
7. การฉายรังสี

การใช้รังสีแกมมาเป็นวิธีที่ใช้กำจัดโรคและแมลงที่อาจปนเปื้อนมากับผลผลิต ชะลอการเน่าเสียของผลมะม่วง และยืดอายุการเก็บรักษา การใช้รังสีแกมมานอกจากมีผลโดยตรงต่อการชะลอการสุกของผลมะม่วงยังสามารถลดการเน่าเสียของผลมะม่วงได้อีกด้วย โดสที่เหมาะสมสำหรับผลมะม่วงค่อนข้างต่ำคือ 25-50 krad แต่ถ้ามีการฉายรังสีที่ใช้โดสสูงเกินไป อาจจะทำให้ผลมะม่วงได้รับความเสียหาย เช่น ผิวและเนื้อเป็นสีน้ำตาลคล้ำเป็นจุด เน่าเสียง่าย หรือรสชาติผิดปกติ (สายชล เกตุษา, 2531)

โรคแอนแทรกโนส (Anthracnose disease)

โรคแอนแทรกโนส เป็นโรคพืชที่ทำให้เกิดความเสียหายต่อผลผลิตทั้งปริมาณและคุณภาพ มีเชื้อราที่มีความสำคัญเป็นสาเหตุของโรคแอนแทรกโนส อยู่ในสกุล *Colletotrichum* ทำให้เกิดความสูญเสียกับพืชเศรษฐกิจ มีพืชอาศัยมากถึง 470 สกุล ทั้งพืชตระกูล ถั่ว หย้า ผัก ไม้ผลและไม้ประดับ ทำให้ผลผลิตเน่าเสียอายุการเก็บเกี่ยวสั้น ไม่สามารถขนส่งระยะไกลได้ การระบาดของโรคเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วและรุนแรงในเขตที่มีอุณหภูมิและความชื้นสูง เชื้อราสามารถเข้าทำลายได้ทุกส่วนของพืชตั้งแต่ลำต้น ใบ ก้าน ดอก ผล และเมล็ด

อาการของโรคแอนแทรคโนส อาการที่ใบจะเริ่มจากจุดแผลแห้งเล็ก ๆ สีน้ำตาลแล้วค่อย ๆ เข้มขึ้นขยายออกเป็นวงกลมหรือวงรีซ้อนกันเป็นชั้น ๆ รูปร่างไม่แน่นอน หากอาการรุนแรงใบจะแห้งเหี่ยวและหงิกงอ (ภาพ 2A) หากเกิดที่ช่อดอกทำให้ช่อดอกแห้งมีสีน้ำตาลดำ ก้านดอกสีดำ และทำให้ดอกร่วงโรยในที่สุด (ภาพ 2B) หากเกิดที่ผลอาการของโรคเริ่มแรกจะเป็นจุดเล็ก ๆ สีดำ และจะเห็นชัดเจนในระยะที่ผลเริ่มสุก หรือเมื่อมีความชื้นสูง โดยจุดสีดำจะขยายใหญ่ขึ้นและแผลยุบตัวลงเป็นแอ่งบุ๋ม (ภาพ 2C) พบการสร้างกลุ่มของสปอร์หรือโคนิเดีย สีส้มหรือสีชมพูเป็นหยดเหลวชั้นบริเวณแผลโรคแอนแทรคโนส (Tangpao et al., 2022)



ภาพ 2 อาการของโรคแอนแทรคโนสที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*

(A) แผลสีน้ำตาลบนใบ (B) ช่อดอกแห้ง (C) จุดแผลสีดำผลมะม่วง

(ที่มา : Rattanakreetakul et al., 2023)

โรคแอนแทรคโนสมีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ซึ่งเชื้อราชนิดนี้จัดเป็น hemibiotrophic ascomycete (O'Connell et al., 2012) มีรายงานการติดเชื้อในพืชหลายชนิด ได้แก่ พริก อะโวคาโด มะม่วง องุ่น แก้วมังกร สตรอเบอร์รี่ กล้วย และมะเขือเทศ เป็นต้น ซึ่งโรคแอนแทรคโนสก่อให้เกิดความเสียหายต่อผักและผลไม้ที่ติดเชื้อเป็นอย่างมาก โดยเชื้อราสามารถเข้าทำลายได้ทุกระยะการเติบโตของพืช และเข้าทำลายได้ทุกส่วนของพืช ซึ่งเชื้อราชนิดนี้เป็นเชื้อราแบบแฝง (Latent) โดยสปอร์ของเชื้อราจะเข้าทำลายโดยตรงผ่านช่องเปิดตามธรรมชาติ เช่น เลนติเซล (Lenticels) ปล้ำยก้าน และช่องว่างระหว่างก้านผล ซึ่งสปอร์จะยึดติดกับผิวพืชและรอสภาพที่เหมาะสมจึงจะเริ่มสร้างแอฟเพรสซอเรียมเจาะผ่านผนังเซลล์แล้วแพร่กระจายอย่างรวดเร็วทั่วเนื้อเยื่อทั้งภายในและภายนอกเซลล์ (Perfect et al., 1999) ซึ่งโดยส่วนใหญ่อาการบนผลมักจะแสดงออกหลังการเก็บเกี่ยวซึ่งเชื้อราจะอาศัยพืชระหว่างการสุกและการเสื่อมสภาพของผลไม้ ประกอบกับเชื้อราที่เข้าทำลายแบบแฝงมีความสามารถต้านทานสารยับยั้งเชื้อราในพืช อีกทั้งยังการมีเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของผลไม้ เช่น ปริมาณน้ำตาลที่เพิ่มมากขึ้น ค่า pH ที่เหมาะสมองค์ประกอบของผนังเซลล์ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงเหล่านี้สามารถกระตุ้นให้เชื้อรามีการเจริญเติบโตได้ ส่งผลให้เกิดอาการเน่าเสียในที่สุด ส่งผลให้ปริมาณและคุณภาพของผลไม้ลดลง (Chowdhury and Rahim, 2009) เชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* มีข้อมูลการจัดจำแนก (Ajay Kumar, 2014) ตามหมวดหมู่ได้ดังนี้

Kingdom: Fungi

Division: Ascomycota

Class: Sordariomycetes

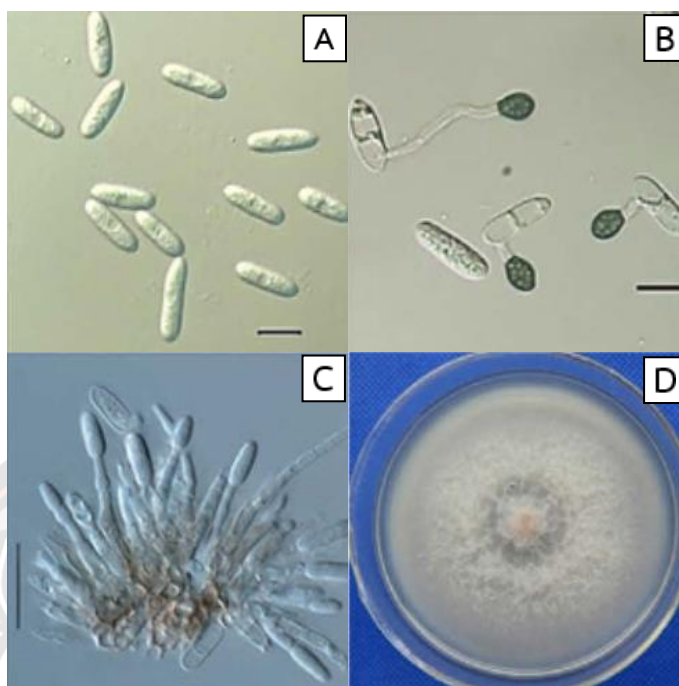
Order: Glomerellaceae

Family: Glomerellaceae

Genus: *Colletotrichum*

Species: *C. gloeosporioides*

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่าเส้นใยฝังอยู่ใต้ผิวพืช เส้นใยแตกกิ่งก้านมีผนังกัน โคนิเดียเกิดบนโคนิดีโอพอร์ ซึ่งกำเนิดจาก stroma cell ของโครงสร้างสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ เชื้อราจะสร้างโคนิเดีย ขึ้นมาเป็นกลุ่ม ๆ เป็นเซลล์เดี่ยว ผนังบาง รูปร่างรูปไข่ หรือยาวรี หัวมนท้ายมน ขนาดความยาว 7-20 ไมครอน (ภาพ 3A-C) บนรอยโรคของใบ กิ่ง ก้าน ก้านดอก หรือ ผล (Neto et al., 2022) และเมื่อนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อลักษณะทางสัณฐานวิทยาเส้นใยของเชื้อราจะมีสีขาวหรือสีขาวอมเทา (ภาพ 3D)



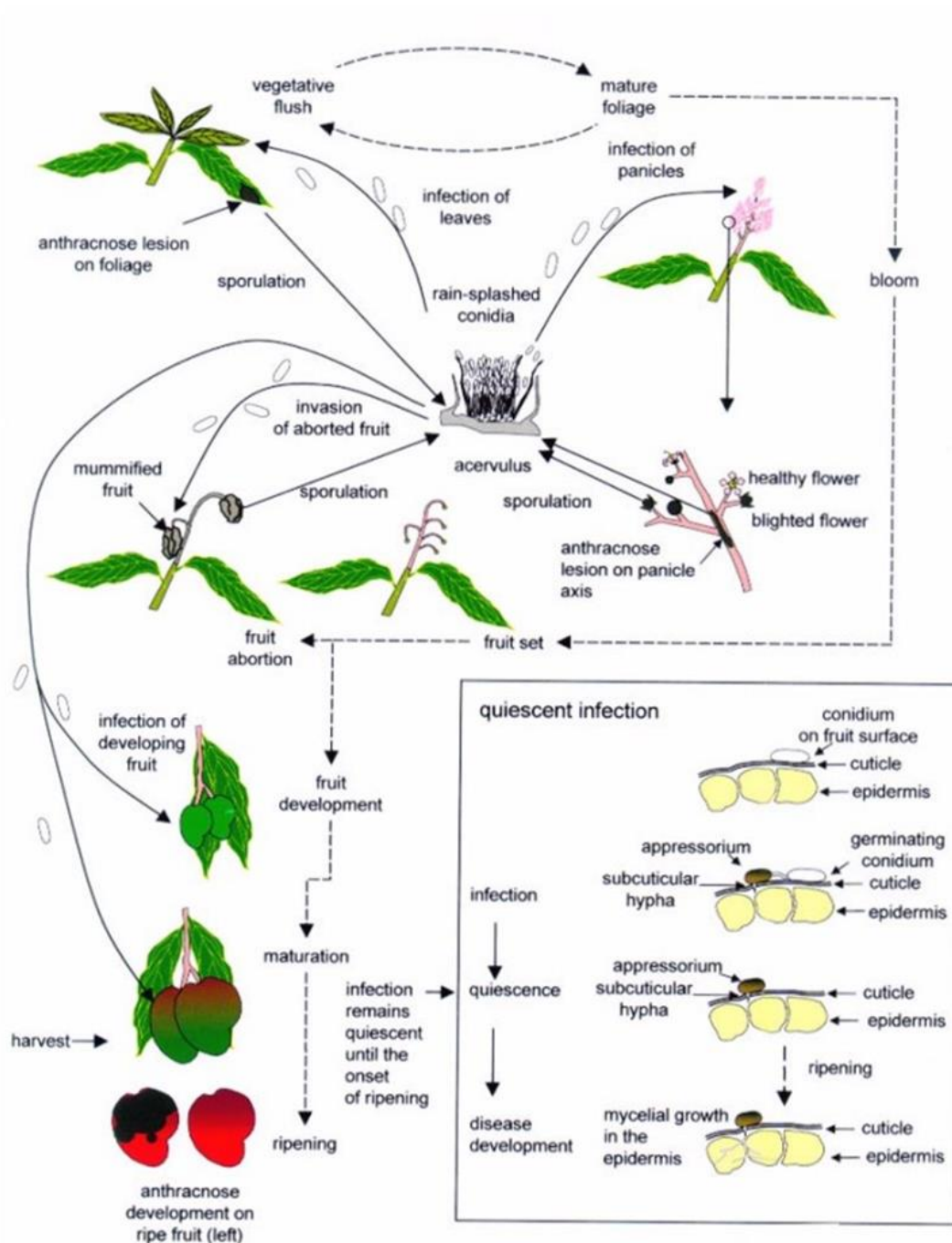
ภาพ 3 ลักษณะเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA
 (A) โคนิเดียมของเชื้อรา (B) การงอกแอฟเพรสเซอร์ของโคนิเดียม (C) โคนิไดโอสปอร์
 (D) โคลนินของเชื้อราที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

(ที่มา : Liu et al., 2016)

วงจรชีวิตของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*

การเข้าทำลายของเชื้อรา จะสามารถเข้าทำลายได้ทุกส่วนของพืช โดยแหล่งที่มาของเชื้อจะพบได้ตามเศษซากพืชหรือบริเวณใบพืชที่มีการติดเชื้อ โดยวงจรชีวิตของโรคจะเริ่มต้นด้วยการแพร่กระจายของโคนิเดียม ซึ่งแพร่กระจายโดยอาศัยการพาของน้ำฝนในช่วงฝนตกและแมลงช่วยในการแพร่ระบาด (Kankam et al., 2022) และสามารถเข้าทำลายทุกส่วนของพืชได้โดยไม่มีบาดแผล หรือมีบาดแผล ส่งผลให้มีการติดเชื้อเกิดขึ้น เมื่อโคนิเดียมตกลงบนผิวพืช จะเริ่มงอกและสร้างเส้นใย (germ tube) จากนั้นจะมีการเปลี่ยนแปลงเป็นแอฟเพรสเซอร์ (appressorium) (O'Connell et al., 2000) ขึ้นภายใน 12-14 ชั่วโมงหลังโคนิเดียมตกลงบนพื้นผิว จากนั้นจะเริ่มสร้างเข็มแทง (penetration peg) เพื่อเจาะเข้าสู่ชั้นคิวติเคิลโดยตรง ซึ่งการสร้างเส้นใยของเชื้อราจะขึ้นอยู่กับการพัฒนาของผลและบริเวณที่มีการติดเชื้อ ทำให้บริเวณที่ติดเชื้อเน่าเสียเกิดขึ้น (ภาพ 4) (Dinh et al., 2003) หากติดเชื้อบริเวณผลที่บริเวณเปลือกของผลไม่มีการเคลือบด้วยแว็กซ์ ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ เชื้อราจะพักตัวหรืออยู่ในสถานะแฝงบริเวณเปลือกของผล แต่เมื่อผลไม่เริ่มสุก

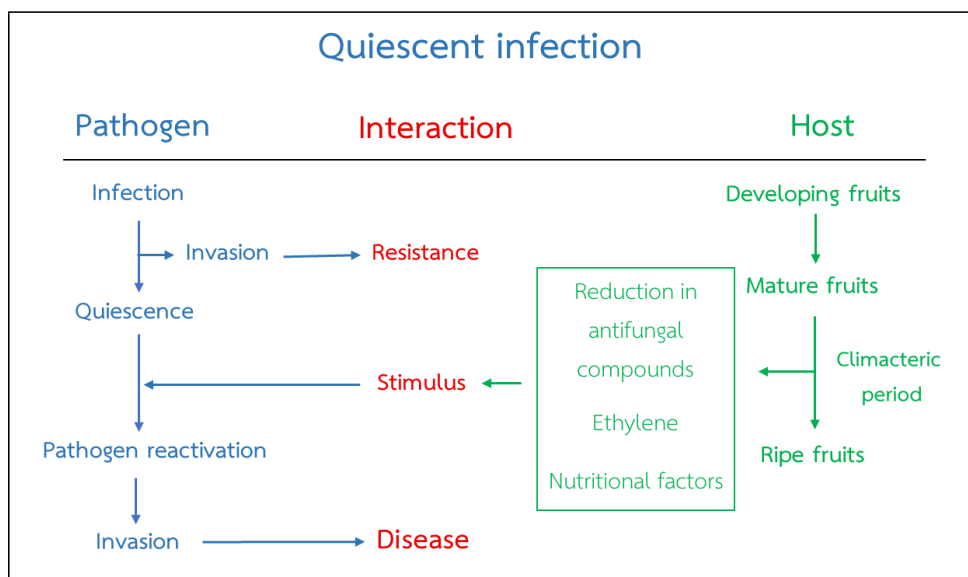
การสร้างสารต่อต้านเชื้อรา หรือกลไกการป้องกันตัวเองของพืชจะลดลง เชื้อราจะมีการพัฒนาเพื่อเข้าไปทำลายภายในเซลล์พืชอย่างรวดเร็วส่งผลให้ผลไม้เน่าเสียในที่สุด (Arauz, 2000) (ภาพ 5)



ภาพ 4 วงจรชีวิตของโรคแอนแทรกโนสบนผลมะม่วง

—>; วงจรชีวิตของโรค - - - ->; การพัฒนาของมะม่วง

(ที่มา : Luis Felipe Arauz, 2000)



ภาพ 5 การเข้าทำลายของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* บนผลไม้
(ที่มา : Luis Felipe Arauz, 2000)

การควบคุมโรคแอนแทรคโนส

การป้องกันและกำจัดโรคแอนแทรคโนสที่ดีควรใช้วิธีการป้องกันกำจัดหลายวิธีร่วมกันซึ่งจะสามารถป้องกันและกำจัดโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุด วิธีป้องกันและกำจัดโรคสามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่

1. วิธีการเขตกรรม โดยตรวจสอบแปลงปลูกอย่างสม่ำเสมอ หากพบการติดเชื้อให้ตัดแต่งและเก็บส่วนที่เป็นโรคทำลายโดยวิธีการเผาทำลายเพื่อลดแหล่งแพร่เชื้อ กำจัดวัชพืชบริเวณแปลงปลูกและตัดแต่งกิ่งทรงพุ่มให้โปร่งเพื่อให้อากาศถ่ายเทได้สะดวก

2. การป้องกันและกำจัดโรคด้วยชีววิธี เป็นการใช้อินทรีย์ปฏิปักษ์บางชนิดที่มีอยู่ในธรรมชาติมาควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช โดยจะต้องมีการใช้อย่างสม่ำเสมอและต้องใช้เวลาพอสมควร ทั้งนี้จะต้องเลือกใช้สารจุลินทรีย์ที่เหมาะสมกับเชื้อราสาเหตุโรคที่ต้องการป้องกันกำจัดเพื่อประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดที่ดี นอกจากนี้ยังจะต้องการปรับสภาพแวดล้อมให้เหมาะสมอีกด้วย

3. การป้องกันกำจัดที่โรคด้วยสารเคมี ในปัจจุบันเกษตรกรมีการใช้สารเคมีในการป้องกันและกำจัดโรคมมากขึ้น ซึ่งสารเคมีที่ใช้แบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ สารเคมีประเภทไม่ดูดซึม (non-systemic) และสารเคมีประเภทดูดซึม (systemic) สารเคมีประเภทดูดซึมเมื่อฉีดลงบนผิวของพืชจะถูกดูดซึมเข้าไปภายในเนื้อเยื่อพืช และไหลเวียนในท่อไซเลม และโฟลเอ็ม ซึ่งมีประสิทธิภาพค่อนข้างที่เฉพาะเจาะจงต่อเชื้อรา (มณีทิพย์ ขุนทอง, 2562) สารเคมีประเภทดูดซึมที่นำมาใช้ป้องกันและ

กำจัดโรคแอนแทรกคโนสคือ กลุ่ม Benzimidazole ได้แก่ Thiabendazole, Carbendazim, Benomyl, Mecarbenzid และ Fuberidazole เพราะสามารถควบคุมโรคที่มีสาเหตุจากเชื้อราชั้นสูงได้ดี ซึ่งจากการศึกษาพบว่า Carbendazim สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ได้ โดยกลไกการออกฤทธิ์ของสาร Carbendazim จะไปยับยั้งการเกิดพอลิเมอร์ โดยจับกับอาร์จินินที่ β -tubulin และออกฤทธิ์โดยการรบกวนการแบ่งเซลล์ของเชื้อรา (Leng et al., 2014) โดย Carbendazim มีอิทธิพลต่อการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ แต่โปรตีนและอาร์เอ็นเอไม่ถูกทำลาย โดยสารเคมีจะไปรบกวนการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส เพราะทำให้เกิดเซลล์ใหม่ที่มี 1 นิวเคลียสและมีขนาดใหญ่ แต่ไม่มีการแบ่งเซลล์ ซึ่งมีฤทธิ์คล้ายสารโคลชิซินที่ไปยับยั้งหน่วยย่อยของไมโทคอนเดรียที่จะสร้างเส้นใยสปินเดิลจึงทำให้โครมาทิดไม่สามารถแยกออกจากกันไปเป็นนิวเคลียสใหม่ได้ (ธรรมศักดิ์ สมมาตย์, 2528) ทำให้สารเคมีดังกล่าวสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราได้ดี แต่การใช้สารเคมีมักพบปัญหาสารเคมีตกค้างในสิ่งแวดล้อม ซึ่งสารเคมีดังกล่าวเป็นอันตรายต่อสัตว์น้ำ จุลินทรีย์ในดินและมีผลทำให้ประชากรของไส้เดือนดินลดลง (Daam et al., 2020) อีกทั้งยังพบว่าสารเคมี Carbendazim ส่งผลต่อสุขภาพของมนุษย์ ซึ่งส่งผลให้เกิดการกลายพันธุ์ การทำงานของตับที่ผิดปกติ มีพิษต่อตัวอ่อน ภาวะมีบุตรยาก และผลข้างเคียงที่พบบ่อยเมื่อได้รับสารเคมีคือการทำงานที่ผิดปกติของต่อมไทรอยด์ ความเป็นพิษต่อตับและไต นอกจากนี้ยังพบว่าสารเคมีก็เป็นอีกหนึ่งในสาเหตุของความผิดปกติของระบบประสาท (Sharma et al., 2022)

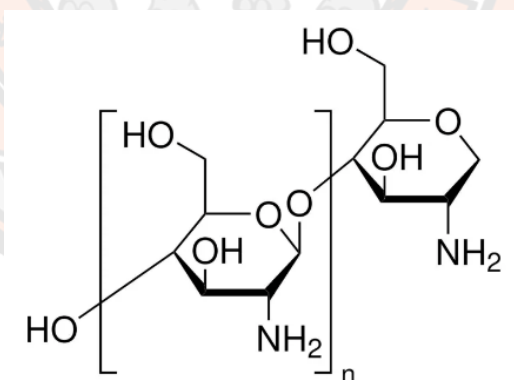
สารเคลือบผิวผลไม้

สารเคลือบผิวหรือฟิล์มเคลือบผิว เป็นสารประกอบชั้นบาง ๆ ที่เคลือบบนผิวผลไม้ เพื่อปรับปรุงลักษณะของผลไม้ ยืดอายุการเก็บรักษา ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ และเพื่อให้เกิดผลิตภัณฑ์ใหม่ อยู่เสมอ ซึ่งในปัจจุบันสารที่นำมาใช้ผลิตสารเคลือบผิวผลไม้มี 2 ประเภท คือ สารจากธรรมชาติ และสารเคมีสังเคราะห์ สารจากธรรมชาติมีทั้งแบบที่ทำมาจากพืชและสัตว์ แบบที่ทำมาจากพืช ได้แก่ ไชคาร์บูบาเป็นไขที่สกัดจากใบปาล์ม เป็นต้น ส่วนสารเคลือบที่ทำมาจากสัตว์ที่นิยมนำมาผลิตเป็นสารเคลือบ ได้แก่ ไคโตซาน จากกระดองปู กระดองหมีก เปลือกกุ้ง บีแวกซ์ ที่ได้มาจากผึ้ง และเซลแลคจากมูลผึ้ง (Jutamat, 2016)

ไคโตซาน (N-acetyl-D-glucosamine) เป็นโพลีแซคคาไรด์ที่ได้มาจากสัตว์พวก Crustacean shells มีการลดลงของหมู่อะซีทิลหรือเรียกว่า deacetylation (ภาพ 6) ทำให้ไคตินเปลี่ยนแปลงเป็นไคโตซาน (Li et al., 1992) ไคโตซานสามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติไม่เป็นพิษพืช สัตว์ และสิ่งแวดล้อม อีกทั้งยังมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของก่อเชื้อโรคได้ การยับยั้งเชื้อสาเหตุของโรคพืช ได้แก่ เชื้อไวรัส แบคทีเรีย และเชื้อราบางชนิด โดยไคโตซานจะจดจำจุลินทรีย์ที่เข้ามาบุกรุกด้วย

โปรตีนตัวรับโปรตีนตัวรับจะได้รับการกระตุ้นให้เกิดการต้านทานต่อจุลชีพ เมื่อพบส่วนประกอบต่าง ๆ ในจุลชีพ เช่น โคตินในผนังเซลล์ของเชื้อราและแฟลกเจลล่า เป็นต้น

ไคโตซานออกฤทธิ์เป็นตัวกระตุ้นในกระบวนการเกิดระบบป้องกันตัวเองของพืชตามธรรมชาติ ทำให้พืชเกิดความต้านทานโรคได้ มีการศึกษาเกี่ยวกับศักยภาพของไคโตซาน พบว่าการสเปรย์ด้วยสารละลายไคโตซานไม่ส่งผลเสียต่อคุณภาพการเก็บรักษาชมพู อีกทั้งมีแนวโน้มในการช่วยลดการสูญเสียน้ำหนัก และรักษาความสดได้ (ปรารงค์ทอง กวานห้อง และเบญจมาศ รัตนชินกร, 2557) นอกจากนี้ยังพบว่าไคโตซาน 1% สามารถยืดอายุการเก็บรักษาพุทราได้ โดยไคโตซานที่เคลือบบนผิวของผลไม้สามารถชะลอการสูญเสียน้ำหนัก ความแน่นเนื้อ และช่วยชะลอการเน่าเสียของพุทราได้ (Hesami et al., 2021) นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้ไคโตซาน 1% ร่วมกับการจุ่มน้ำร้อนสามารถช่วยลดการสูญเสียน้ำหนักและช่วยควบคุมการเกิดโคแอนแทรกคโนสในมะม่วงได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยพบเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันตนเองของพืช รวมไปถึงกิจกรรมของ Peroxidase และ Catalase ก็ยังเพิ่มขึ้นอีกด้วย (Khalil et al., 2022) โดยไคโตซานสามารถกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ chitinase และ β -1,3-glucanase ที่ส่งผลให้เกิดการต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา *Plasmopara halstedii* สาเหตุโรคราน้ำค้างในทานตะวัน (Nandeeshkumar et al., 2008) และยังพบว่าไคโตซานมีบทบาทสำคัญในการต้านทานเชื้อรา *Botrytis cinerea* ที่ก่อให้เกิดโรคในผลสุกของสตรอว์เบอร์รี่และองุ่นได้อีกด้วย (Peian et al., 2021)



ภาพ 6 โครงสร้างทางเคมีของไคโตซาน

(ที่มา : Merck, 2023)

มะระขี้นก (Bitter melon)

1. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของมะระขี้นก

มะระขี้นก (*Momordica charantia* L.) จัดอยู่ในวงศ์ Cucurbitaceae (ภาพ 1) มีชื่อเรียกอื่น ๆ ได้แก่ ผักเหี้ย มะห้อย สุพาเต ผักไห้ มะไห้ มีชื่อสามัญหลายชื่อ ได้แก่ balsam pear, bitter

gourd, bitter cucumber, bitter melon มะระขึ้นกมีถิ่นกำเนิดในเขตร้อนแถบทวีปแอฟริกา ต่อมาได้มีการปลูกในแถบตะวันออกของประเทศอินเดีย แถบตอนใต้ของประเทศจีน แหลมมลายู อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ และไทย (สุมาลี ชื่นวัฒนา, 2542)



ภาพ 7 ลักษณะทั่วไปของมะระขึ้นก
(ที่มา : บ้านสวนพรสวรรค์, 2564)

มะระขึ้นกเป็นไม้เถาล้มลุก มีระบบรากเป็นรากแก้ว (tap root system) ลำต้นเป็นไม้เนื้ออ่อน สีเขียว มีสัน 5 เหลี่ยมเรียบเป็นร่องตื้น ๆ ตามแนวยาว มีขนปกคลุม มีมือเกาะ (tendrils) ที่เจริญออกมาจากส่วนของข้อเป็นเส้นขดเกลียว มีการเจริญเติบโตแบบเถาเลื้อย พันเกี่ยวกับต้นไม้อื่น ใบเป็นใบเดี่ยว มีขนปกคลุมโดยเฉพาะที่เส้นใบทั้ง 2 ด้าน โคนใบเว้ารูปหัวใจ ขนาดใบกว้างและยาว 5-12 เซนติเมตร ขอบใบเว้าเป็นแฉกลึกมี 5-7 หยัก ปลายใบแหลมมีติ่งขอบใบเป็นคลื่นเล็ก ๆ การติดของใบบนต้นเป็นแบบสลับ ก้านใบยาว 1-7 เซนติเมตร ดอกเป็นดอกเดี่ยว (solitary) ไม่สมบูรณ์เพศ ออกดอกตามซอกใบและปลายยอด สีเหลืองอ่อนรูปประฆัง มี 5 กลีบ กลีบบางซี่ง่าย กลีบเลี้ยงมี 5 กลีบ สีเขียวอ่อน ปลายกลีบสั้น ดอกเพศผู้และดอกเพศเมียอยู่คนละดอกลักษณะผลเป็นผลเดี่ยว ผลเป็นสดแบบ pepo ซึ่งเป็นผลแบบ berry มีรูปร่างคล้ายกระสวยสั้น ๆ ผิวขรุขระ ผลยาว 4-6 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2-5 เซนติเมตร ผลอ่อนมีสีเขียวอ่อนไปจนถึงสีเขียวเข้ม เนื้อผลมีสีขาว เมื่อผลสุกจะมีสีเหลืองอมส้มหรือสีเหลืองอมแดง เนื้อผลสีเหลืองอมส้มและปลายผลแตก

อ้าออก ลักษณะเมล็ดมีลักษณะแบน สีเหลืองอ่อนฝังอยู่ในเนื้อผล เมื่อผลสุกเมล็ดจะถูกหุ้มด้วย extracarpellary tissue ที่มีลักษณะสีแดง (พรทิพย์ เต็มวิเศษ และคณะ, 2558)

2. องค์ประกอบทางเคมีในมะระขี้นก

ส่วนต่าง ๆ ของมะระขี้นกประกอบด้วยกรดอะมิโนหลายชนิด เกลิโอแร่ วิตามิน เอนไซม์ กรดอินทรีย์ และสารทุติยภูมิ (Secondary metabolite) หลายกลุ่ม ดังนี้

ใบ พบ charantin (b-sitosterol b-D-glucoside และ 5,25 stigmastadien 3b-ol-b-D-glucoside), polysaccharide, terpenoids, alkaloids, saponins, carbohydrates, glycosides, momordicin I, II, III, proteins, flavonoids, phenolic compound, amino acids, phytosphingosine, α - momorcharins and β - momorcharins (Ingle and Kapgatte, 2018)

เนื้อผล พบสารประกอบด้วย alkaloids, proteins, phenolic, glycosides, carbohydrates, cardiac glycoside, amino acids, flavonoids, charantin, terpenoids, steroids, saponins, cholesterol, momordicoside K, momordicin, α - momorcharins and β - momorcharins (Supraja et al., 2015)

เมล็ด พบสารประเภทโปรตีนหลายชนิด ได้แก่ charantin, momordin, momordica charantia agglutinin, momordica charantia lectin, momordica charantia inhibitor, MAP30, α and β - momorcharins และ amino acids เช่น α -aminobutyric acid และมีสารประเภท ไตรเทอร์ปีน ได้แก่ momordicosides A-E charantin และสารกลุ่มซาโปนิน (Oragwa Leonard et al., 2013)

ราก พบสารแอลคาลอยด์ชนิดหนึ่งชื่อว่า momordicin และกลุ่มซาโปนิน (Kumar et al., 2010)

3. การใช้ประโยชน์

มะระขี้นกเป็นผักพื้นบ้านของไทย ส่วนใหญ่ใช้ผลอ่อน ยอดอ่อน ดอก มาลวก ต้ม รับประทานกับน้ำพริกต่าง ๆ เพื่อช่วยให้เจริญอาหาร ในตำรายาไทยนำส่วนต่าง ๆ มารักษาโรคได้หลายโรคดังนี้

ใบ มีสารรสขมที่ชื่อว่า momordicin ใช้ใบในการรักษาโรคเบาหวาน ความดันโลหิตสูง ฟอกเลือด แก้บิด แก้ไอ แก้ไข้ เป็นยาพอกรักษาโรคปวดในข้อ ยาขงของใบใช้ขับพยาธิเข็มหมุดและเป็นยาระบายอ่อน ๆ

ผลอ่อนมะระขี้นกมีคุณค่าทางโภชนาการสูงสามารถนำมารับประทานเป็นอาหารและยาได้ ช่วยให้เจริญอาหารเนื่องจากมีสารที่มีรสขม ช่วยกระตุ้นน้ำย่อยให้ออกมามากขึ้น อีกทั้งยังมีประโยชน์

ในทางยาด้วย เช่น แก้ไข้ดับพิษร้อน ช่วยเจริญอาหาร แก้ปากเปื่อย แผลในปาก ขับพยาธิ บำรุงน้ำดี แก้ไอ้เสบ เป็นต้น (Chekka and Mantipelly, 2020)

คุณสมบัติทางเภสัชวิทยาของมะระขี้นกที่ได้รับความสนใจในปัจจุบันนี้คือ มีคุณสมบัติในการช่วยลดน้ำตาลในเลือด ต้านมะเร็ง และคุณสมบัติต้านเชื้อไวรัสเอชไอวี ซึ่งพบว่ากลุ่มสารโปรตีนที่อยู่ในเมล็ดของมะระขี้นกมีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อเอชไอวีในหลอดทดลอง เป็นโปรตีนชนิด Ribosome Inactivating Protein (RIPs) ที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุล 30 kDa โปรตีนมีชื่อว่า MAP 30 (Momordica Anti HIV Protein) ยับยั้งการติดเชื้อระหว่างเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ติดเชื้อเอชไอวีกับเซลล์เม็ดเลือดขาวใหม่ นอกจากนี้ยังมีผลยับยั้งการแบ่งเซลล์ของเชื้อเอชไอวี โดยยับยั้งเอนไซม์ HIV Reverse Transcriptase และเอนไซม์ Integrase รวมถึงยับยั้งการสร้างโปรตีน (viral core protein) ของ HIV อีกด้วย (Lee-Huang et al., 1995)

Pathogenesis-related protein (PR)

1. การชักนำการทำงานของโปรตีน PR

ความต้านทานโรคในพืชที่เพิ่มมากขึ้นหลังจากถูกรุกรานด้วยเชื้อก่อโรค โดยพืชจะสร้างสารป้องกันโดยผลิตสารเคมีที่เป็นพิษต่อเชื้อโรคโดยตรง เพื่อป้องกันไม่ให้เชื้อลุกลามไปยังบริเวณอื่น ๆ (Agrios, 2005) ปฏิกริยาดังกล่าวเรียกว่า Hypersensitive response (HR) ซึ่งจะส่งสัญญาณโมเลกุล Salicylic acid (SA) ไปกระตุ้นการสังเคราะห์และการแสดงออกของยีนที่ถอดรหัสให้เกิดสังเคราะห์โปรตีน Pathogenesis-related (PR) protein เพื่อชักนำให้พืชเกิดการต้านทานต่อโรค โดยกระบวนการที่ชักนำให้พืชเกิดความต้านทานต่อเชื้อโรคโดยการกระตุ้นให้มีการผลิตโปรตีนหรือสารเคมีที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อโรค กระบวนการนี้เรียกว่า Systemic Acquired Resistance (SAR) ซึ่งพืชสามารถชักนำให้เกิดการต้านทานต่อโรคได้โดยไม่จำเพาะเจาะจงและมีความสามารถต้านทานเชื้อโรคได้ทั้งบริเวณที่ถูกบุกรุกไปจนถึงบริเวณที่ไม่ได้สัมผัสกับเชื้อโรคโดยตรง ระบบป้องกันตนเองของพืชเริ่มต้นจากกระบวนการจดจำระหว่างพืชกับเชื้อโรคทำให้เกิดการต่อต้านเฉพาะที่ โดยระบบ SAR จะเกิดขึ้นในช่วงเวลาสั้น ๆ ภายหลังจากติดเชื้อโรคแต่จะสามารถคงอยู่ได้เป็นระยะเวลาสั้น ส่งผลให้พืชนั้นมีความต้านทานต่อเชื้อบุกรุกหลาย ๆ ชนิดในเวลาต่อมาได้ จากการศึกษาพบว่าเมื่อพืชมีการเข้าทำลายของเชื้อราจะมีการแสดงออกของยีนที่เปลี่ยนแปลงไป โดยเฉพาะยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตโปรตีนที่ฤทธิ์ในการต้านทานเชื้อราและกลไกการป้องกันตนเองในพืช เช่น ยีน PRs ที่เป็นยีนผลิต Pathogenesis-related protein (PRs) (Antoniw et al., 1980) ที่เป็นโปรตีนขนาดเล็กมีมวลโมเลกุล 10-40 กิโลดาลตัน ซึ่งพืชจะผลิตขึ้นเมื่อถูกกระตุ้นด้วยเชื้อโรคหรือภาวะเครียดต่าง ๆ เช่น ความเครียดจากการได้รับสารเคมีและฮอร์โมนพืชบางชนิด เพื่อป้องกัน

อันตรายแก่ตนเองจากโรคพืช ซึ่ง PR protein สามารถจัดแบ่งออกเป็นทั้งหมด 17 กลุ่ม (Van Loon and Van Strien, 1999) ดังนี้ (ตาราง 1)

ตาราง 1 กลุ่มของ Pathogenesis-related protein

Family	Type member	Properties
PR-1	Tobacco PR-1a	Antifungal
PR-2	Tobacco PR-2	β -1,3-glucanase
PR-3	Tobacco P,Q	Chitinase type I, II, IV, V, VI, VII
PR-4	Tobacco 'R'	Chitinase type I, II
PR-5	Tobacco S	Thaumatin-like
PR-6	Tomato Inhibitor I	Proteinase-inhibitor
PR-7	Tomato P69	Endoproteinase
PR-8	Cucumber chitinase	Chitinase class III
PR-9	Tobacco 'lignin-forming peroxidase'	Peroxidase
PR-10	Parsley 'PR1'	'Ribonuclease-like'
PR-11	Tobacco class V chitinase	Chitinase type I
PR-12	Radish Rs-AFP3	Defensing
PR-13	<i>Arabidopsis</i> THI2.1	Thionin
PR-14	Barley LTP4	Lipid-transfer protein
PR-15	Barley OxOa (germin)	Oxalate oxidase
PR-16	Barley OxOLP	'Oxalate oxidase-like'
PR-17	Tobacco PRp27	Unknown

2.หน้าที่ของโปรตีน PR

2.1 PR-1 proteins

โปรตีน PR-1 จัดอยู่ในกลุ่มที่ 1 ของ Pathogenesis-related protein ถูกสร้างมาจากยีน *PR-1* ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 15-17 kDa และมีความคล้ายคลึงกับ superfamily ของ cysteine-rich proteins โดยโปรตีนกลุ่มนี้มีลักษณะเด่นในด้านการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์และถูกใช้เป็น

เครื่องหมายเพื่อบ่งบอกสภาวะการเกิดระบบ SAR ในพืช (Hong et al., 2005) ศักยภาพของ PR-1 ที่จะทำให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์เชื้อราที่ขึ้นอยู่กับสเตอรอลและความสามารถในการสังเคราะห์ทางชีวภาพของสิ่งมีชีวิต ดังนั้นการป้องกันพืชจึงมุ่งไปที่สเตอรอลของเชื้อโรค ด้วยการผลิตสารต้านเชื้อรา ยาปฏิชีวนะโพลีอินที่จับกับเออร์โกสเตอรอล (ergosterols) ในเยื่อหุ้มเซลล์เชื้อราเพื่อให้เกิดการรื้อไหลของเซลล์ โดยพืชแต่ละชนิดมีโปรตีนที่มีลักษณะคล้าย PR-1 หลายชนิด เช่น *Arabidopsis* ซึ่งแบ่งออกเป็นทั้งหมด 22 กลุ่ม แต่พบว่าการแสดงออกของ PR-1 (At2G14610) เท่านั้นที่ชักนำอย่างรุนแรงต่อการบุกรุกของเชื้อโรค โปรตีน PR-1a ซึ่งเป็นโปรตีน PR-1 จะถูกหลั่งหรือสะสมอยู่ภายในแวคิวโอล ที่หลั่งออกมาในพื้นที่ระหว่างเซลล์ ซึ่งจะสามารถสัมผัสกับเชื้อโรคได้โดยทันที ในทางตรงกันข้าม P14c คาดว่าจะสะสมอยู่ในแวคิวโอล จะมีการสัมผัสกับเชื้อโรคที่บุกรุกเมื่อมีการสลายของเซลล์เจ้าบ้านเท่านั้น (Gamir et al., 2017)

การศึกษาเกี่ยวกับการแสดงออกของโปรตีน PR-1 ในใบองุ่นหลังการติดเชื้อ *Oidium tuckeri* ผลการทดลองพบว่า มีการแสดงออกของโปรตีน gPR-1 ที่มีลักษณะคล้าย PR-1 ในระดับที่สูงขึ้น (Repka et al., 2015)

2.2 PR-2 proteins

โปรตีน PR-2 มีบทบาทสำคัญในกระบวนการป้องกันตัวเองของพืชจากการเข้าทำลายของเชื้อรา มีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ β -1,3-glucanase ที่ทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นการย่อยสลายพอลิเมอร์ของโปรตีน β -1,3-glucanase แบบ endo-type โดยอาศัยปฏิกิริยา hydrolytic cleavage ทำหน้าที่ย่อยสลายพันธะของ 1,3 β -D-glucosidic linkages ที่เป็นองค์ประกอบหลักของเชื้อราชั้นสูง (Simmons, 1994) ซึ่งเอนไซม์ β -1,3-glucanase สามารถพบได้ในพืชหลายชนิดและมีหลายไอโซฟอร์ม โดยมีค่าความแตกต่างกันของขนาด โครงสร้างปฐมภูมิ และตำแหน่งที่ตั้งในเซลล์ ซึ่งขึ้นอยู่กับ การตอบสนองของพืชเมื่อมีเชื้อโรคเข้ามาทำลาย จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในใบยาสูบ สามารถจำแนกโปรตีน PR-2 เป็น 4 กลุ่ม โดยอาศัยข้อมูลจากลำดับกรดอะมิโน (Gerhard and Frederick, 1999)

การศึกษากการแสดงออกของโปรตีน PR-2 ที่มีบทบาทสำคัญในการป้องกันพืชและการตอบสนองต่อความเครียดทั่วไป ความต้านทานเชื้อราที่เกิดจากเชื้อ *Leptosphaeria maculans* ใน *Arabidopsis* มีการใช้กรด abscisic acid (ABA) ซึ่งส่งเสริมการสะสมของแคลโลสที่เป็นพอลิเมอร์ของ β -1,3-glucan (Oide et al., 2013)

2.3 PR-3 proteins

โปรตีน PR-3 มีสมบัติเป็นเอนไซม์ chitinase มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 26-43 kDa เอนไซม์ chitinase สามารถย่อยผนังเซลล์เชื้อราที่มี chitin เป็นส่วนประกอบ (Watanabe et al., 1999) ที่เกิดจากการเชื่อมต่อกันของ N-acetyl-Dglucosamine ด้วยพันธะ β -1,4-glycosidic bond

(Fukamizo, 2000) เอนไซม์กลุ่มนี้สามารถแบ่งเป็นกลุ่มได้ 5 กลุ่ม ตาม domain ที่พบบนโปรตีน โดยเอนไซม์ chitinase สามารถแยกได้จากสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น เชื้อรา แบคทีเรีย และพืชหลายชนิด ซึ่งเอนไซม์มีบทบาทหน้าที่ที่เกี่ยวข้องในการต้านทานโรคทั้งในมนุษย์และพืช โปรตีน PR-3 ซึ่งเป็น endochitinase มีความสามารถในการแยกสายพอลิเมอร์ของไคตินในผนังเซลล์ของเชื้อราได้ (กรกช นาคคะนอง และจรัสศรี นวลศรี, 2559)

จากการศึกษาบทบาทหน้าที่ในการต้านทานโรคในพืชจะพบว่าเอนไซม์ β -1,3-glucanase และ chitinase ที่อยู่ในตระกูล PR-2 และ PR-3 ตามลำดับ เมื่อพืชถูกเชื้อโรคเข้าทำลาย เช่น เชื้อรา แบคทีเรีย และไวรัสเข้าทำลาย เอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้จะถูกกระตุ้นให้ผลิต glucanase และ chitinase ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา แบคทีเรีย และไวรัส (Jach et al., 1995) และจากการศึกษาใช้ *Trichoderma asperellum* ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคใบจุดในผักกาดหอม พบว่า *T. asperellum* สามารถลดความรุนแรงของโรคได้ โดยมีการกระตุ้นเอนไซม์ β -1,3-glucanase chitinase และ peroxidase ที่เพิ่มมากขึ้น (Baiye et al., 2019) และการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ β -1,3-glucanase และ chitinase ในกลุ่มยีน PR โดยได้ทำการศึกษาในใบยี่ห่วย 2 สายพันธุ์ คือสายพันธุ์ต้านทานโรคและสายพันธุ์อ่อนแอ พบว่าเมื่อทำการเพาะเชื้อบนใบยี่ห่วยแล้วพบกิจกรรมของเอนไซม์ β -1,3-glucanase และ chitinase ในต้นที่ทำการเพาะเชื้อ มากกว่าต้นที่ไม่มีการเพาะเชื้อ โดยกิจกรรมในพันธุ์ที่ต้านทานโรคมีกิจกรรมของเอนไซม์ที่เพิ่มมากขึ้นอย่างรวดเร็วและมากกว่าพันธุ์อ่อนแอ (Bhardwaj et al., 2021)

จากการศึกษาของ Bill et al. (2016) ที่ได้ทำการศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคในอะโวคาโดสายพันธุ์ Hass และ Ryan โดยการรมควันด้วยน้ำมันไทม์และการควบคุมโรคแอนแทรกโนส พบว่าการรมด้วยน้ำมันไทม์สามารถช่วยลดการเกิดโรคแอนแทรกโนสได้ และยังพบว่าน้ำมันไทม์ส่งผลให้มีการแสดงออกของเอนไซม์ β -1,3-glucanase และ chitinase เพิ่มขึ้นทั้งสองสายพันธุ์ ส่งผลให้เกิดความต้านทานโรคแอนแทรกโนสที่เพิ่มมากขึ้นในระยะหลังการเก็บเกี่ยว อีกทั้งมีการศึกษาผลของสารสกัด carvacrol และ eugenol ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Rhizopus stolonifer* และควบคุมการเน่าเปื่อยหลังการเก็บเกี่ยวในลูกพีช ซึ่งสารสกัดทั้งสองชนิดสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราได้ และสามารถลดความรุนแรงของโรคได้โดยพบว่ามี การเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ Peroxidase, Phenylalanine ammonia-lyase, β -1,3-glucanase และ chitinase ในลูกพีช ซึ่งมีส่วนช่วยในการต้านทานโรคที่เกิดขึ้น (Zhou et al., 2018) การแสดงออกของเอนไซม์ β -1,3-glucanase และ chitinase ที่ตอบสนองต่อความเครียดในต้นกล้าถั่วลิสง (*Arachis hypogaea*) ต่อเชื้อรา *Macrophomina phaseolina* ที่ก่อให้เกิดโรคในถั่วลิสง หลังจากเพาะเชื้อราเป็นเวลา 20-40 ชั่วโมง พบว่ามีการชักนำให้มีการแสดงออกของยีนเพิ่มมากขึ้น

(Iwuala et al., 2020) โดยสรุป β -1,3-glucanase และ chitinase มีศักยภาพในการเพิ่มความต้านทานเชื้อรามากขึ้น



บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

ตัวอย่างที่นำมาใช้ในการศึกษา

นำผลสดมะระขึ้นกระยะผลแก่สีเขียว (Mature green stage) ที่ได้รับมาจากตลาดท้องถิ่นในจังหวัดพิษณุโลก ซึ่งเก็บเกี่ยวในช่วงเดือนพฤษภาคม-มิถุนายน พ.ศ. 2565 มาทำล้างทำความสะอาด จากนั้นคว้านเมล็ดของมะระขึ้นกออกแล้วล้างน้ำเปล่าให้สะอาด จากนั้นนำผลมะระขึ้นกมาหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วนำไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

วัสดุอุปกรณ์ เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. อุปกรณ์

- 1.1 จานเพาะเชื้อ (Petridish)
- 1.2 ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol burner)
- 1.3 ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)
- 1.4 กระบอกตวง (Cylinder)
- 1.5 ปีกเกอร์ (Beaker)
- 1.6 มีดผ่าตัด (Surgical blades)
- 1.7 ห่วงเขี่ยเชื้อ (Loop)
- 1.8 เข็มเขี่ยเชื้อ (Needle)
- 1.9 แท่งแก้วคนสาร (Stirrer)
- 1.10 ถาดสแตนเลส (Stainless steel tray)
- 1.11 มีด (Knife)
- 1.12 เครื่องปั่น (Blender)
- 1.13 กระดาษกรอง Whatman No.1
- 1.14 กะละมังพลาสติก (Plastic basin)
- 1.15 หลอดไมโครเซ็นติฟิวก์ (Microcentrifuge tube)
- 1.16 ทิป (Pipette tip)

2. เครื่องมือ

- 2.1 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)
- 2.2 หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave)
- 2.3 ตู้ปลอดเชื้อ (Biological Safety Cabinet)
- 2.4 เครื่องระเหยแบบสุญญากาศ (Rotary Evaporator)
- 2.5 ตู้ดูดควัน (Hood)
- 2.6 เครื่องหมุนเหวี่ยงแรงหนีศูนย์กลาง (Centrifuge)
- 2.7 เตาอบไมโครเวฟ (Microwave)
- 2.8 เครื่องอิเล็กทรอนิกส์
- 2.9 เครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรมชนิดละเอียด (Nanodrop spectrophotometer)
- 2.10 เครื่องผสมสาร (Vortex mixer)
- 2.11 โกร่งบดตัวอย่าง (Pestle & Mortar)
- 2.12 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)
- 2.13 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
- 2.14 เครื่องชั่ง ทศนิยม 2 ตำแหน่ง และทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Analytical balance)
- 2.15 Universal Testing Machine (Instron 5965)
- 2.16 เครื่อง Thermal cycler (AnalytikJena, Germany)

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. สารเคมีสำหรับการแยกเชื้อราและสกัดดีเอ็นเอเชื้อรา
 - 1.1 Potato Dextrose Agar (PDA)
 - 1.2 10% Sodium hypochlorite solution
 - 1.3 Liquid nitrogen
 - 1.4 CTAB buffer (2% CTAB, 1M Tris-Cl, 0.5M EDTA, 5M NaCl, pH 5.5)
 - 1.5 10% Polyvinylpyrrolidone (PVPP)
 - 1.6 Chloroform : isomylalcohol (24:1)
 - 1.7 Phenol : chloroform : isomylalcohol (25:24:1)
 - 1.8 RNase A
 - 1.9 Absolute ethanol
 - 1.10 TE Buffer (10 mM Tris-HCl และ 1 mM EDTA)
 - 1.11 Agarose gel

2. สารเคมีสำหรับการเตรียมสารเคลือบผิว

- 2.1 95% Ethanol
- 2.2 100% Dimethyl sulfoxide (DMSO)
- 2.3 Chitosan (310-375 kDa; Sigma-Aldrich)
- 2.4 Acetic acid (CH₃COOH); (Food grade)

3. สารเคมีสำหรับการสกัดอาร์เอ็นเอ

- 3.1 SDS Extraction buffer (2% SDS, 50mM EDTA, 150mM Tris base, pH 7.5)
- 3.2 β-mercaptoethanol
- 3.3 Liquid nitrogen
- 3.4 10% Polyvinylpolypyrrolidone (PVPP)
- 3.5 Absolute Ethanol
- 3.6 Phenol : chloroform : isomylalcohol (25:24:1)
- 3.7 Chloroform : isomylalcohol (24:1)
- 3.8 6 M LiCl
- 3.9 2M LiCl
- 3.10 70% Ethanol
- 3.11 DEPC-Water
- 3.12 6X DNA loading Dye

การแยกเชื้อราและระบุชนิดเชื้อรา

1. ทำการแยกเชื้อราสาเหตุโรคพืชจากชิ้นส่วนที่ติดเชื้อของผลมะม่วงโดยใช้วิธี Tissue transplant นำส่วนของมะม่วงที่ติดโรคมานำเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 5x5 มิลลิเมตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยการแช่ในสารละลาย 10% Sodium hypochlorite เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างในน้ำกลั่น 3 ครั้ง นำไปซบให้แห้งโดยใช้กระดาษทิชชูที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำชิ้นส่วนของมะม่วงที่ติดโรคไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Potato Dextrose Agar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิ 28±3 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จนเชื้อราสร้างเส้นใย จากนั้นทำการเจือปนสายใยของเชื้อราที่เจริญออกมาจากชิ้นส่วนของพืชไปวางบนอาหารสูตร PDA บนจานใหม่ เพื่อแยกเชื้อให้บริสุทธิ์สำหรับการใช้ในการทดลองต่อไป

2. การจำแนกเชื้อราด้วยสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงเลนส์ประกอบ โดยตรวจดูลักษณะเส้นใย conidia และโครงสร้างอื่น ๆ ของเชื้อรา โดยการทำสไลด์โดยใช้น้ำ (wet mount) และบันทึกภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า

3. การสกัดดีเอ็นเอเพื่อจำแนกเชื้อราด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS โดยดัดแปลง CTAB ของ Crous et al. (2000) โดยทำการบดตัวอย่างเชื้อราประมาณ 100-150 มิลลิกรัม ด้วยไนโตรเจนเหลวในโถรงบตัวอย่างให้ละเอียด จากนั้นทำการย้ายตัวอย่างใส่ลงใน CTAB buffer (2% CTAB, 1M Tris-Cl, 0.5M EDTA, 5M NaCl, pH 5.5) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร และเติม 10 % PVPP ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำหลอดตัวอย่างไปปั่นที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที โดยกลับหลอดไปมาเบา ๆ ทุก ๆ 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ตูดสารละลายส่วนใสด้านบนปริมาตร 700 ไมโครลิตร ใส่หลอดใหม่ แล้วเติม chloroform : isomylalcohol (24:1) ปริมาตร 1 เท่าของส่วนใส กลับหลอดไปมาเบา ๆ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ย้ายสารละลายส่วนใสด้านบน ใส่หลอดใหม่แล้วเติม RNase A ปริมาตร 0.01 เท่าของส่วนใส แล้วนำไปปั่นที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที เติม phenol : chloroform : isomylalcohol (25:24:1) ปริมาณ 1 เท่าของส่วนใสที่ได้ กลับหลอดไปมาเบา ๆ นำหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ย้ายสารละลายส่วนใสด้านบน ใส่หลอดใหม่แล้วเติม chloroform : isomylalcohol (24:1) ปริมาตร 1 เท่าของส่วนใส กลับหลอดไปมาเบา ๆ นำหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ย้ายสารละลายส่วนใสด้านบน ใส่หลอดใหม่ เติม Absolute ethanol ปริมาตร 1.5 เท่าของสารละลายที่มี แล้วจึงนำไปปั่นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทสารละลายส่วนใสด้านบนทิ้ง นำหลอดไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 1 นาที และตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง แล้วเติม TE Buffer ปริมาตร 30 ไมโครลิตรนำไปตรวจสอบด้วยวิธี เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส วัดค่าการดูดกลืนแสง และนำดีเอ็นเอที่ได้ไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

4. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

นำดีเอ็นเอของเชื้อราที่ได้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ Internal Transcribed spacer (ITS) ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยไพรเมอร์ ITS1 (5'-TTTCCGTAGGTGAACCTGC-3') และ ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC) (White et al., 1990) โดยเพิ่มปริมาณบริเวณ rDNA ในช่วง ITS1-5.8S rDNA-ITS2 ซึ่งปฏิกิริยามีส่วนผสมและสภาวะดังตาราง 2 และ 3 ตามลำดับ จากนั้นทำชิ้นส่วนดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์โดยชุดสกัด PCR Clean-Up & Gel Extraction kit (PureDirex, Taiwan) แล้วนำผลผลิตที่ได้มาตรวจวิเคราะห์ผลด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส บน 1% Agarose gel และส่องดู

ภายใต้ UV transilluminator วิเคราะห์ลำดับเบสที่บริษัท MacroGen, South Korea และเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลที่มีรายงานอยู่ใน Genbank

ตาราง 2 อัตราส่วนที่ใช้สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS

สารเคมี	ความเข้มข้นเริ่มต้น	ความเข้มข้นสุดท้าย
PCR Buffer	10x	1X
dNTP	2 mM	0.2 mM
Forward Primer (ITS1)	10 μ M	0.2 μ M
Reverse Primer (ITS4)	10 μ M	0.2 μ M
<i>Taq</i> DNA Polymerase (GeneDirex, Taiwan)	5 U/ μ L	1 U/reaction
Distilled water	-	to 50 μ L
DNA template	-	100 ng

ตาราง 3 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS

ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา
1. Pre-Denaturation	94°C	5 min
2. Denaturation	94°C	50 sec
3. Annealing	52°C	2 min
4. Extension	72°C	1 min
5. Final Extension	72°C	5 min

} 30 รอบ

การเตรียม Spore Suspension

นำเชื้อราที่ระบุชนิดที่ได้จากการทำ Tissue transplanting ของมะม่วงน้ำดอกไม้ และผ่านการแยกเชื้อจนได้เป็นเชื้อที่บริสุทธิ์แล้ว ใช้ DI water ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ลงบนผิวหน้าอาหารที่มีเชื้อราเจริญอยู่ใช้แผ่นสไลด์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วชุตไปมาเบา ๆ เพื่อให้ Spore หลุดออกมา

จากนั้นเก็บส่วนใสที่ได้จากการกรองไว้ในหลอดทดลองแล้วนำไปตรวจสอบดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ใช้เครื่องHemocytometer นับจำนวนสปอร์ที่ค่าความเข้มข้น 5×10^6 โคโคนิเดีย/มิลลิลิตร

การพัฒนาสารเคลือบผิว

1. การสกัดสารจากผลมะระขี้นก

เลือกผลแก่ของมะระขี้นกที่มีสีเขียว ไม่มีรอยโรคจากตลาดสดในเขตพื้นที่อำเภอเมืองพิษณุโลก จังหวัดพิษณุโลก เก็บเกี่ยวระหว่างเดือน กรกฎาคม-สิงหาคม พ.ศ.2564 นำมาล้างด้วยน้ำสะอาด จากนั้นนำเมล็ดของมะระขี้นกออกแล้วล้างน้ำเปล่าแล้วผึ่งไว้ให้แห้ง จากนั้นนำมาหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วนำไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส จนกว่าจะแห้ง หลังจากนั้นนำมะระขี้นกที่แห้งแล้วมาบดให้ละเอียดแล้วนำผงมะระขี้นกที่ได้มาทำการสกัดด้วยวิธีการหมัก (Maceration) โดยใช้ตัวทำละลาย 95% เอทานอล ในอัตราส่วน 1:4 (w/v) เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำสารละลายที่ได้มากรองโดยใช้กระดาษกรอง (Whatman No.1) แล้วนำสารละลายที่ได้ไประเหยสารละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไประเหยจนแห้งด้วยวิธีการใช้ความเย็น (Freeze dryer) จากนั้นนำมาคำนวณหาปริมาณสารสกัด (% Yield Crude Extract) จากสูตรดังต่อไปนี้

$$\text{Yield Crude Extract (\%)} = \frac{a}{b} \times 100$$

a = น้ำหนักสารสกัดที่ได้ (กรัม)
b = ปริมาณเนื้อผลมะระขี้นกที่ใช้ในการสกัด (กรัม)

2. การเตรียมสารเคลือบผิว

เตรียมสารเคลือบผิวโดยใช้ไคโตซานโมเลกุลสูง (310-375 kDa; deacetylation degree $\geq 75\%$; Sigma-Aldrich) โดยนำไคโตซานมาละลายด้วย 1% (v/v) acetic acid (food grade) ให้ได้ความเข้มข้น 0.5%, 1% และ 2% (w/v) จากนั้นคนจนผงไคโตซานละลายจนหมดแล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปผสมกับสารสกัดมะระขี้นกที่ความเข้มข้น 500 ppm แล้วนำไปปรับค่า pH=4

แบ่งการทดลองเป็น 8 ชุดการทดลอง คือ ชุดควบคุมที่ไม่ใช้สาร (untreated) ชุดทดลองที่แช่ในไคโตซาน (Chitosan) ความเข้มข้น 0.5, 1 และ 2% ชุดทดลองที่แช่ในไคโตซาน 0.5, 1 และ 2% ร่วมกับสารสกัดมะระขี้นก (BT) ความเข้มข้น 500 ppm และชุดทดลองที่แช่ในสารสกัดมะระขี้นก ความเข้มข้น 500 ppm

3. การตรวจสอบคุณภาพของสารเคลือบผิว

คัดเลือกมะม่วงน้ำดอกไม้อายุการเก็บเกี่ยว 90-100 วันหลังดอกบาน ที่มีขนาด สี และไม่มีรอยโรคมาทำการทดสอบ จากนั้นเตรียมเชื้อราให้อยู่ในรูปเซลล์แขวนลอยโดยให้มีความหนาแน่นของสปอร์เชื้อราอยู่ที่ 5×10^6 สปอร์/มิลลิลิตร นำผลมะม่วงมาทำการเพาะเชื้อโดยการทำให้ผลบวมมะม่วง 2 บริเวณคือ กึ่งกลางค่อนไปทางปลายผล และกึ่งกลางค่อนไปทางขั้วผล จากนั้นหยดเซลล์แขวนลอย ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนผิวมะม่วงทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง แล้วนำไปแช่ในโคโตซานที่ผสมสารสกัดจากมะระขี้นกแล้วปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง และเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน บันทึกขนาดรอยโรคโดยการวัดขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของรอยโรค เปรียบเทียบการสูญเสียน้ำหนักโดยการหาน้ำหนักที่สูญเสียไปเปรียบเทียบกับน้ำหนักเริ่มต้นและความแน่นเนื้อของผลมะม่วงโดยใช้เครื่อง Universal Testing Machine (Instron 5965)

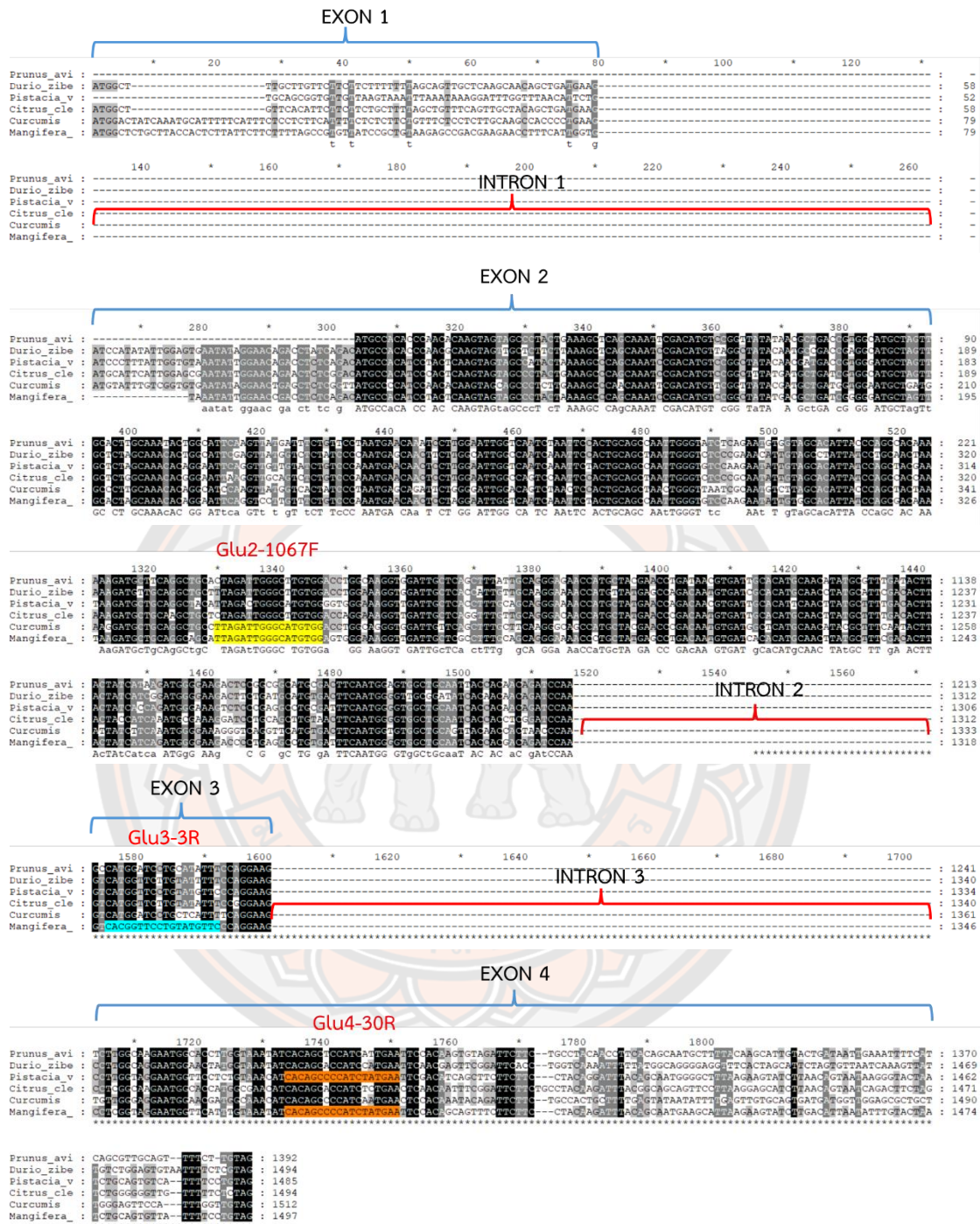
การตรวจสอบการแสดงออกของยีน

1. การออกแบบไพรเมอร์

ออกแบบไพรเมอร์สำหรับยีน β -1,3-glucanase จากฐานข้อมูล NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) โดยตัวอย่างที่ใช้สำหรับการออกแบบไพรเมอร์จะใช้ accession number ดังต่อไปนี้คือ XM_044622765.1 (*Mangifera indica* L.), EF121321.1 (*Citrus clementiana* L.), XM_031397038.1 (*Pistacia vera* L.) และ XM_022914255.1 (*Durio zibethinus*) และใช้ตัวอย่างจากฐานข้อมูล Ensemblplant ดัง Gene ID ดังต่อไปนี้คือ Csa_5G423880 (*Cucumis sativus*) ดังตาราง 4 ไพรเมอร์ที่ออกแบบจะแบ่งออกเป็น 2 คู่ โดยคู่แรกนั้นจะเป็นคู่ไพรเมอร์ที่เพิ่มปริมาณระหว่างเอ็กซอนที่ 2 (Glu2-1067F) ไปจนถึง เอ็กซอนที่ 3 (Glu2-3R) ส่วนไพรเมอร์คู่ที่ 2 จะเป็นคู่ไพรเมอร์ที่เพิ่มปริมาณระหว่างเอ็กซอนที่ 2 (Glu2-1067F) ไปจนถึงเอ็กซอนที่ 4 (Glu2-30R) (ภาพ 8)

ตาราง 4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละไพรเมอร์

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์
Glu2-1067F	5'-TTAGATTGGGCATGTGG-3'
Glu3-3R	5'-GAACATACAGGAACCGTG-3'
Glu4-30R	5'-TTCATAGATGGGGCTGTG-3'



ภาพ 8 แบบจำลองการจับของไพรเมอร์บนยีน β -1,3-glucanase ระหว่างเอ็กซอนที่ 2 ไปจนถึงเอ็กซอนที่ 4

2. การปลูกเชื้อราทดสอบบนผิวมะม่วง

ทำการปลูกเชื้อราบนผิวมะม่วงโดยแบ่งการทดลองออกเป็น 3 ชุด ดังตาราง 5 จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างมะม่วงที่เวลา 0, 1, 3, 4, 5 และ 6 วัน เพื่อนำไปทำการสกัดอาร์เอ็นเอ

ตาราง 5 การปลูกเชื้อราทดสอบบนผิวมะม่วง

ชุดที่	การเคลือบผิว	ตัวอย่าง
1	ไม่เคลือบผิวและไม่มีการทำให้ติดเชื้อ	NC/NI
	ไม่เคลือบผิวและทำให้ติดเชื้อ	NC/I
	เคลือบผิวด้วยสารสกัดมะระขี้นกเพียงอย่างเดียวและไม่มีการทำให้ติดเชื้อ	CB/NI
	เคลือบผิวด้วยไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงเพียงอย่างเดียวและไม่มีการทำให้ติดเชื้อ	CC/NI
	เคลือบผิวด้วยไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงร่วมกับสารสกัดมะระขี้นกและไม่มีการทำให้ติดเชื้อ	CCB/NI
2	เคลือบผิวด้วยสารสกัดมะระขี้นกเพียงอย่างเดียว (ทำให้ติดเชื้อก่อนการเคลือบ)	CBI(B)
	เคลือบผิวด้วยไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงเพียงอย่างเดียว (ทำให้ติดเชื้อก่อนการเคลือบ)	CCI(B)
	เคลือบผิวด้วยไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงร่วมกับสารสกัดมะระขี้นก (ทำให้ติดเชื้อก่อนการเคลือบ)	CCBI(B)
3	เคลือบผิวด้วยสารสกัดมะระขี้นกเพียงอย่างเดียว (ทำให้ติดเชื้อหลังการเคลือบ)	CBI(A)
	เคลือบผิวด้วยไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงเพียงอย่างเดียว (ทำให้ติดเชื้อหลังการเคลือบ)	CCI(A)
	เคลือบผิวด้วยไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงร่วมกับสารสกัดมะระขี้นก (ทำให้ติดเชื้อหลังการเคลือบ)	CCBI(A)

หมายเหตุ ทั้งนี้ C=Coated, NC=Non-coated, NI=Non-infected, I=Infected, CC=Coated chitosan, CB=Coated bitter gourd, CCB=Coated chitosan and bitter gourd, (A)=After, (B)=Before

3. การสกัดอาร์เอ็นเอ

สกัดอาร์เอ็นเอโดยดัดแปลงวิธีการจาก Sajeevan et al., (2014) โดยทำการเตรียม SDS Extraction Buffer 600 ไมโครลิตร เติม 10% PVPP และ β -mercaptoethanol อย่างละ 30 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส จากนั้นชั่งตัวอย่างมะม่วง 0.4 กรัม นำมาบดในโกร่ง

ที่แช่เย็น โดยใช้ไนโตรเจนเหลวเพื่อให้เซลล์แตกละเอียด แล้วย้ายตัวอย่างที่บดละเอียดแล้วใส่ลงใน Extraction Buffer ที่เตรียมไว้ แล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที แล้วเติม Phenol : Chloroform : Isomylalcohol (25:24:1) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร แล้วกลับหลอดไปมาเบา ๆ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วดูดสารละลายส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่ แล้วทำการตกตะกอนด้วย Chloroform : Isomylalcohol (24:1) ปริมาตร 1 เท่าของส่วนใส แล้วกลับหลอดไปมาเบา ๆ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาทีดูดสารละลายส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่ แล้วเติม 6M LiCl ปริมาตร 1 เท่าของส่วนใส เพื่อตกตะกอนอาร์เอ็นเอ จากนั้นกลับหลอดไปมาเบา ๆ ให้สารละลายผสมกัน แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วเทสารละลายส่วนใสด้านบนทิ้งให้เหลือเพียงตะกอนอาร์เอ็นเอ เติม 2M LiCl ปริมาตร 300 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมานำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ดูดสารละลายส่วนใสทิ้งให้เหลือเพียงตะกอน และล้างตะกอนด้วย 70% ethanol 1000 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายส่วนใสด้านบนทิ้ง และตากตะกอนให้แห้งละลายตะกอนด้วย DEPC-Water 30 ไมโครลิตร ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของ total RNA ที่ได้ด้วยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร

4. การกำจัดดีเอ็นเอจากสารละลายอาร์เอ็นเอ

ขั้นตอนต่าง ๆ โดยชุดสำเร็จรูปของ Promega โดยเตรียมปฏิกิริยาสำหรับการกำจัดดีเอ็นเอ ดังตาราง 6 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติม RQ1 DNase Stop solution 1.5 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที นำไปตรวจสอบด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส บน 1 เปอร์เซ็นต์อะกาโรสเจล

ตาราง 6 ปฏิกิริยาสำหรับการกำจัดดีเอ็นเอ

สารเคมี	ความเข้มข้นสุดท้าย
RNA in DEPC-Water (1500 ng)	1500 ng
RQ1 RNase-Free DNase 10X Reaction Buffer	1X
RQ1 RNase-Free DNase (1 U/ μ g RNA)	1.5 U
Nuclease-Free water	to 15 μ l

5. การสังเคราะห์ cDNA (Tetro™ cDNA Synthesis Kit, UK)

นำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ผสมกับ 5X RT Buffer, 10mM dNTP mix, Oligo dT primer, RiboSafe RNase Inhibitor และ Tetro Reverse Transcriptase (200 u/μl) โดยมีปริมาณรวมทั้งหมด 20 ไมโครลิตร จากนั้นดูดขึ้นลงด้วยปิเปตเพื่อผสมให้เข้ากัน จากนั้นเตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยาในหลอดทดลองดังตาราง 7 แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที บ่มที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็ง เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ตาราง 7 ส่วนผสมของปฏิกิริยาสำหรับการสังเคราะห์ cDNA

สารเคมี	ความเข้มข้นสุดท้าย
Total RNA (1000 ng)	1000 ng
Primer Oligo (dT) ₁₈	0.5 μM
10 mM dNTP mix	0.2 mM
5X RT Buffer	1 X
Ribosafe RNase Inhibitor (10 U/ μl)	10 U
Tetro Reverse Transcriptase (200 U/ μl)	200 U

6. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน β-1,3-glucanase ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ยีน β-1,3-glucanase ด้วยไพรเมอร์ Glu2-1067F (5'-TTAGATTGGGCATGTGG-3'), Glu3-3R (5'-GAACATACAGGAACCGTG-3') และ Glu4-30R (5'-TTCATAGATGGGGCTGTG-3') ซึ่งปฏิกิริยามีส่วนผสมและสภาวะดังตาราง 8 และ 9 ตามลำดับ

7. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน Actin และยีน GAPDH ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ยีน Actin และยีน GAPDH ดังตาราง 10 ซึ่งปฏิกิริยามีส่วนผสมและสภาวะดังตาราง 11 และ 12 ตามลำดับ

ตาราง 8 อัตราส่วนที่ใช้สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ยีน β -1,3-glucanase

สารเคมี	ความเข้มข้นสุดท้าย
Template DNA	100 ng
DI Water	-
10X PCR Buffer	1X
2 mM dNTP mix	0.2 mM
10 μ M Forward Primer	0.2 μ M
10 μ M Reverse Primer	0.2 μ M
5 U/ μ l <i>Taq</i> Polymerase (GeneDirex, Taiwan)	1 U/reaction
Total	20 μ l

ตาราง 9 สภาวะสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ยีน β -1,3-glucanase

ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา
1. Pre-Denaturation	94°C	5 min
2. Denaturation	94°C	30 sec
3. Annealing	53°C	30 sec
4. Extension	72°C	30 sec
5. Final Extension	72°C	5 min

} 30 รอบ

ตาราง 10 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ของยีน Actin และยีน GAPDH

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	อ้างอิง
Actin-F	5'-CGTTCTGTCCCTCTATGCCA-3'	Dautt-Castro et al. (2019)
Actin-R	5'-AGATCACGGCCAGCAAGATC-3'	
GAPDH-F	5'-GTGGCTGTTAACGATCCCTT-3'	Dautt-Castro et al. (2019)
GAPDH-R	5'-GTGACTGGCTTCTCATCGAA-3'	

ตาราง 11 อัตราส่วนที่ใช้สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ยีน Actin และยีน GAPDH

สารเคมี	ความเข้มข้นสุดท้าย
Template DNA	100 ng
DI Water	-
10X PCR Buffer	1X
2 mM dNTP mix	0.2 mM
10 μ M Forward Primer	0.2 μ M
10 μ M Reverse Primer	0.2 μ M
5 U/ μ l <i>Taq</i> Polymerase (GeneDirex, Taiwan)	1 U/reaction
Total	20 μ l

ตาราง 12 สภาวะสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ยีน Actin และยีน GAPDH

ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา	
1. Pre-Denaturation	94°C	5 min	
2. Denaturation	94°C	30 sec	} 35 รอบ
3. Annealing	59°C	2 min	
4. Extension	72°C	1 min	
5. Final Extension	72°C	10 min	

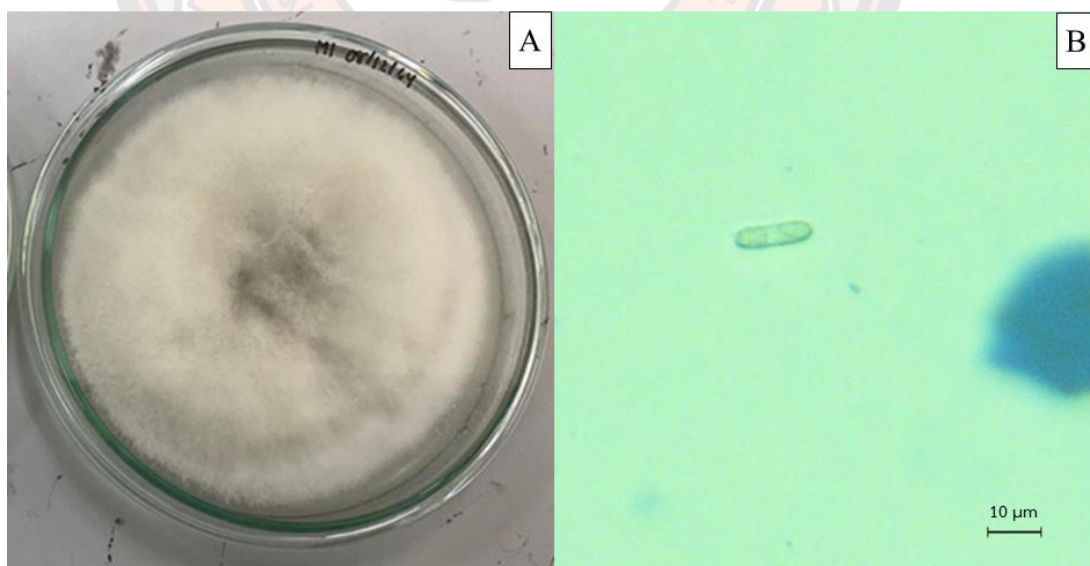
บทที่ 4

ผลการวิจัย

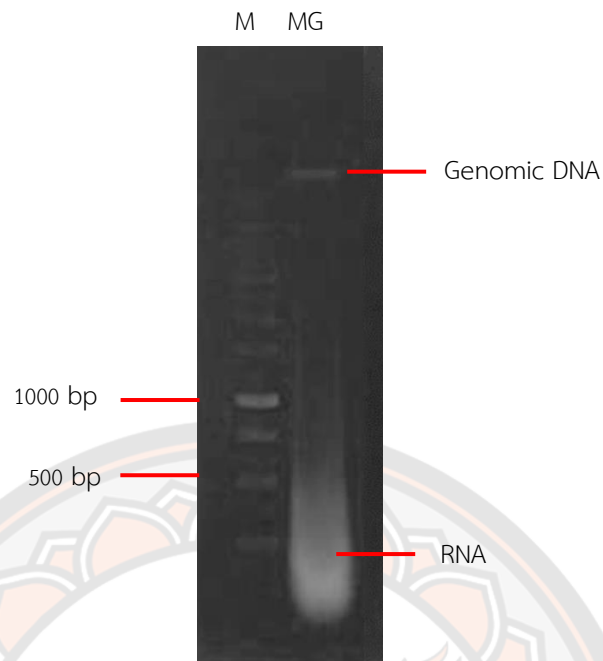
ผลการแยกเชื้อราก่อโรคในมะม่วง

จากการแยกเชื้อราจากรอยโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้สีทอง สามารถแยกเชื้อราได้ 1 ชนิด คือ *C. gloeosporioides* ที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสีขาวและเปลี่ยนเป็นสีขาวอมเทาหลังจากเพาะเลี้ยงได้ประมาณ 4-7 วัน (ภาพ 9A) โคนิเดียมีลักษณะรูปร่างทรงกระบอกหัวมนท้ายมนความยาวประมาณ 14-16 ไมโครเมตร และมีความกว้าง 4-6 ไมโครเมตร (ภาพ 9B) และจากการศึกษาเชื้อราโดยการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB ดัดแปลงจาก Crous et al. (2000) พบว่าดีเอ็นเอของเชื้อราที่สกัดได้มีขนาดมากกว่า 10,000 คู่เบส (ภาพ 10) และเมื่อทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS พบว่าชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มีขนาดประมาณ 550 คู่เบส (ภาพที่ 11)

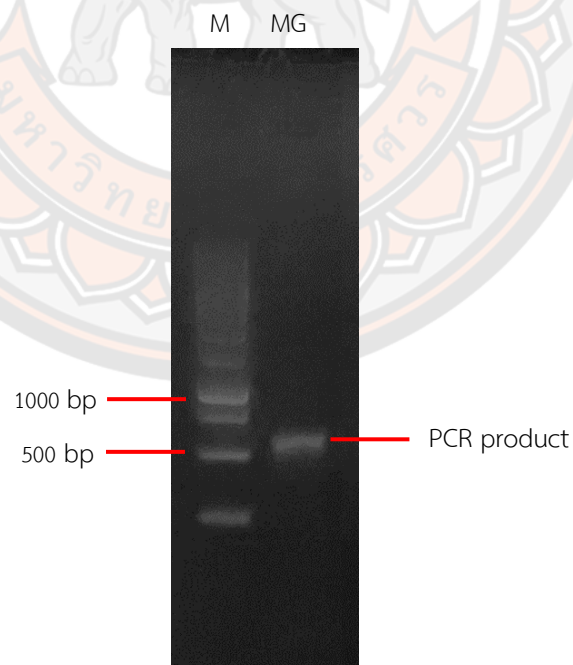
จากการวิเคราะห์ลำดับเบสของเชื้อราที่ใกล้เคียงกันในฐานข้อมูลของ NCBI พบว่าเชื้อราที่แยกได้จากรอยโรคบนผลมะม่วงมีลำดับเบสใกล้เคียงกับเชื้อรา *C. gloeosporioides* ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 99.63% (JX902437.1 และ MT012110.1) (ภาพ 12)



ภาพ 9 ลักษณะเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA
(A) โคนิเดียของเชื้อราที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และ (B) โคนิเดียของเชื้อรา



ภาพ 10 แลบดีเอ็นเอที่สกัดจากเชื้อราด้วยวิธีดัดแปลง CTAB โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1kb DNA Ladder (GeneDirex, Taiwan)



ภาพ 11 แลบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์บริเวณ Internal Transcribed Spcacer (ITS) โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1kb DNA Ladder (GeneDirex, Taiwan)

Descriptions		Graphic Summary	Alignments	Taxonomy				
Sequences producing significant alignments								
Download		Select columns	Show	100				
<input checked="" type="checkbox"/> select all 100 sequences selected								
GenBank		Graphics	Distance tree of results	MSA Viewer				
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Colletotrichum gloeosporioides isolate OORC29 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed sp...	Colletotrichum gl...	981	981	98%	0.0	99.63%	550	JX902437.1
<input checked="" type="checkbox"/> Colletotrichum gloeosporioides strain SN11 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribe...	Colletotrichum gl...	979	979	98%	0.0	99.63%	579	MT012110.1

ภาพ 12 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล NCBI

ผลการสกัดสารจากมะระขี้นก

จากการสกัดสารจากเนื้อผลมะระขี้นกด้วยวิธีการหมัก ได้เนื้อผลมะระขี้นกอบแห้ง 279.5 กรัม และเมื่อทำการหมักด้วย 95% Ethanol แล้วนำสารละลายที่ได้ไประเหยตัวทำละลาย ออกจะได้สารสกัดหยาบ (crude extract) จากเนื้อผลมะระขี้นกที่มีลักษณะเป็นของเหลวเหนียวข้นสี เขียวเข้มจนเกือบดำ จากนั้นเมื่อนำไปทำ freeze dry แล้ว ได้สารสกัดจากเนื้อผลมะระขี้นกที่มี ลักษณะเป็นผงแห้ง 29.93 กรัม ซึ่งเมื่อนำมาคำนวณหาค่าปริมาณสารสกัด (% Yield Crude Extract) ได้ 7.49%

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารเคลือบผิวไคโตซานผสมสารสกัดมะระขี้นกในการควบคุมการเกิดโรคแอนแทรกคโนสบนผลมะม่วงที่ได้รับการปลูกเชื้อในห้องปฏิบัติการ

1. ขนาดรอยโรค

ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของรอยโรคแอนแทรกคโนสบนผลมะม่วงที่เคลือบด้วยไคโตซานผสม สารสกัดมะระขี้นก เป็นเวลา 10 วัน พบว่า ในวันที่ 3 ขนาดของรอยโรคบนผลมะม่วงในชุดควบคุม และมะม่วงที่เคลือบด้วยสารสกัดมะระขี้นกมีขนาดของรอยโรคมามากที่สุด คือ 3.75 ± 0.52 และ 3.58 ± 0.66 มิลลิเมตร ตามลำดับ ซึ่งมะม่วงที่เคลือบผิวด้วย chitosan 0.5%, chitosan 1%, chitosan 2%, chitosan 0.5%+BT, chitosan 1%+BT และ chitosan 2%BT ยังไม่พบการ แสดงออกของโรคแอนแทรกคโนส

หลังจากการเก็บรักษาเป็นเวลา 5 วัน ขนาดของรอยโรคบนผลมะม่วงที่เคลือบผิวด้วย chitosan 0.5%, chitosan 1%, chitosan 2%, chitosan 0.5%+BT และ chitosan 1%+BT มีขนาดของโรคแอนแทรกคโนสเพิ่มมากขึ้น โดยมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของโรคเท่ากับ 4.67 ± 4.55 , 3.42 ± 4.02 , 2.17 ± 2.56 , 4.67 ± 3.95 และ 2.92 ± 3.50 มิลลิเมตร ตามลำดับ และขนาด ของรอยโรคบนผลมะม่วงที่เคลือบด้วยสารสกัดมะระขี้นกและมะม่วงในชุดควบคุมมีขนาดของรอยโรค มากที่สุด คือ 13.75 ± 3.16 และ 11.33 ± 2.04 มิลลิเมตร และมะม่วงที่เคลือบด้วยไคโตซาน 2% ผสม สารสกัดมะระขี้นกยังไม่มีอาการเกิดโรคแอนแทรกคโนสขึ้น

หลังจากการเก็บรักษาเป็นเวลา 7 วัน พบว่ามะม่วงที่เคลือบด้วยสารสกัดมะระขี้นกและมะม่วง ในชุดควบคุมมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของรอยโรคมากที่สุด คือ 25.25 ± 4.44 และ 22.67 ± 6.21 มิลลิเมตร ตามลำดับ และขนาดของรอยโรคที่เคลือบด้วยไคโตซาน 2% ผสมสารสกัดมะระขี้นก มีค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรอยโรคน้อยที่สุด คือ 1.58 ± 1.74 มิลลิเมตร ซึ่งแตกต่างจาก ชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และผลมะม่วงที่เคลือบผิวด้วย chitosan 0.5%, chitosan 1%, chitosan 2%, chitosan 0.5%+BT และ chitosan 1%+BT มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของรอยโรคเท่ากับ 10.08 ± 7.20 , 7.42 ± 5.75 , 5.17 ± 3.39 , 9.00 ± 5.74 และ 5.42 ± 5.10 มิลลิเมตร ตามลำดับ

หลังจากการเก็บรักษาเป็นเวลา 10 วัน พบว่าค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดของรอยโรคที่เคลือบด้วยไคโตซาน 2% ผสมสารสกัดมะระขี้นก มีขนาดรอยโรคน้อยที่สุด คือ 3.50 ± 1.87 มิลลิเมตร ซึ่งแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และมะม่วงที่เคลือบด้วยสารสกัดมะระขี้นกและมะม่วงในชุดควบคุมมีขนาดของรอยโรคมากที่สุด คือ 41.83 ± 4.42 และ 40.25 ± 12.23 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ตาราง 13)

ตาราง 13 ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของรอยโรคแอนแทรคโนสบนผิวมะม่วงสุกพันธุ์น้ำดอกไม้ สีทองเป็นเวลา 10 วัน

Treatment	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของขนาดรอยโรค (มิลลิเมตร)			
	วันที่ 3	วันที่ 5	วันที่ 7	วันที่ 10
Control	3.75 ± 0.52^a	11.33 ± 2.04^a	22.67 ± 6.21^a	40.25 ± 12.23^a
Bitter gourd extract	3.58 ± 0.66^a	13.75 ± 3.16^a	25.25 ± 4.44^a	41.83 ± 4.42^a
Chitosan 0.5%	0.00 ± 0.00^b	4.67 ± 4.55^b	10.08 ± 7.20^b	16.75 ± 7.28^b
Chitosan 1%	0.00 ± 0.00^b	3.42 ± 4.02^{bc}	7.42 ± 5.75^{bc}	15.25 ± 1.84^b
Chitosan 2%	0.00 ± 0.00^b	2.17 ± 2.56^{bc}	5.17 ± 3.39^{bc}	11.50 ± 3.95^b
Chitosan 0.5% + BT	0.00 ± 0.00^b	4.67 ± 3.95^b	9.00 ± 5.74^b	15.08 ± 5.33^b
Chitosan 1% + BT	0.00 ± 0.00^b	2.92 ± 3.50^{bc}	5.42 ± 5.10^{bc}	10.08 ± 7.37^{bc}
Chitosan 2% + BT	0.00 ± 0.00^b	0.00 ± 0.00^c	1.58 ± 1.74^c	3.50 ± 1.87^c

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่อยู่ในคอลัมน์เดียวกันที่มีตัวอักษรไม่เหมือนกันแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

2. ลักษณะอาการรอยโรค

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารเคลือบผิวโคโตซานผสมสารสกัดมะระขี้นกในการควบคุมการเกิดโรคแอนแทรคโนสที่เกิดจากเชื้อรา *C. gloeosporioides* บนผลมะม่วงน้ำดอกไม้ เป็นเวลา 10 วัน หลังจากเคลือบผิวมะม่วงสุกพันธุ์น้ำดอกไม้ด้วยสารเคลือบผิวโคโตซานเป็นเวลา 3 วัน พบว่าหลังการเคลือบผิว มะม่วงในชุดควบคุม มะม่วงที่เคลือบด้วย BT (สารสกัดมะระขี้นก) และมะม่วงที่เคลือบด้วย chitosan 0.5% แสดงอาการของโรคแอนแทรคโนสที่มีลักษณะเป็นจุดสีดำบริเวณที่ทำการเพาะเชื้อ และผลมะม่วงเริ่มเหี่ยวเล็กน้อย (ภาพ 13)

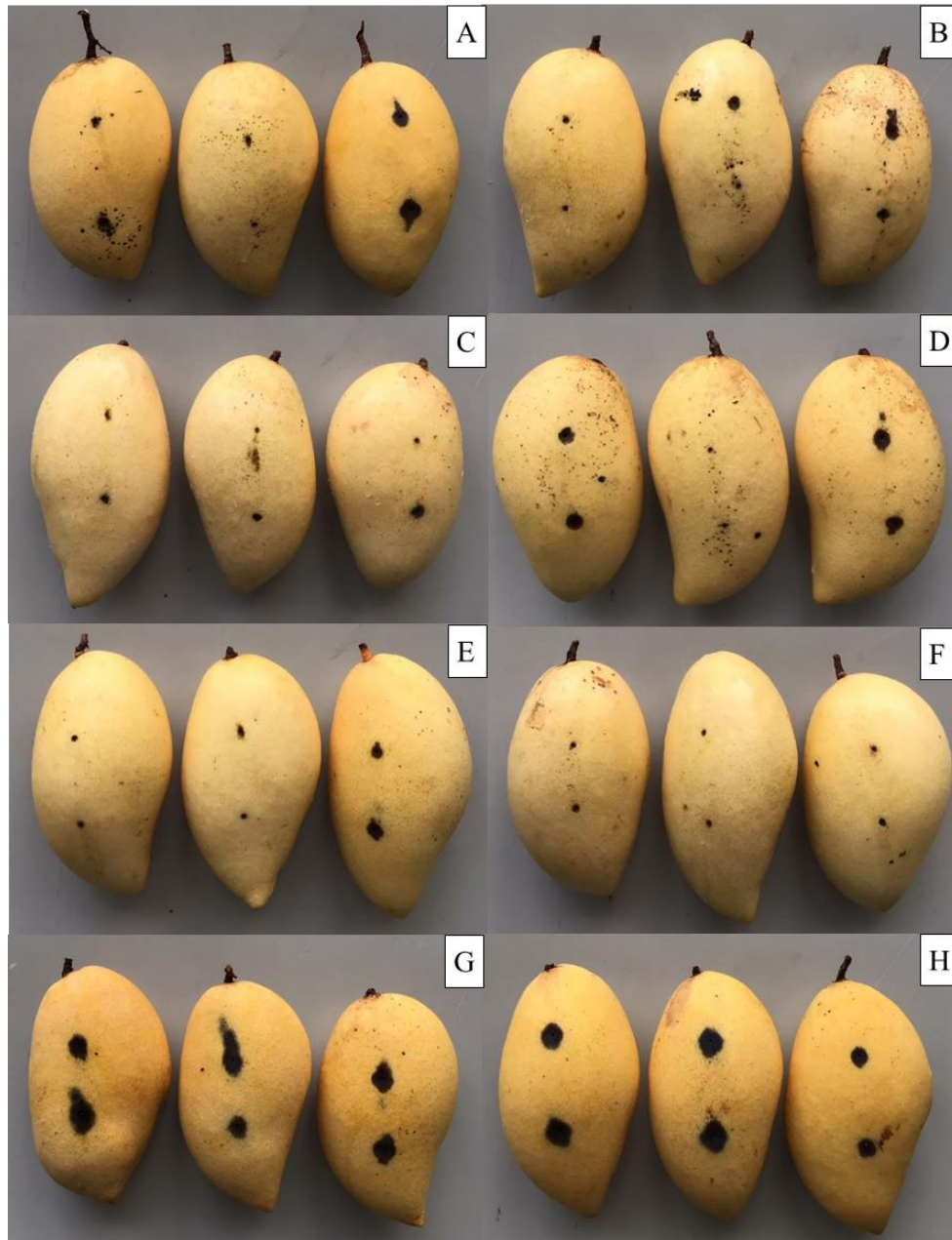
หลังเก็บรักษาครบ 5 วัน พบว่าขนาดแผลของโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วงในชุดควบคุม มะม่วงที่เคลือบด้วย BT, chitosan 0.5%, chitosan 1%, chitosan 2%, chitosan 0.5%+BT และ chitosan 1%+BT มีขนาดของโรคแอนแทรคโนสขยายใหญ่ขึ้น แต่ยังไม่พบการแสดงออกของโรคแอนแทรคโนสในมะม่วงที่เคลือบด้วย chitosan 2%+BT นอกจากนี้ยังพบว่ามะม่วงในชุดควบคุม, BT, chitosan 0.5% และ chitosan 1% มีการแสดงออกของโรคขั้วผลเน่า (Stem end rot) ที่มีลักษณะสีน้ำตาลเข้มเกิดขึ้นบริเวณขั้วผลของมะม่วง ซึ่งบริเวณแผลมีลักษณะนิ่มและฉ่ำน้ำ โรคขั้วผลเน่าที่เกิดขึ้นเกิดจากเชื้อราที่ก่อโรคขั้วผลเน่าที่แฝงมากับผลมะม่วงตั้งแต่ก่อนการเก็บเกี่ยว ซึ่งจะแสดงอาการของโรคในระยะที่มะม่วงเริ่มสุก และมะม่วงที่เคลือบด้วย chitosan 0.5%, BT และชุดควบคุม มีอาการเหี่ยวอย่างเห็นได้ชัด (ภาพ 14)

หลังการเก็บรักษาครบ 7 วัน พบว่าขนาดแผลของโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วงในชุดควบคุม, BT, chitosan 0.5%, chitosan 1%, chitosan 2%, chitosan 0.5%+BT และ chitosan 1%+BT มีขนาดใหญ่ขึ้นและยุบตัวลงเป็นแอ่งบุ๋ม นอกจากนี้ยังพบกลุ่มของโคนิเดียสีส้มเป็นหยดเหลวขึ้นบริเวณรอยแผลอีกด้วย และยังไม่พบการแสดงออกของโรคในมะม่วงที่เคลือบด้วย chitosan 2%+BT นอกจากนี้ยังพบว่ามะม่วงในชุดควบคุม, BT, chitosan 0.5% และ chitosan 1% มีอาการของโรคขั้วผลเน่าขยายใหญ่ขึ้นบริเวณขั้วผลของมะม่วง (ภาพ 15)

หลังการเก็บรักษาครบ 10 วัน พบว่ามะม่วงทุกการทดลองมีขนาดของรอยโรคแอนแทรคโนสเพิ่มมากขึ้น โดยมะม่วงในชุดควบคุมและมะม่วงที่เคลือบด้วย BT มีขนาดของรอยโรคมากที่สุด ซึ่งขนาดของรอยโรคแอนแทรคโนสลูกกลมจนแผลขยายติดกัน และมะม่วงที่เคลือบด้วย chitosan 2%+BT มีขนาดของรอยโรคน้อยที่สุด อีกทั้งยังพบว่ามะม่วงในชุดควบคุม, BT, chitosan 0.5%, chitosan 1%, chitosan 2%, chitosan 0.5% +BT และ chitosan 2% +BT มีขนาดของแผลโรคขั้วผลเน่าเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ซึ่งบริเวณแผลมีลักษณะนิ่มและฉ่ำน้ำ ขนาดแผลของโรคขั้วผลเน่าในมะม่วงในชุดควบคุม และมะม่วงที่เคลือบด้วย BT ลูกกลมไปทั่วทั้งผลอย่างรวดเร็ว ซึ่งบริเวณแผลของโรคขั้วผลเน่ามีกลุ่มเส้นใยเชื้อราสีดำปกคลุมบริเวณแผลของโรคอีกด้วย (ภาพ 16)



ภาพ 13 ขนาดของรอยโรคแอนแทรคโนสบนผิวมะม่วงน้ำดอกไม้ที่เคลือบด้วยสารเคลือบผิวไคโตซาน ที่เก็บรักษานาน 3 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (A) Chitosan 0.5% (B) Chitosan 1% (C) Chitosan 2% (D) Chitosan 0.5%+BT (E) Chitosan 1%+BT (F) Chitosan 2%+BT (G) Bitter melon extract (H) Control



ภาพ 14 ขนาดของรอยโรคแอนแทรคโนสบนผิวมะม่วงน้ำดอกไม้ที่เคลือบด้วยสารเคลือบผิวไคโตซาน ที่เก็บรักษานาน 5 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (A) Chitosan 0.5% (B) Chitosan 1% (C) Chitosan 2% (D) Chitosan 0.5%+BT (E) Chitosan 1% +BT (F) Chitosan 2%+BT (G) Bitter melon extract (H) Control



ภาพ 15 ขนาดของรอยโรคแอนแทรคโนสบนผิวมะม่วงน้ำดอกไม้ที่เคลือบด้วยสารเคลือบผิวไคโตซาน ที่เก็บรักษานาน 7 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (A) Chitosan 0.5% (B) Chitosan 1% (C) Chitosan 2% (D) Chitosan 0.5%+BT (E) Chitosan 1%+BT (F) Chitosan 2%+BT (G) Bitter melon extract (H) Control



ภาพ 16 ขนาดของรอยโรคแอนแทรคโนสบนผิวมะม่วงน้ำดอกไม้ที่เคลือบด้วยสารเคลือบผิวไคโตซาน ที่เก็บรักษานาน 10 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (A) Chitosan 0.5% (B) Chitosan 1% (C) Chitosan 2% (D) Chitosan 0.5%+BT (E) Chitosan 1%+BT (F) Chitosan 2%+BT (G) Bitter melon extract (H) Control

3. การสูญเสียน้ำหนักผล (Weight loss)

ผลการเคลือบผิวมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้สีทองด้วยไคโตซานผสมสารสกัดมะระขี้นก เป็นเวลานาน 10 วัน พบว่าผลมะม่วงมีเนื้อสัมผัสอ่อนลง มีแนวโน้มการสูญเสียน้ำหนักเพิ่มมากขึ้น เมื่อเก็บรักษาครบ 3, 5 และ 7 วัน พบว่า มะม่วงที่เคลือบด้วยไคโตซาน 2% ผสมสารสกัดมะระขี้นก มีการสูญเสียน้ำหนักผลมากที่สุด ซึ่งมีการสูญเสียน้ำมากกว่ามะม่วงในชุดควบคุมแต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) และมะม่วงที่เคลือบด้วยไคโตซาน 1% มีการสูญเสียน้ำหนักผลน้อยที่สุด ซึ่งแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) และเมื่อเก็บรักษาครบ 10 วัน พบว่า มะม่วงในชุดควบคุมมีการสูญเสียน้ำหนักผลมากที่สุด และมะม่วงที่เคลือบด้วยไคโตซาน 1% การสูญเสียน้ำหนักผลน้อยที่สุด ซึ่งน้อยกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) (ตาราง 14)

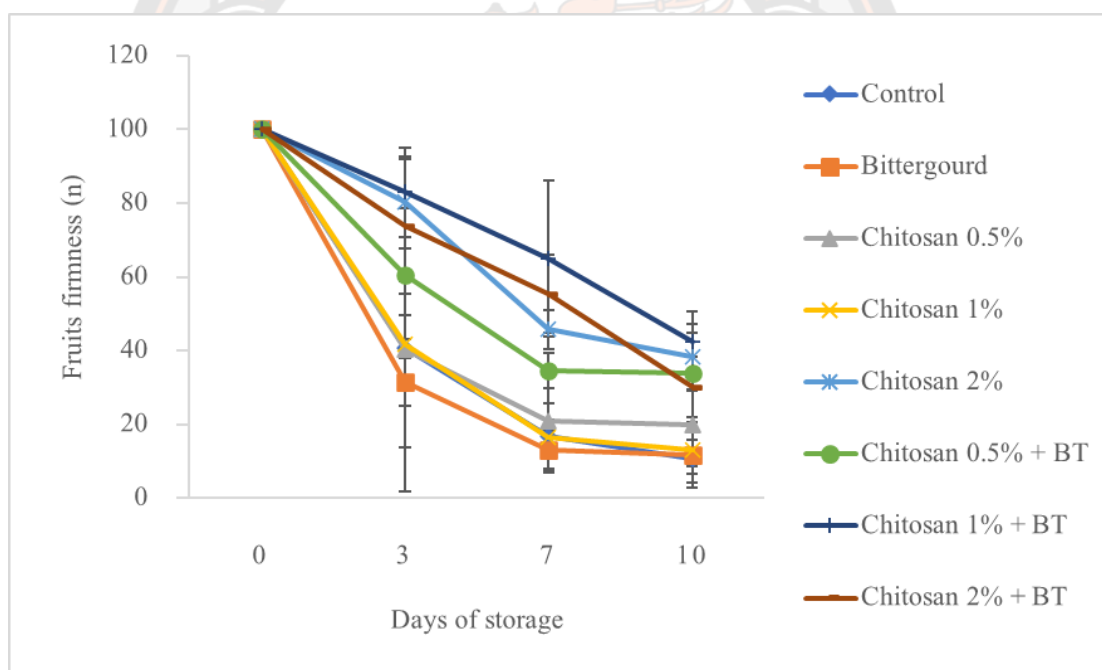
ตาราง 14 ค่าเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักของมะม่วงหลังการเคลือบด้วยไคโตซานและไคโตซานผสมสารสกัดมะระขี้นก ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน

Treatment	Weight loss (%)			
	3 Day	5 Day	7 Day	10 Day
Control	4.45±0.41 ^d	6.55±0.55 ^c	8.47±0.57 ^c	11.55±0.84 ^c
Bitter gourd extract	4.20±0.21 ^{bcd}	6.17±0.34 ^{bc}	8.03±0.42 ^{bc}	10.83±0.30 ^{bc}
Chitosan 0.5%	3.78±0.40 ^{abc}	5.54±0.57 ^{ab}	7.22±0.69 ^{ab}	9.53±0.96 ^{ab}
Chitosan 1%	3.52±0.34 ^a	5.20±0.57 ^a	6.74±0.82 ^a	8.82±1.20 ^a
Chitosan 2%	3.64±0.31 ^{ab}	5.52±0.46 ^{ab}	7.23±0.58 ^{ab}	10.53±1.41 ^{abc}
Chitosan 0.5% + BT	3.75±0.21 ^{ab}	5.55±0.35 ^{ab}	7.20±0.45 ^{ab}	9.43±0.65 ^{ab}
Chitosan 1% + BT	4.09±0.05 ^{abcd}	6.09±0.06 ^{abc}	7.91±0.11 ^{bc}	10.27±0.15 ^{abc}
Chitosan 2% + BT	4.39±0.51 ^{cd}	6.56±0.71 ^c	8.54±0.88 ^c	10.99±1.02 ^{bc}

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่อยู่ในคอลัมน์เดียวกันที่มีตัวอักษรไม่เหมือนกันแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

4. ความแน่นเนื้อของผล (Fruits firmness)

ค่าความแน่นเนื้อของผลมะม่วงทุกการทดลองมีแนวโน้มลดลงตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา โดยในวันที่ 3 หลังการเก็บรักษา พบว่า ผลมะม่วงที่เคลือบผิวด้วยไคโตซาน 1% ผสมสารสกัดมะระขี้นกมีค่าความแน่นเนื้อมากที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 82.95 นิวตัน และมะม่วงที่เคลือบด้วยสารสกัดมะระขี้นกมีการลดลงของค่าความแน่นเนื้อมากที่สุด คือ 31.54 นิวตัน และในวันที่ 10 พบว่ามะม่วงที่เคลือบผิวด้วยไคโตซาน 1% ผสมสารสกัดมะระขี้นก ยังคงมีค่าความแน่นเนื้อมากที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 42.45 นิวตัน รองลงมาคือ มะม่วงที่เคลือบผิวด้วยไคโตซาน 2%, ไคโตซาน 0.5% ผสมสารสกัดมะระขี้นก, ไคโตซาน 2% ผสมสารสกัดมะระขี้นก, ไคโตซาน 0.5%, ไคโตซาน 1%, สารสกัดมะระขี้นก และชุดควบคุม โดยมีค่าเท่ากับ 38.41, 33.76, 30.26, 19.88, 13.04, 11.66 และ 10.75 นิวตัน ตามลำดับ (ภาพ 17) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไคโตซาน 1% ผสมสารสกัดมะระขี้นกสามารถชะลอการเปลี่ยนแปลงความแน่นเนื้อได้ดีกว่าไคโตซานที่ความเข้มข้นอื่น ๆ

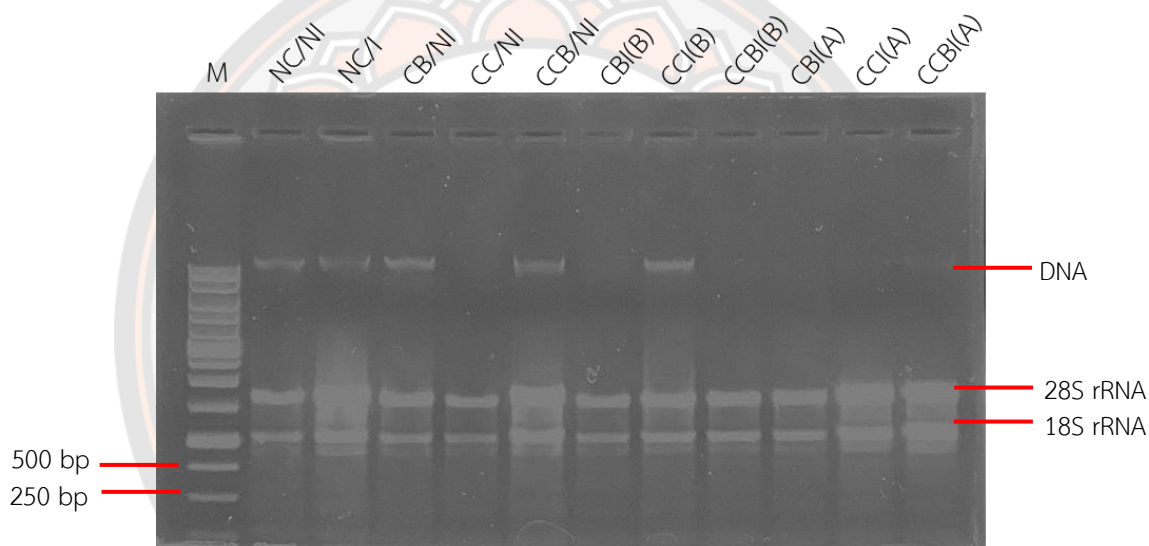


ภาพ 17 ค่าความแน่นเนื้อของมะม่วงหลังการเคลือบด้วยไคโตซานและไคโตซานผสมสารสกัดมะระขี้นก ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน

การมีชีวิตของเนื้อเยื่อบริเวณรอยโรค

1. การสกัดอาร์เอ็นเอมะม่วงที่เก็บได้ในวันที่ 0

จากการสกัดอาร์เอ็นเอตัวอย่างมะม่วงที่เก็บได้ในวันที่ 0 เมื่อนำไปตรวจสอบด้วยเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ พบว่า สามารถสกัดอาร์เอ็นเอได้ในทุกตัวอย่าง จากทั้งหมด 11 ตัวอย่าง โดยปรากฏแถบอาร์เอ็นเอชนิดเจนน 2 แบบ คือ 18S และ 28S (ภาพ 18) นอกจากนี้ยังพบแถบดีเอ็นเอชนิดเจนนจากตัวอย่าง NC/NI, NC/I, CB/NI, CCB/NI และ CCI(B) อีกด้วย จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร พบว่ามีความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอที่สกัดได้อยู่ในช่วง 249.3 (CBI(A)) – 1441.1 (CCBI(A)) นาโนกรัม/ไมโครลิตร (ตาราง 15)

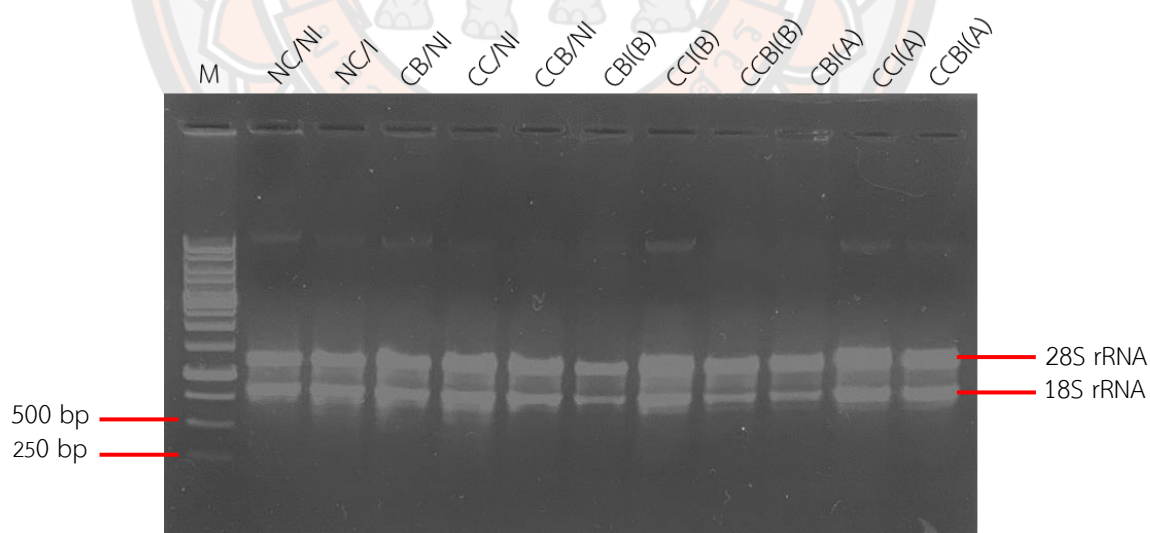


ภาพ 18 ผลการสกัดอาร์เอ็นเอของมะม่วงในวันที่ 0 บน 1% Agarose gel โดย M คือ 1Kb DNA ladder (GeneOn)

จากการสกัดอาร์เอ็นเอตัวอย่างมะม่วงที่เก็บได้ในวันที่ 1 เมื่อนำไปตรวจสอบด้วยเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ พบว่าสามารถสกัดอาร์เอ็นเอได้ในทุกตัวอย่าง จากทั้งหมด 11 ตัวอย่าง โดยปรากฏแถบอาร์เอ็นเอชนิดเจนน 2 แบบ คือ 18S และ 28S (ภาพ 19) และพบแถบดีเอ็นเอไม่ชัดเจนจากตัวอย่าง NC/NI, NC/I, CB/NI, CCI(B) และ CCI(A) จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร พบว่ามีความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอที่สกัดได้อยู่ในช่วง 276.4 (CCBI(B)) – 899.9 (CCI(A)) นาโนกรัม/ไมโครลิตร (ตาราง 16)

ตาราง 15 ค่าการดูดกลืนแสงของอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างมะม่วงในวันที่ 0

Sample	A ₂₆₀	Concentration (ng/μl)
NC/NI	18.927	757.1
NC/I	25.151	1006.2
CB/NI	13.654	546.2
CC/NI	14.001	560.0
CCB/NI	27.979	1119.1
CBI(B)	16.265	650.6
CCI(B)	19.008	760.3
CCBI(B)	24.716	988.6
CBI(A)	6.233	249.3
CCI(A)	26.425	1057.0
CCBI(A)	36.027	1441.1

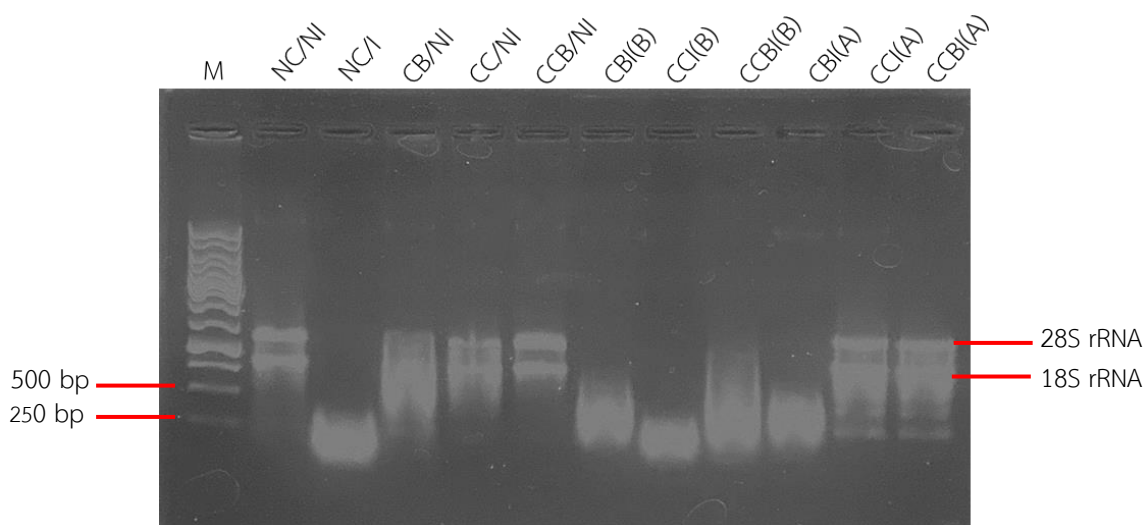


ภาพ 19 ผลการสกัดอาร์เอ็นเอของมะม่วงในวันที่ 1 บน 1% Agarose gel โดย M คือ 1Kb DNA ladder (GeneOn)

ตาราง 16 ค่าการดูดกลืนแสงของอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างมะม่วงในวันที่ 1

Sample	A ₂₆₀	Concentration (ng/μl)
NC/NI	10.588	423.5
NC/I	8.854	354.2
CCB/NI	13.963	558.5
CC/NI	9.225	369.0
CB/NI	13.767	550.7
CBI(B)	11.355	454.2
CCI(B)	9.561	382.4
CCBI(B)	6.910	276.4
CBI(A)	17.898	715.9
CCI(A)	22.498	899.9
CCBI(A)	18.353	734.1

จากการสกัดอาร์เอ็นเอตัวอย่างมะม่วงที่เก็บได้ในวันที่ 3 เมื่อนำไปตรวจสอบด้วยเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ พบว่าจากทั้งหมด 11 ตัวอย่าง สามารถสกัดอาร์เอ็นเอได้เพียง 6 ตัวอย่างเท่านั้น คือ NC/NI, CB/NI, CC/NI, CCB/NI, CCI(A) และ CCBI(A) โดยปรากฏแถบอาร์เอ็นเอชัดเจน 2 แบบ คือ 18S และ 28S (ภาพ 20) จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร พบว่ามีความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอที่สกัดได้อยู่ในช่วง 176.9 (CCBI/NI) – 1352.0 (NC/I) นาโนกรัม/ไมโครลิตร (ตาราง 17)



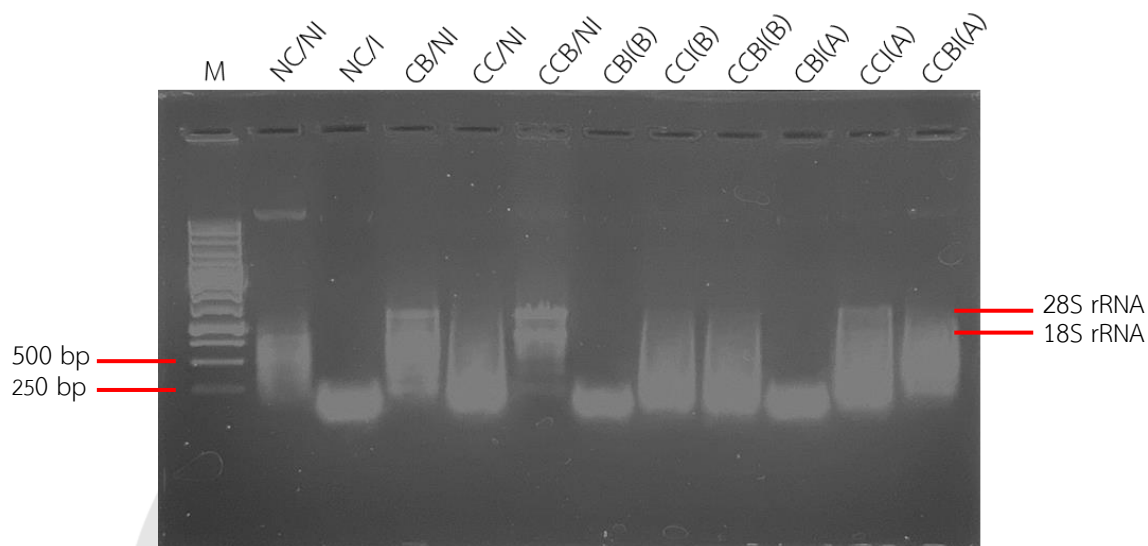
ภาพ 20 ผลการสกัดอาร์เอ็นเอของมะม่วงในวันที่ 3 บน 1% Agarose gel โดย M คือ 1Kb DNA ladder (GeneOn)

ตาราง 17 ค่าการดูดกลืนแสงของอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างมะม่วงในวันที่ 3

Sample	A ₂₆₀	Concentration (ng/μl)
NC/NI	15.654	626.2
NC/I	33.801	1352.0
CC/NI	16.053	642.1
CCB/NI	4.423	176.9
CB/NI	24.051	962.1
CBI(B)	19.846	793.8
CCI(B)	23.040	921.6
CCBI(B)	7.553	302.1
CBI(A)	9.204	368.1
CCI(A)	21.257	850.3
CCBI(A)	9.247	369.9

จากการสกัดอาร์เอ็นเอตัวอย่างมะม่วงที่เก็บได้ในวันที่ 4 เมื่อนำไปตรวจสอบด้วยเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ พบว่าจากทั้งหมด 11 ตัวอย่าง สามารถสกัดอาร์เอ็นเอได้เพียง 2 ตัวอย่างเท่านั้น คือ CB/NI และ CCB/NI โดยปรากฏแถบอาร์เอ็นเอชัดเจน 2 แบบ คือ 18S และ 28S (ภาพ 21)

จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร พบว่ามีความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอที่สกัดได้อยู่ในช่วง 212.0 (CB/NI) – 1478.3 (CCB/NI) นาโนกรัม/ไมโครลิตร (ตาราง 18)

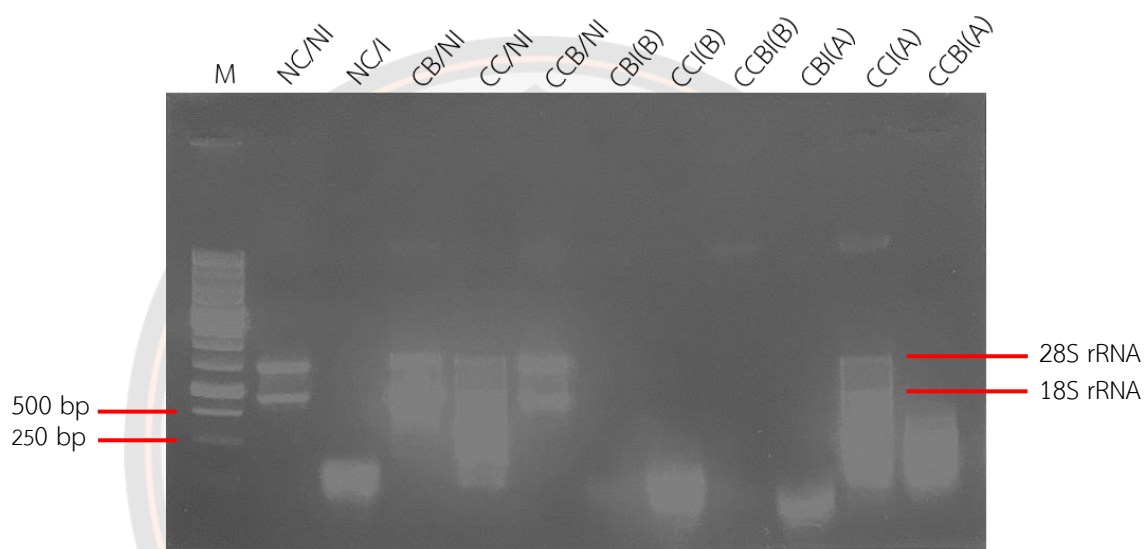


ภาพ 21 ผลการสกัดอาร์เอ็นเอของมะม่วงในวันที่ 4 บน 1% Agarose gel โดย M คือ 1Kb DNA ladder (GeneOn)

ตาราง 18 ค่าการดูดกลืนแสงของอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างมะม่วงในวันที่ 4

Sample	A ₂₆₀	Concentration (ng/μl)
NC/NI	7.522	300.9
NC/I	24.762	990.5
CC/NI	5.539	221.6
CCB/NI	36.959	1478.3
CB/NI	5.299	212.0
CBI(B)	19.666	786.0
CCI(B)	9.848	393.9
CCBI(B)	7.056	282.2
CBI(A)	17.861	714.4
CCI(A)	12.724	508.9
CCBI(A)	8.159	326.4

จากการสกัดอาร์เอ็นเอตัวอย่างมะม่วงที่เก็บได้ในวันที่ 5 เมื่อนำไปตรวจสอบด้วยเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ พบว่าจากทั้งหมด 11 ตัวอย่าง สามารถสกัดอาร์เอ็นเอได้เพียง 5 ตัวอย่างเท่านั้น คือ NC/NI, CB/NI, CC/NI, CCB/NI และ CCI(A) โดยปรากฏแถบอาร์เอ็นเอชนิดเจน 2 แบบ คือ 18S และ 28S (ภาพ 22) จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร พบว่ามีความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอที่สกัดได้อยู่ในช่วง 273.1 (NC/NI) – 1290.6 (CB/NI) นาโนกรัม/ไมโครลิตร (ตาราง 19)

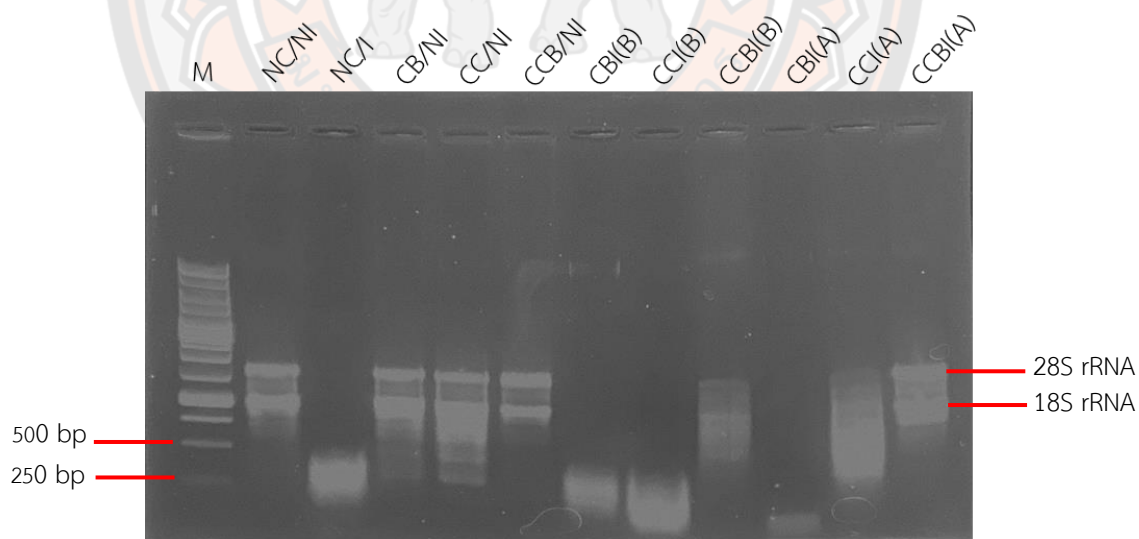


ภาพ 22 ผลการสกัดอาร์เอ็นเอของมะม่วงในวันที่ 5 บน 1% Agarose gel โดย M คือ 1Kb DNA ladder (GeneOn)

จากการสกัดอาร์เอ็นเอตัวอย่างมะม่วงที่เก็บได้ในวันที่ 6 เมื่อนำไปตรวจสอบด้วยเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ พบว่าจากทั้งหมด 11 ตัวอย่าง สามารถสกัดอาร์เอ็นเอได้เพียง 5 ตัวอย่างเท่านั้น คือ NC/NI, CB/NI, CC/NI, CCB/NI และ CCIB(A) โดยปรากฏแถบอาร์เอ็นเอชนิดเจน 2 แบบ คือ 18S และ 28S (ภาพ 23) จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร พบว่ามีความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอที่สกัดได้อยู่ในช่วง 190.8 (CCBI(B)) – 1542.2 (NC/NI) นาโนกรัม/ไมโครลิตร (ตาราง 20)

ตาราง 19 ค่าการดูดกลืนแสงของอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างมะม่วงในวันที่ 5

Sample	A ₂₆₀	Concentration (ng/μl)
NC/NI	6.827	273.1
NC/I	8.867	345.7
CC/NI	19.479	779.1
CCB/NI	9.941	397.7
CB/NI	32.265	1290.6
CBI(B)	7.468	298.7
CCI(B)	16.249	650.0
CCBI(B)	3.861	154.4
CBI(A)	26.460	1058.4
CCI(A)	16.044	641.7
CCBI(A)	7.161	286.4



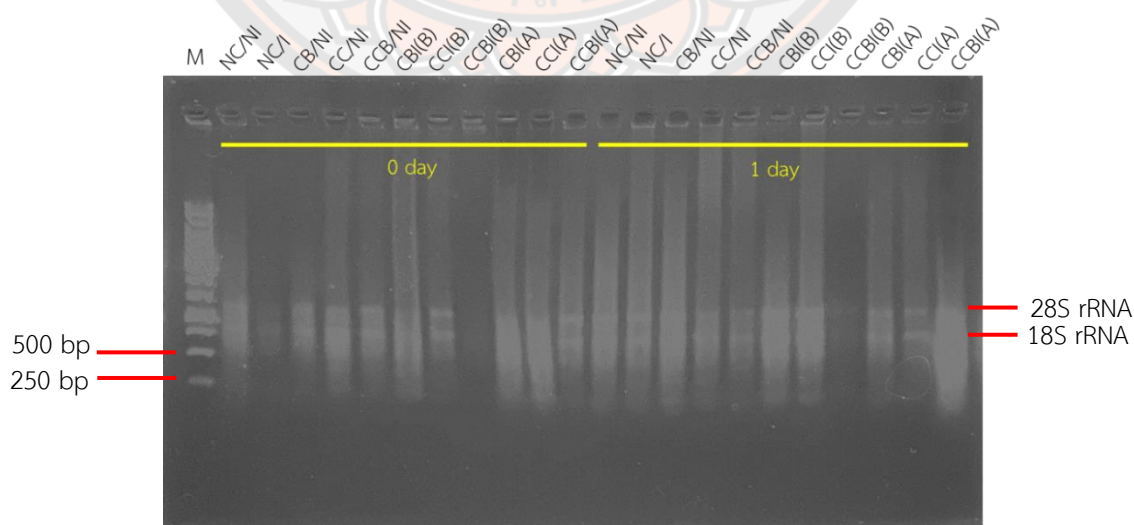
ภาพ 23 ผลการสกัดอาร์เอ็นเอของมะม่วงในวันที่ 6 บน 1% Agarose gel โดย M คือ 1Kb DNA ladder (GeneOn)

ตาราง 20 ค่าการดูดกลืนแสงของอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างมะม่วงในวันที่ 6

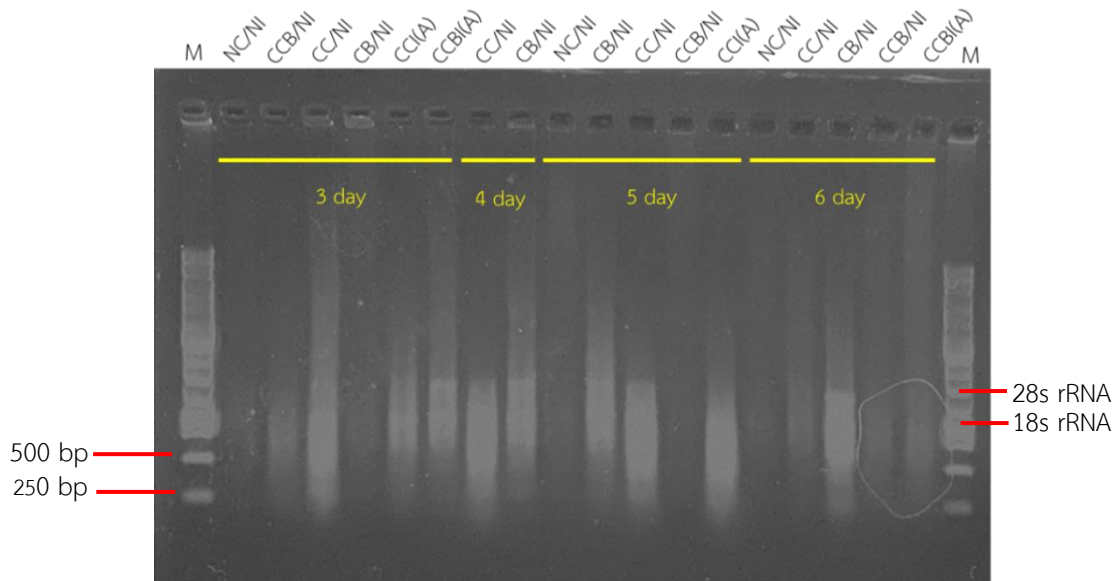
Sample	A ₂₆₀	Concentration (ng/μl)
NC/NI	38.556	1542.2
NC/I	10.682	427.3
CC/NI	26.577	1063.1
CCB/NI	12.290	491.6
CB/NI	28.470	1138.8
CBI(B)	9.322	372.9
CCI(B)	25.305	1012.2
CCBI(B)	4.769	190.8
CBI(A)	21.551	862.0
CCI(A)	9.260	370.4
CCBI(A)	8.570	342.8

2. การกำจัดดีเอ็นเอจากสารละลายอาร์เอ็นเอ

จากการกำจัดดีเอ็นเอจากสารละลายอาร์เอ็นเอเมื่อนำไปตรวจสอบด้วยเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ พบว่า แลบดีเอ็นเอที่เคยปรากฏอยู่หายไป แต่ปริมาณของอาร์เอ็นเอลดลงเป็นจำนวนมาก และแลบอาร์เอ็นเอบางแลบปรากฏขึ้นอย่างไม่ชัดเจน (ภาพ 24-25)



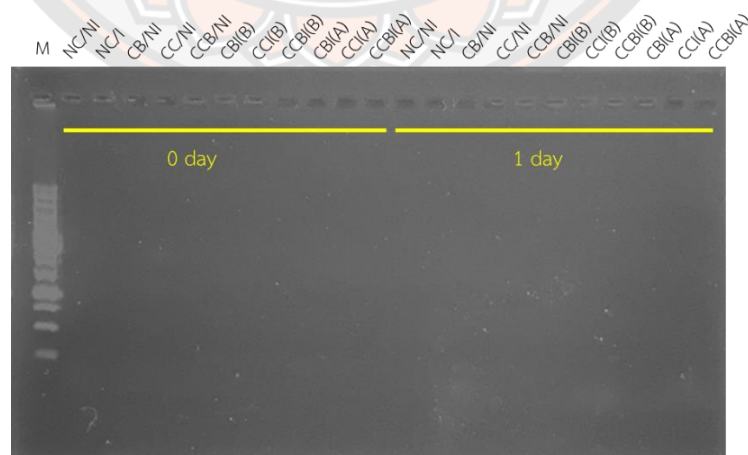
ภาพ 24 ผลการกำจัดดีเอ็นเอจากสารละลายอาร์เอ็นเอของมะม่วงในวันที่ 0 และ 1 บน 1% Agarose gel โดย M คือ 1Kb DNA ladder (GeneOn)



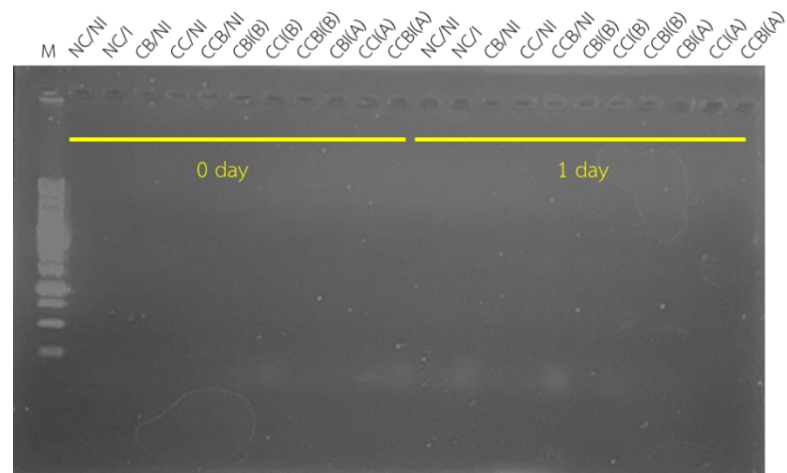
ภาพ 25 ผลการกำจัดดีเอ็นเอจากสารละลายอาร์เอ็นเอของมะม่วงในวันที่ 3, 4, 5 และ 6 บน 1% Agarose gel โดย M คือ 1Kb DNA ladder (GeneOn)

3. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน β -1,3-glucanase ยีน Actin และยีน GAPDH ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

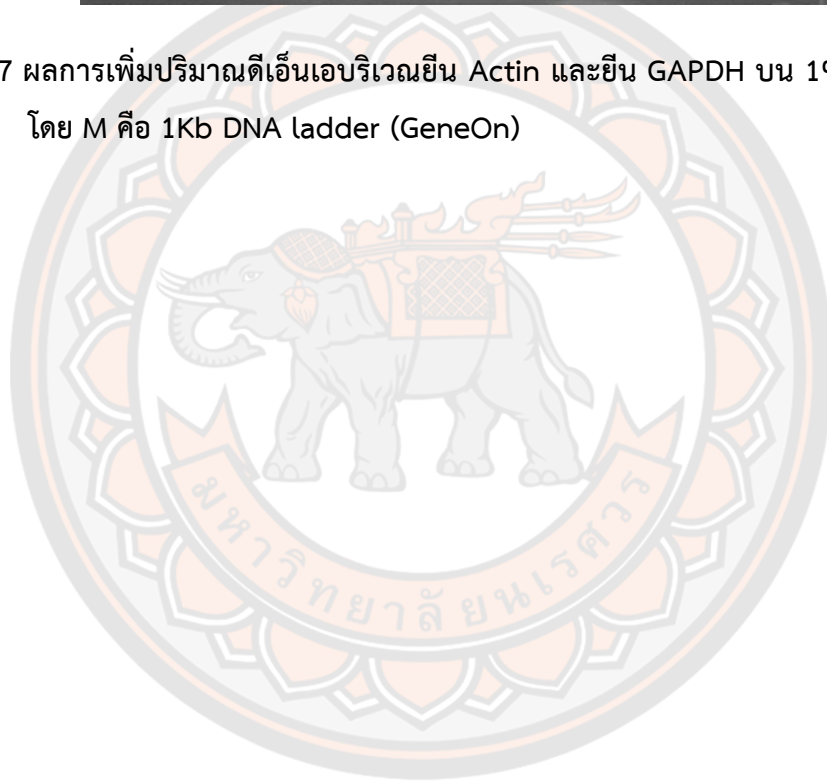
จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ยีน β -1,3-glucanase โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 3 คู่ และใช้ไพรเมอร์ของ ยีน Actin กับ ยีน GAPDH อย่างละ 1 คู่ พบว่าไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากไพรเมอร์ทั้ง 5 คู่ได้ (ภาพ 26-27)



ภาพ 26 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน β -1,3-glucanase บน 1% Agarose gel โดย M คือ 1Kb DNA ladder (GeneOn)



ภาพ 27 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน Actin และยีน GAPDH บน 1% Agarose gel โดย M คือ 1Kb DNA ladder (GeneOn)



บทที่ 5

บทสรุป

อภิปรายผลการวิจัย

การแยกเชื้อราก่อโรคในมะม่วง

1. การจำแนกเชื้อราด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

การแยกเชื้อราจากรอยโรคบนผลมะม่วงน้ำดอกไม้ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเส้นใยเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ มีสีขาวยิ่ง สอดคล้องกับรายงานว่าลักษณะเส้นใยของเชื้อรา *C. gloeosporioides* มีลักษณะเป็นปุยสีขาวมีความหนาแน่นของเส้นใย มีสีขาวยอมเทา (Khanzada et al., 2018) และพบว่าโคนิเดียมีลักษณะทรงกระบอก หัวมนท้ายมน มีความยาว 14-16 ไมโครเมตร กว้าง 4-6 ไมโครเมตร (Aruna Prasad et al., 2022) โดยการระบุชนิดของเชื้อราสามารถอ้างอิงจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น ขนาด รูปร่างของโคนิเดีย appressoria setae ลักษณะรูปร่างของเส้นใย สี และอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อรา แต่อย่างไรก็ตามเชื้อราที่แยกได้มีลักษณะคล้ายคลึงกับเชื้อรา *C. siamense* ที่มีเส้นใยสีขาวปนเทา อีกทั้งยังมีลักษณะโคนิเดียทรงกระบอก (Li et al., 2020) ซึ่งหากอาศัยเพียงลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวในการจัดจำแนกยังไม่เพียงพอในการจำแนกชนิดของเชื้อรา เนื่องจากความแปรปรวนภายใต้สภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป (Huang et al., 2022) ดังนั้นจึงต้องอาศัยการตรวจสอบลักษณะทางพันธุกรรมเพื่อยืนยันชนิดของเชื้อราเพิ่มเติม

2. การจำแนกเชื้อราโดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS

จากการตรวจสอบลักษณะทางพันธุกรรมเพื่อยืนยันชนิดของเชื้อรา โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ Internal Transcribed Spacer (ITS) โดยเพิ่มปริมาณบริเวณ rDNA ในช่วง ITS1-5.8S rDNA-ITS2 ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ พบว่าชิ้นดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดประมาณ 550 คู่เบส จากนั้นทำการวิเคราะห์หาลำดับเบสของเชื้อราที่ใกล้เคียงกันในฐานข้อมูลของ NCBI พบว่าเชื้อราที่แยกได้จากรอยโรคบนผลมะม่วงมีลำดับเบสใกล้เคียงกับเชื้อรา *C. gloeosporioides* มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 99.63% (JX902437.1 และ MT012110.1) ซึ่งจากการจำแนกเชื้อราโดยใช้ข้อมูลทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางพันธุกรรมสามารถใช้ในการจำแนกชนิดของเชื้อราได้ในเบื้องต้น (Chowdhury and Rahim, 2009) จากการศึกษาการจำแนกเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่ก่อให้เกิดโรคแอนแทรคโนสในมะม่วงน้ำดอกไม้ในประเทศไทยพบว่าสามารถแยกเชื้อราได้ทั้งหมด

37 ไอโซเลท ซึ่งลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราที่แยกได้จากรอยโรคแอนแทรคโนสมีลักษณะที่ใกล้เคียงกันมาก จึงได้ทำการระบุชนิดของเชื้อราด้วยลำดับเบสบริเวณ ITS , β -tubulin (TUB2), actin (ACT) และ chitin synthase (CHS-1) พบว่าสามารถจำแนกเชื้อราสกุลนี้ได้ 4 ชนิด คือ *C. acutatum*, *C. asianum*, *C. siamense* และ *C. gloeosporioides* (Rattanakreetakul et al., 2023) ซึ่งจะเห็นได้เชื้อราในสกุล *Colletotrichum* spp. หลายชนิดสามารถก่อโรคแอนแทรคโนสได้ ดังนั้นการนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์มาวิเคราะห์กับฐานข้อมูลนั้นมีความแม่นยำมากกว่าการใช้ข้อมูลทางสัณฐานวิทยา เนื่องจากเชื้อราหลายชนิดนั้นมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เหมือนหรือคล้ายกัน จึงต้องอาศัยข้อมูลทางดีเอ็นเอเพื่อช่วยในการจัดจำแนกชนิดของเชื้อราอย่างมีประสิทธิภาพ

การทดสอบประสิทธิภาพของสารเคลือบผิวโคโตซานผสมสารสกัดมะระขี้นกในการควบคุมการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วงที่ได้รับการปลูกเชื้อในห้องปฏิบัติการ

1. ลักษณะอาการของโรค

การทดสอบประสิทธิภาพของสารเคลือบผิวโคโตซานผสมสารสกัดมะระขี้นกในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสที่เกิดจากเชื้อรา *C. gloeosporioides* บนผลมะม่วงน้ำดอกไม้ นาน 10 วัน พบว่ามะม่วงที่เคลือบผิวด้วยโคโตซาน 2% ผสมสารสกัดมะระขี้นกสามารถควบคุมการเกิดโรคแอนแทรคโนสได้ดีกว่ามะม่วงที่เคลือบผิวด้วยกรรมวิธีอื่น ๆ เนื่องจากโคโตซานที่ใช้มีความเข้มข้นสูงซึ่งโคโตซานสามารถชะลอการเจริญเติบโตของเส้นใยและยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *Alternaria brassicicola* และ *Fusarium oxysporum* (Phuklung et al., 2012) ได้ โดยโคโตซานเข้าไปทำลายความสมบูรณ์ของโครงสร้างผนังเซลล์เชื้อราและส่งผลให้มีการสังเคราะห์โปรตีนลดลง (Meng et al., 2020) ซึ่งโคโตซานมีคุณสมบัติที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยโดยตรง เพราะจับกับบวมโพลีเมอร์ของโคโตซานสามารถทำปฏิกิริยากับประจุลบที่ผนังเซลล์ของเชื้อรา จึงส่งผลให้เกิดการรั่วไหลของสารประกอบจำพวกโปรตีน (proteinaceous) และส่วนประกอบอื่น ๆ ภายในเซลล์ ส่งผลให้เซลล์อยู่ในสภาวะ Oxidative stress ทำให้เชื้อราตายได้ (Rabea et al., 2003) นอกจากนี้โคโตซานยังสามารถกระตุ้นกลไกการป้องกันการเกิดโรคหลังการเก็บเกี่ยวได้โดยการเหนี่ยวนำการทำงานของเอนไซม์ ได้แก่ β -1,3-glucanase และ peroxidase (Jongsri et al., 2017) นอกจากนี้พบว่าการใช้โคโตซานในการกระตุ้นการชักนำให้เกิดการต้านทานต่อเชื้อรา โดยโคโตซานทำหน้าที่เป็น elicitor ไปกระตุ้นกลไกการส่งสัญญาณ (Signal Transduction) ภายในเซลล์ ให้สังเคราะห์สารในกลุ่ม PR protein เช่น chitinase, glucanase, peroxidase และ phytoalexin เป็นต้น เพื่อเข้าไปทำลายเชื้อรา (ศิริสิทธิ์ และพรณี, 2559)

นอกจากการใช้โคโตซานยังผสมสารสกัดมะระขี้นก ซึ่งจากการวิเคราะห์สารพิษเคมีในส่วนต่าง ๆ ของมะระขี้นกโดยใช้เอทานอลในการสกัดใบ ลำต้น ผล และราก ของมะระขี้นกพบว่ามีสาร

Terpenoids, Sterols (Jia et al., 2017), Phenolics, Tannins, Flavonoids และ Saponin ซึ่งจากการทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตและการงอกของสปอร์เชื้อรา พบว่าสารสกัดในส่วนของผลมะระขี้นกสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตและยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *Alternaria alternata* ได้ดีกว่า เนื่องจากผลของมะระขี้นกมีปริมาณของสารพฤกษเคมีในปริมาณมากและหลากหลายประเภทเมื่อเทียบกับส่วนอื่น ๆ (Gupta et al., 2017) ซึ่งสารในกลุ่ม Phenolics มีฤทธิ์ที่ทำให้เกิดการเสื่อมสภาพของโปรตีน (Protein denature) ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อรา (Konuk and Ergüden, 2020) และยังพบว่าในผลของมะระขี้นกมีสารทุติยภูมิ ได้แก่ alkaloids, glycosides, carbohydrated, amino acids, proteins, phlobatanins, steroids, cardiac และ glycosides (Supraja et al., 2015)

นอกจากนี้ยังพบว่าในส่วนของเมล็ด ใบ และผลของมะระขี้นกมีไกลโคโปรตีน α -momocharin และ β -momorcharins ที่มีผลทำให้เซลล์ตายได้ (Kreethaphon et al., 2003; Yeung et al., 1986) จากการศึกษาพบว่าสารสกัดจากเมล็ดมะระขี้นกสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตและการงอกของสปอร์ของเชื้อรา *Fusarium solani* L. ได้ โดยสารสกัดจากเมล็ดมะระขี้นกส่งผลให้เกิดการความผิดปกติของการแบ่งเซลล์และทำให้เกิดการแตกของผนังเซลล์ของเชื้อรา เมื่อทำการตรวจสอบสารเคมีในเมล็ดและผลของมะระขี้นกพบว่ามีโปรตีน α -momocharin อีกทั้งยังพบว่าในผลและเมล็ดของมะระขี้นกมีสารฟีนอลิกและซาโปนินอีกด้วย ซึ่งอาจจะเป็นไปได้ว่าสารและโปรตีนดังกล่าวส่งผลให้เกิดการความผิดปกติของการแบ่งเซลล์และทำให้เกิดการแตกของผนังเซลล์ของเชื้อรา *Fusarium solani* L. (Wang et al., 2016)

การศึกษาโปรตีน α -momorcharins ที่เป็น RIPs ที่ถูกสร้างขึ้นโดยมะระขี้นกช่วยเพิ่มการป้องกันไวรัสในใบยาสูบและแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อรา โดยการนำโปรตีน α -momorcharins จากเมล็ดมะระขี้นกมาทำการพ่นบนใบยาสูบและทำการทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตและการยับยั้งงอกของสปอร์ของเชื้อราพบว่า α -momorcharins สามารถกระตุ้นให้เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตัวเองเพิ่มขึ้นและ α -momorcharins สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตและยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อรา *Bipolaris maydis*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Aspergillus oryzae*, *Fusarium graminearum* และ *Aspergillus niger* ได้ (Zhu et al., 2013)

2. การสูญเสียน้ำหนักผล

เมื่อผลมะม่วงเริ่มสุก เนื้อของมะม่วงจะนิ่มมากขึ้น น้ำหนักผลลดลง ความแน่นเนื้อลดลง จากการศึกษาของพบว่าผลมะม่วงที่เคลือบด้วยไคโตซานมีเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักน้อยกว่ามะม่วงที่ไม่ได้เคลือบผิว การใช้ไคโตซานและไคโตซานผสมสารสกัดมะระขี้นกสามารถชะลอการสุกของมะม่วงได้ โดยสารเคลือบผิวไคโตซานมีสร้างชั้นฟิล์มที่เคลือบบนผิวมะม่วงส่งผลให้มะม่วงมีอัตรา

การหายใจลดลง เนื่องจากไคโตซานที่เคลือบบนผิวมะม่วงทำให้เกิดชั้นฟิล์มบนพื้นผิวของผลไม้เพื่อป้องกันการสูญเสียน้ำ (Kumar et al., 2017) และออกซิเจน ซึ่งส่งผลทำให้มะม่วงมีการสุกช้าลง และมีอายุหลังการเก็บเกี่ยวยาวนานมากยิ่งขึ้น แต่อย่างไรก็ตาม จากการศึกษามะม่วงที่เคลือบผิวด้วยไคโตซาน 2% ผสมสารสกัดมะระขี้นก มีเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักมากที่สุด เนื่องจากไคโตซานความเข้มข้น 2% มีความเข้มข้นสูง ดังนั้นเมื่อละลายไคโตซานในสารละลาย สารเคลือบผิวไคโตซานจึงมีความหนืดมาก ส่งผลให้สารเคลือบผิวมะม่วงมีความหนืดมากขึ้น เมื่อสารเคลือบผิวแห้งจึงแตกและหลุดลอกออกมา ส่งผลให้ผลมะม่วง มีการหายใจเพิ่มมากขึ้น และน้ำหนักของผลมะม่วงลดลงมากกว่าผลไม้ที่เคลือบด้วยไคโตซานที่มีความเข้มข้นต่ำกว่า ดังนั้นการสูญเสียน้ำหนักส่งผลต่อคุณภาพของผลไม้และระยะเวลาในการเก็บรักษาหลังการเก็บเกี่ยว (Vivek and Subbarao, 2018)

3. ความแน่นเนื้อ

ความแน่นเนื้อของผลมะม่วงพบว่า ผลมะม่วงที่เคลือบด้วยไคโตซาน 1% มีความแน่นเนื้อน้อยที่สุด ซึ่งน้อยกว่าทุกกรรมวิธี เนื่องจากไคโตซาน 1% มีความเข้มข้นสูง แต่เมื่อทำการเคลือบผิวบนผลมะม่วง สารเคลือบผิวไม่มีการแตกและหลุดลอกออกมา อีกทั้งการศึกษานี้ใช้ไคโตซานน้ำหนักโมเลกุลสูงจึงทำให้มะม่วงมีอัตราการหายใจและการผลิตเอทิลินที่ต่ำกว่า (Jitareerat et al., 2007) ดังนั้นไคโตซานที่มีความเข้มข้นสูงจึงส่งผลให้มะม่วงมีการสุกที่ผิดปกติ

การมีชีวิตของเนื้อเยื่อบริเวณรอยโรค

1. การสกัดอาร์เอ็นเอ

จากการสกัดอาร์เอ็นเอตัวอย่างมะม่วงในวันที่ 0, 1, 3, 4, 5 และ 6 พบว่าอาร์เอ็นเอที่สกัดได้มีค่าความเข้มข้นสูงแต่ยังมีการปนเปื้อน ความบริสุทธิ์ต่ำ อาจเนื่องมาจากในขั้นตอนการบดตัวอย่างที่ยังบดไม่ละเอียดมากพอและตัวอย่างมีสารในกลุ่มพอลิแซคคาไรด์จำนวนมาก สารจึงทำปฏิกิริยาได้ไม่เต็มประสิทธิภาพ นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่น ๆ เข้ามาเกี่ยวข้อง เช่น ในงานวิจัยของ López-Gómez et al. (1992) ที่รายงานว่า ในระหว่างที่ผลมะม่วงกำลังสุกมีการเพิ่มขึ้นของ RNase ที่เป็นตัวทำให้อาร์เอ็นเอเกิดการสลายตัว อีกทั้งในระหว่างการสุกของมะม่วง แป้งที่ไม่ละลายน้ำจะถูกแปลงกลับเป็นพอลิแซคคาไรด์ที่ละลายน้ำได้และเนื่องจากพอลิแซคคาไรด์เหล่านี้แสดงคุณสมบัติทางเคมีกายภาพคล้ายกับของอาร์เอ็นเอ ส่งผลให้อาจจะเกิดการปนเปื้อนในระหว่างการสกัดอาร์เอ็นเอและส่งผลต่อค่าอัตราส่วนค่า A260/A280 และในระหว่างที่มะม่วงกำลังสุกแล้วเกิดการติดเชื้อส่งผลให้เซลล์ของมะม่วงตาย เป็นสาเหตุให้ยีนไม่เกิดการแสดงออกและไม่สามารถสกัดอาร์เอ็นเอออกมาได้ เป็นต้น รวมไปถึงในขั้นตอนการดูดสารในแต่ละครั้งอาจมีการปนเปื้อนของสารในกลุ่มฟีนอล อาร์เอ็นเอที่ได้จึงมีความบริสุทธิ์ต่ำ ไม่สามารถนำไปใช้ในการสังเคราะห์ซีดีเอ็นเอได้ จึงส่งผลให้ไม่สามารถตรวจสอบการแสดงออกของยีนได้

2. การกำจัดดีเอ็นเอจากสารละลายอาร์เอ็นเอ

จากการกำจัดสารละลายดีเอ็นเอออกจากสารละลายอาร์เอ็นเอ โดยนำตัวอย่างอาร์เอ็นเอ มาเติมบัพเฟอร์ทำให้ความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอลดลง พบว่า แลกดีเอ็นเอที่เคยปรากฏอยู่หายไป แต่ในขณะเดียวกันปริมาณของอาร์เอ็นเอลดลงเป็นจำนวนมากเช่นกัน นอกจากนี้ยังพบว่า แลกอาร์เอ็นเอบางแลกปรากฏขึ้นอย่างไม่ชัดเจน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Li et al. (2022) ที่รายงานว่า การย่อยดีเอ็นเอในสารละลายอาร์เอ็นเอด้วย DNaseA ที่อาจจะทำให้คุณภาพของอาร์เอ็นเอลดลงและอาจส่งผลกระทบต่อการศึกษาข้อมูลการแสดงออกของยีน

3. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน β -1,3-glucanase ยีน Actin และยีน GAPDH ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน β -1,3-glucanase ยีน Actin และยีน GAPDH ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ดีเอ็นเอที่แปลงได้จากอาร์เอ็นเอที่ผ่านการกำจัดดีเอ็นเอ ผลที่ได้พบว่า ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน β -1,3-glucanase ยีน Actin และยีน GAPDH ได้ เนื่องจากไม่มีการปรากฏแถบแบนใด ๆ ขึ้นหลังจากการทำพีซีอาร์ ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการปนเปื้อนของสารต่าง ๆ เช่น การปนเปื้อนดีเอ็นเอ การปนเปื้อนฟีนอล-คลอโรฟอร์ม เป็นต้น ในการปนเปื้อนของดีเอ็นเอในตัวอย่างอาร์เอ็นเอที่สกัดด้วยฟีนอล-คลอโรฟอร์มและการกำจัดดีเอ็นเอด้วย DNase ส่งผลให้การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนเกิดข้อผิดพลาดจึงส่งผลให้ไม่ประสบความสำเร็จในการตรวจสอบการแสดงออกของยีน β -1,3-glucanase ในมะม่วงได้ (Korolenya et al., 2022)

สรุปผลการวิจัย

1. การแยกเชื้อราด้วยลักษณะสัณฐานวิทยาและจำแนกชนิดเชื้อราด้วยลักษณะทางพันธุกรรมโดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ Internal Transcribed Spacer (ITS) ด้วยเทคนิค PCR ผลการศึกษาสามารถจำแนกเชื้อราออกมาได้เพียงชนิดเดียว คือ *Colletotrichum gloeosporioides*
2. การพัฒนาผลิตภัณฑ์สารเคลือบผิวโคโตซานที่ผสมสารสกัดมะระขี้นก พบว่า โคโตซาน 2% ที่ผสมสารสกัดมะระขี้นก 500 ppm เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดในการชะลอการเกิดโรคแอนแทรคโนส ในขณะที่มะม่วงที่เคลือบผิวด้วยโคโตซาน 1% ที่ผสมสารสกัดมะระขี้นก 500 ppm มีความแน่นเนื้อของผลมากที่สุด
3. การศึกษาการแสดงออกของยีนในมะม่วง โดยทำการสกัดอาร์เอ็นเอ พบว่าสามารถสกัดอาร์เอ็นเอได้ปริมาณมาก แต่มีความบริสุทธิ์ต่ำ อีกทั้งหลังการกำจัดดีเอ็นเอปริมาณของอาร์เอ็นเอลดลงจำนวนมาก จึงไม่ประสบความสำเร็จในการสร้าง cDNA จึงยังไม่สามารถตรวจสอบการ

แสดงออกของยีนได้ แต่อย่างไรก็ตามพบว่า การเคลือบผิวผลมะม่วงก่อนการติดเชื้อ สามารถชะลออาการของโรคได้

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการวิเคราะห์ชนิดของสารประกอบเคมีของมะระชั้นกที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราเพิ่มเติม
2. ควรเก็บตัวอย่างมะม่วงบริเวณรอบ ๆ รอยแผลของโรค ไม่ควรเก็บตัวอย่างบริเวณที่เป็นโรคโดยตรงเนื่องจากเซลล์บริเวณที่เกิดรอยโรคได้รับความเสียหายจากโรคเกิดขึ้น ซึ่งอาจจะไม่ประสบผลสำเร็จในการสกัดอาร์เอ็นเอ
3. การใช้โคโตซานที่ความเข้มข้นสูงมักพบปัญหาเกี่ยวกับการสุกของผลไม้ ถึงแม้ว่าจะสามารถเก็บรักษาผลไม้ได้นานขึ้นแต่ไม่สามารถพัฒนากระบวนการสุกให้เข้าสู่ระยะการสุกได้ เนื่องจากความเข้มข้นที่สูงเกินไปทำให้เกิดการดึงน้ำในผลไม้มากเกินไปและอาจทำให้ผลไม้เหี่ยวได้



บรรณานุกรม

- Ajay, K. G. (2014). *Colletotrichum gloeosporioides*: biology, pathogenicity and management in India. *Journal of Plant Physiology & Pathology*, 2(2), 2-11.
- Antoniw, J., Ritter, C., Pierpoint, W., & Van Loon, L. (1980). Comparison of three pathogenesis-related proteins from plants of two cultivars of tobacco infected with TMV. *Journal of General Virology*, 47(1), 79-87.
- Arauz, L. F. (2000). Mango anthracnose: Economic impact and current options for integrated management. *Plant disease*, 84(6), 600-611.
- Aruna Prasad, K., Gangadhara Naik, B., Suresh Patil, K. H., Hosagoudar, G., Sathish, K., & Ravikumar, M. (2022). Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum gloeosporioides* (penz) sac. isolates causing inflorescence die-back and leaf spot disease in arecanut.
- Baiyee, B., Ito, S.I., & Sunpapao, A. (2019). *Trichoderma asperellum* T1 mediated antifungal activity and induced defense response against leaf spot fungi in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 106, 96-101.
- Bhardwaj, G., Ravi, I., Kumar, S., & Sharma, V. (2021). Induction of β -1, 3-glucanase and chitinase activity, cloning and their characterization in the defense response of *Cuminum cyminum* plant against the fungal pathogen *Fusarium oxysporum*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 54(19-20), 1617-1632.
- Bill, M., Sivakumar, D., Beukes, M., & Korsten, L. (2016). Expression of pathogenesis-related (PR) genes in avocados fumigated with thyme oil vapours and control of anthracnose. *Food chemistry*, 194, 938-943.
- Chekka, S. V., & Mantipelly, N. K. (2020). *Momordica charantia*: A natural medicinal plant. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*, 12(2), 129-135.
- Chowdhury, M., & Rahim, M. (2009). Integrated crop management to control anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) of mango. *Journal of Agriculture & Rural Development (Gazipur)*, 7(1/2), 115-120.
- Crous, P. W., Aptroot, A., Kang, J.-C., Braun, U., & Wingfield, M. J. (2000). The genus

- Mycosphaerella and its anamorphs. *Studies in Mycology*, 45, 107-121.
- Daam, M. A., Garcia, M. V., Scheffczyk, A., & Römbke, J. (2020). Acute and chronic toxicity of the fungicide carbendazim to the earthworm *Eisenia fetida* under tropical versus temperate laboratory conditions. *Chemosphere*, 255, 126871.
- Dautt-Castro, M., López-Virgen, A. G., Ochoa-Leyva, A., Contreras-Vergara, C. A., Sortillón-Sortillón, A. P., Martínez-Téllez, M. A., González-Aguilar, G. A., Casas-Flores, J. S., Sañudo-Barajas, A., & Kuhn, D. N. (2019). Genome-wide identification of mango (*Mangifera indica* L.) polygalacturonases: Expression analysis of family members and total enzyme activity during fruit ripening. *Frontiers in Plant Science*, 10, 462080.
- Dinh, S.-Q., Chongwungse, J., Pongam, P., & Sangchote, S. (2003). Fruit infection by *Colletotrichum gloeosporioides* and anthracnose resistance of some mango cultivars in Thailand. *Australasian Plant Pathology*, 32, 533-538.
- Fukamizo, T. (2000). Chitinolytic enzymes catalysis, substrate binding, and their application. *Current Protein and Peptide Science*, 1(1), 105-124.
- Gamir, J., Darwiche, R., Van't Hof, P., Choudhary, V., Stumpe, M., Schneiter, R., & Mauch, F. (2017). The sterol-binding activity of PATHOGENESIS-RELATED PROTEIN 1 reveals the mode of action of an antimicrobial protein. *The Plant Journal*, 89(3), 502-509.
- Gerhard, L., & Frederick, M. (1999). Functions and regulation of plant β -1, 3-Glucanases (PR-2). *Pathogenesis-related proteins in plants*. CRC Press LLC, Boca Raton, 49-76.
- Gupta, M., Sharma, S., & Bhadauria, R. (2017). Phytotoxicity of *Momordica charantia* extracts against *Alternaria alternata*. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 9(1), 28.
- Hesami, A., Kavoosi, S., Khademi, R., & Sarikhani, S. (2021). Effect of chitosan coating and storage temperature on shelf-life and fruit quality of *Ziziphus mauritiana*. *International Journal of Fruit Science*, 21(1), 509-518.
- Hong, J. K., Lee, S. C., & Hwang, B. K. (2005). Activation of pepper basic PR-1 gene promoter during defense signaling to pathogen, abiotic and environmental

- stresses. *Gene*, 356, 169-180.
- Huang, R., Gui, Q., Zhang, Y., Sun, W., Tang, L., Huang, S., Guo, T., Li, Q., Mo, J., & Huang, H. (2022). Identification and Observation of Infection Processes of *Colletotrichum* Species Associated with Pearl Plum Anthracnose in Guangxi, China. *Plant disease*, 106(12), 3154-3165.
- Huang, X., You, Z., Luo, Y., Yang, C., Ren, J., Liu, Y., Wei, G., Dong, P., & Ren, M. (2021). Antifungal activity of chitosan against *Phytophthora infestans*, the pathogen of potato late blight. *International Journal of Biological Macromolecules*, 166, 1365-1376.
- Ingle, A., & Kapgate, R. (2018). Phytochemical Screening and anti-microbial activity of *Momordica charantia* Linn. *International Journal of Pharmacological Research*, 8(7), 63-65.
- Jach, G., Görnhardt, B., Mundy, J., Logemann, J., Pinsdorf, E., Leah, R., Schell, J., & Maas, C. (1995). Enhanced quantitative resistance against fungal disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco. *The Plant Journal*, 8(1), 97-109.
- Jia, S., Shen, M., Zhang, F., & Xie, J. (2017). Recent advances in *Momordica charantia*: functional components and biological activities. *International journal of molecular sciences*, 18(12), 2555.
- Jitareerat, P., Paumchai, S., Kanlayanarat, S., & Sangchote, S. (2007). Effect of chitosan on ripening, enzymatic activity, and disease development in mango (*Mangifera indica*) fruit. *New Zealand journal of crop and horticultural science*, 35(2), 211-218.
- Jongsri, P., Rojsitthisak, P., Wangsomboondee, T., & Seraypheap, K. (2017). Influence of chitosan coating combined with spermidine on anthracnose disease and qualities of 'Nam Dok Mai' mango after harvest. *Scientia Horticulturae*, 224, 180-187.
- Jutamat, K. (2016). Edible coating and film for vegetables and fruits. *Food Journal*, 46(1), 33-37.
- Kankam, F., Larbi-Koranteng, S., Adomako, J., Kwodaga, J. K., Akpatsu, I. B., Danso, Y., & Sowley, E. N. K. (2022). Anthracnose Disease of Mango: Epidemiology, Impact

- and Management Options. In *Current and Emerging Challenges in the Diseases of Trees*. IntechOpen.
- Khalil, H. A., Abdelkader, M. F., Lo'ay, A., El-Ansary, D. O., Shaaban, F. K., Osman, S. O., Shenawy, I. E., Osman, H.-E. H., Limam, S. A., & Abdein, M. A. (2022). The combined effect of hot water treatment and chitosan coating on mango (*Mangifera indica* L. cv. Kent) fruits to control postharvest deterioration and increase fruit quality. *Coatings*, 12(1), 83.
- Khanzada, M. A., Ansari, A., Rajput, M. A., Maitlo, S., Rajput, A. Q., & Ujjan, A. A. (2018). Effect of different abiotic factors on the growth and sporulation of *Colletotrichum gloeosporioides* causing anthracnose of mango. *Plant Protection*, 2(1), 23-30.
- Konuk, H. B., & Ergüden, B. (2020). Phenolic-OH group is crucial for the antifungal activity of terpenoids via disruption of cell membrane integrity. *Folia Microbiologica*, 65(4), 775-783.
- Korolenya, V., Gavrilov, K., Sevost'ianova, K., Shevela, A., Filipenko, M., & Smetanina, M. (2022). Evaluation of advantages of lithium chloride as a precipitating agent in RNA isolation from frozen vein segments. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 173(3), 384-389.
- Kreethaphon, S., Kongtawelert, P., & Nikornpun, M. (2003). Determination of Local Bitter Gourd 30 KDa Protein and Horticultural Characteristics. *Journal of Agriculture*, 20(2), 159-167.
- Kumar, D. S., Sharathnath, K. V., Yogeswaran, P., Harani, A., Sudhakar, K., Sudha, P., & Banji, D. (2010). A medicinal potency of *Momordica charantia*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 1(2), 95-100.
- Kumar, P., Sethi, S., Sharma, R., Srivastav, M., & Varghese, E. (2017). Effect of chitosan coating on postharvest life and quality of plum during storage at low temperature. *Scientia Horticulturae*, 226, 104-109.
- Lee-Huang, S., Huang, P. L., Chen, H.-C., Huang, P. L., Bourinbaiar, A., Huang, H. I., & Kung, H.-f. (1995). Anti-HIV and anti-tumor activities of recombinant MAP30 from bitter melon. *Gene*, 161(2), 151-156.
- Leng, P., Zhang, Z., Li, Q., Zhao, M., & Pan, G. (2014). Microemulsion formulation of

- carbendazim and its in vitro antifungal activities evaluation. *Plos one*, 9(10), e109580.
- Li, L., Mohd, M. H., & Zakaria, L. (2020). Colletotrichum species associated with mango (*Mangifera indica* L.) stem-end rot. *Journal of Plant Pathology*, 102, 505-509.
- Li, Q., Dunn, E., Grandmaison, E., & Goosen, M. F. (1992). Applications and properties of chitosan. *Journal of bioactive and compatible polymers*, 7(4), 370-397.
- Li, X., Zhang, P., Wang, H., & Yu, Y. (2022). Genes expressed at low levels raise false discovery rates in RNA samples contaminated with genomic DNA. *BMC genomics*, 23(1), 554.
- Liu, F., Tang, G., Zheng, X., Li, Y., Sun, X., Qi, X., Zhou, Y., Xu, J., Chen, H., & Chang, X. (2016). Molecular and phenotypic characterization of *Colletotrichum* species associated with anthracnose disease in peppers from Sichuan Province, China. *Scientific reports*, 6(1), 32761.
- Meng, D., Garba, B., Ren, Y., Yao, M., Xia, X., Li, M., & Wang, Y. (2020). Antifungal activity of chitosan against *Aspergillus ochraceus* and its possible mechanisms of action. *International Journal of Biological Macromolecules*, 158, 1063-1070.
- Nandeeshkumar, P., Sudisha, J., Ramachandra, K. K., Prakash, H., Niranjana, S., & Shekar, S. H. (2008). Chitosan induced resistance to downy mildew in sunflower caused by *Plasmopara halstedii*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 72(4-6), 188-194.
- Neto, J. A. S., Ambrosio, M. M. Q., Araujo, M. B. M., da Silva, R. M., Pinto, P. S. L., & Holanda, I. S. A. (2022). Morphological, molecular and pathogenic characterization of *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from mango. *Revista caatinga*, 35(3), 514-527.
- O'Connell, R., Perfect, S., Hughes, B., Carzaniga, R., Bailey, J., & Green, J. (2000). Dissecting the Cell Biology of *Colletotrichum* Infection Processes. In *Colletotrichum : Host Specificity, Pathology, and Host-Pathogen Interaction* (pp. 57-77). The American Phytopathological Society.
- O'Connell, R. J., Thon, M. R., Hacquard, S., Amyotte, S. G., Kleemann, J., Torres, M. F., Damm, U., Buiate, E. A., Epstein, L., & Alkan, N. (2012). Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and

- transcriptome analyses. *Nature genetics*, 44(9), 1060-1065.
- Oide, S., Bejai, S., Staal, J., Guan, N., Kaliff, M., & Dixelius, C. (2013). A novel role of PR 2 in abscisic acid (ABA) mediated, pathogen-induced callose deposition in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*, 200(4), 1187-1199.
- Oragwa Leonard, N., Efiom Otu, O., & Okwute Simon, K. (2013). Phytochemicals, anti-microbial and free radical scavenging activities of *Momordica charantia* Linn (Palisota Reichb) seeds. *African Journal of Pure and Applied*, 7(12), 405-409.
- Peian, Z., Haifeng, J., Peijie, G., Sadeghnezhad, E., Qianqian, P., Tianyu, D., Teng, L., Huanchun, J., & Jinggui, F. (2021). Chitosan induces jasmonic acid production leading to resistance of ripened fruit against *Botrytis cinerea* infection. *Food chemistry*, 337, 127772.
- Perfect, S. E., Hughes, H. B., O'Connell, R. J., & Green, J. R. (1999). *Colletotrichum*: a model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. *Fungal genetics and Biology*, 27(2-3), 186-198.
- Phuklung, N., Sopondilok, T., Pothikhawet, C., & Photchanachai, S. (2012). A study of inhibitory efficacy of chitosan on *Alternaria brassicicola* and *Fusarium oxysporum* on PDA. *Agricultural Science Journal*, 43(3), 612-615.
- Rabea, E. I., Badawy, M. E.-T., Stevens, C. V., Smagghe, G., & Steurbaut, W. (2003). Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules*, 4(6), 1457-1465.
- Rattanakreetakul, C., Keawmanee, P., Bincader, S., Mongkolporn, O., Phuntumart, V., Chiba, S., & Pongpisutta, R. (2023). Two newly identified *Colletotrichum* species associated with mango anthracnose in central Thailand. *Plants*, 12(5), 1130.
- Repka, V., Kubiková, J., & Fischerová, I. (2015). Immunodetection of PR-1-like proteins in grapevine leaves infected with *Oidium tuckeri* and in elicited suspension cell cultures. *VITIS-Journal of Grapevine Research*, 39(3), 123.
- Sharma, M., Maheshwari, N., Khan, F. H., & Mahmood, R. (2022). Carbendazim toxicity in different cell lines and mammalian tissues. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 36(12), e23194.
- Simmons, C. R. (1994). The physiology and molecular biology of plant 1, 3- β -D-

- glucanases and 1, 3; 1, 4- β -D-glucanases. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 13(4), 325-387.
- Supraja, P., Thaslim, B., C, N., Kiranmayee, P., & Rayalcheruvu, U. (2015). Identification of an alkaloid momordicin from fruits of *Momordica charantia* L. *International Journal of Scientific & Engineering Research*, 6(2), 168-172.
- Tangpao, T., Phuangsaujai, N., Kittiwachana, S., George, D. R., Krutmuang, P., Chuttong, B., & Sommano, S. R. (2022). Evaluation of Markers Associated with Physiological and Biochemical Traits during Storage of 'Nam Dok Mai Si Thong' Mango Fruits. *Agriculture*, 12(9), 1407.
- Van Loon, L. C., & Van Strien, E. (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 55(2), 85-97.
- Vivek, K., & Subbarao, K. (2018). Effect of edible chitosan coating on combined ultrasound and NaOCl treated kiwi fruits during refrigerated storage. *International food research journal*, 25(1), 101-108.
- Wang, S., Zheng, Y., Xiang, F., Li, S., & Yang, G. (2016). Antifungal activity of *Momordica charantia* seed extracts toward the pathogenic fungus *Fusarium solani* L. *journal of food and drug analysis*, 24(4), 881-887.
- Watanabe, T., Kanai, R., Kawase, T., Tanabe, T., Mitsutomi, M., Sakuda, S., & Miyashita, K. (1999). Family 19 chitinases of *Streptomyces* species: characterization and distribution. *Microbiology*, 145(12), 3353-3363.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18(1), 315-322.
- Yeung, H., Li, W., Chan, W., Law, L., & Ng, T. (1986). Alpha and beta momorcharins: abortifacient proteins from the seeds of the bitter gourd *Momordica charantia* (Family Cucurbitaceae). *International Journal of Peptide and Protein Research*, 28(5), 518-524.
- Zhou, D., Wang, Z., Li, M., Xing, M., Xian, T., & Tu, K. (2018). Carvacrol and eugenol effectively inhibit *Rhizopus stolonifer* and control postharvest soft rot decay in

- peaches. *Journal of Applied Microbiology*, 124(1), 166-178.
- Zhu, F., Zhang, P., Meng, Y.-F., Xu, F., Zhang, D.-W., Cheng, J., Lin, H.-H., & Xi, D.-H. (2013). Alpha-momorcharin, a RIP produced by bitter melon, enhances defense response in tobacco plants against diverse plant viruses and shows antifungal activity in vitro. *Planta*, 237, 77-88.
- ธรรมศักดิ์ สมมาตย์. (2528). สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืช. กลุ่มหนังสือเกษตร. 388 หน้า.
- ฉัญลักษณ์ ตาสุข. (2556). การจัดการการผลิตมะม่วงน้ำดอกไม้ของเกษตรกรในอำเภอวังทอง จังหวัดพิษณุโลก มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช. นนทบุรี.
- นฤพร บังคำ. (2562). การยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสในมะม่วงน้ำดอกไม้ของมะระขี้นก. วิทยานิพนธ์ระดับปริญญาตรี วท.บ, มหาวิทยาลัยนเรศวร.
- นิพนธ์ วิสารทานนท์. (2542). โรคไม้ผลเขตร้อนและการป้องกันกำจัด: กล้าย ขนุน เงาะ ชมพู ทุเรียน ฝรั่ง พุทรา มะขาม มะม่วง มะละกอ มังคุด ลองกอง สับปะรด. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ คณะเกษตร ภาควิชาโรคพืช.
- ปรารค์ทอง กวานห้อง และเบญจมาศ รัตนชินกร. (2557). ผลของโคโตซานความเข้มข้นต่ำต่อคุณภาพการเก็บรักษาชมพูพันธุ์ทองสามสี. *วารสารเกษตร*, 42.
- พรทิพย์ เต็มวิเศษ, นงนภัส เลหาวิจิตร และมณฑิรา เกษมสุข. (2558). คู่มือการกำหนดพื้นที่ส่งเสริมการปลูกสมุนไพรเพื่อใช้ในทางเภสัชกรรมไทย. กรมการแพทย์และการแพทย์กระทรวงสาธารณสุข.
- มณีนีทิพย์ ขุนทอง. (2562). ความรู้สำหรับผู้ควบคุมการขายวัตถุอันตรายทางการเกษตร. สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กรมวิชาการเกษตร.
- ยุทธการ กองวงศ์, ชานนท์ มณีรัตน์ และปวีณา เดชคอบุดร. (2565). การผลิตมะม่วงคุณภาพเพื่อการส่งออก. กรมส่งเสริมการเกษตร กรุงเทพฯ. 41 หน้า.
- รัฐกร ศรีสุทธิ และสร้อยยา ณ ลำปาง. (2550). ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Colletotrichum* sp. โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเทคนิค ISSR. *วารสารเกษตร*, 23(2), 89-96.
- ศิริสิทธิ์ ศรีนวลปาน และพรรณณี อัครวดีรัตนกุล. ผลของโคโตซานต่อปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระและการต้านโรคใบไหม้ในข้าวสังข์หยดพัทลุง. *วารสารวิชาการและวิจัย มทร. พระนคร*. 10(2).
- ศุภชัยนวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว. (2566). ข้อมูลการจัดการหลังการเก็บเกี่ยว. คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 34 หน้า.
- สายชล เกตุษา. (2531). การยืดอายุการเก็บรักษาผลมะม่วง. *วารสารสมาคมพืชสวน*, 3(1), 34-40.
- สุมาลี ชื่นวัฒนา. (2542). การเปรียบเทียบผลผลิตคุณค่าทางโภชนาการและองค์ประกอบทางเคมีบางชนิดของมะระขี้นก *Momordica charantia* Linn. ที่ปลูกโดยไม่ใช้ดิน. *จุฬาลงกรณ์*

มหาวิทยาลัย.

