1. **ชื่อชุดโครงการวิจัย** การลดการใช้สารเคมีเพื่อป้องกันกำจัดศัตรูพืชหลังเก็บเกี่ยว

2. **ชื่อโครงการวิจัย** การจัดการโรคและสารพิษจากเชื้อราในผลิตผลเกษตรหลังการเก็บเกี่ยวโดยไม่ใช้สารเคมี

   กิจกรรม การควบคุมโรคโดยใช้สารกลุ่ม GRAS

   กิจกรรมย่อย -

3. **ชื่อการทดลอง** การใช้ Methyl Jasmonate และ Methyl Salicylate เพื่อควบคุมโรคผลเน่าของผลไม้จากเชื้อ *Phomopsis spp.*

4. **คณะผู้ดำเนินงาน**

   หัวหน้าการทดลอง รัมม์พัน โกศลานันท์[1]

   ผู้ร่วมงาน วีรภรณ์ เดชนำบัญชาชัย[1] ชุติมา วิธูรจิตต์[1]

5. **บทคัดย่อ**

โรคผลเน่าที่เกิดจากเชื้อ *Phomopsis spp.* เป็นโรคที่สำคัญของลองกองและเงาะซึ่งสามารถควบคุมได้ด้วย สารเคมี prochloraz และ imazalil 0.05 % (v/v) แต่ปัจจุบันผู้บริโภคคำนึงถึงความปลอดภัยด้านอาหาร ดังนั้นจึงนำ Methyl Jasmonate (MJ) และ Methyl Salicylate (MS) มาใช้เพื่อลดการเกิดโรคเนื่องจาก MJ และ MS มีคุณสมบัติชักนำให้ผลิตผลสร้างสารต้านทานทางธรรมชาติ ทำการทดลองที่ กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร ระหว่างปี 2555-2558 การทดลองแบ่งเป็น 2 ส่วน การทดลองในจานเลี้ยงเชื้อประกอบด้วย 9 กรรมวิธี 4 ซ้ำ ได้แก่ MS ที่ความเข้มข้น 0, 1.52, 15.24, 152.4, 1524 µl/l และ MJ ที่ความเข้มข้น 2.24, 22.4, 224, 2240 µl/l ผลการทดลอง พบว่า MS ทุกความเข้มข้นสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อ *Phomopsis spp.* ของลองกองได้ 100% ส่วน MJ ทุกความเข้มข้นไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ ส่วนเชื้อ *Phomopsis spp.* จากเงาะพบว่ากรรมวิธีที่มีศักยภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อจากเงาะได้แก่ กรรมวิธีที่รมด้วย MS ที่ความเข้มข้น MJ 152 และ 1524 µl/l ยับยั้ง ได้ 100% ที่ความเข้มข้น 1.52 และ 15.2 µl/l ยับยั้งได้ 68 และ 79% ส่วน MJ ยับยั้งได้ 29-49% การทดลองกับผลลองกองและเงาะโดยตรงแบ่งเป็น 3 การทดลอง ได้แก่ การทดลองที่ปลูกเชื้อก่อนรม ปลูกเชื้อหลังรมและเชื้อตามธรรมชาติ การทดลองที่ปลูกเชื้อก่อนรม มี 3 กรรมวิธี ได้แก่ ควบคุม กรรมวิธีที่รมด้วย MS ความเข้มข้น 0.75 และ 1.5 µl/l ผลการทดลองพบว่า กรรมวิธีที่มีศักยภาพในการควบคุมโรคจากลองกองที่เก็บไว้ที่ 13°C คือ การรมด้วย MS ความเข้มข้น 1.50 µl/l ส่วนที่อุณหภูมิห้องคือ การรมด้วย MS ความเข้มข้น 0.75 และ1.50 µl/l ส่วนเงาะกรรมวิธีที่มีศักยภาพในการควบคุมโรคที่เก็บไว้ที่ 13°C คือ กรรมวิธีที่รมด้วย MS ความเข้มข้น 0.75 µl/l ส่วนที่อุณหภูมิห้องคือ กรรมวิธีที่รมด้วย MS ความเข้มข้น 1.50 µl/l การทดลองที่ปลูกเชื้อหลังรม ประกอบด้วย 5 กรรมวิธี ควบคุม การรมด้วย MS ความเข้มข้น 0.75 และ 1.50 µl/l และ MJ ความเข้มข้น 2 และ 4 µl/l พบว่า กรรมวิธีที่มีศักยภาพในการควบคุมโรคสำหรับลองกอง ที่เก็บไว้ที่ 13°C และที่อุณหภูมิห้อง คือการรมด้วย MS ความเข้มข้น 0.75 µl/l และการรมด้วย MJ ความเข้มข้น 2 และ 4 µl/l โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางแผลต่ำกว่ากรรมวิธีควบคุมสำคัญทางสถิติ ส่วนเงาะกรรมวิธีที่มีศักยภาพในการควบคุมโรคที่เก็บไว้ที่ 13°C และที่

อุณหภูมิห้อง คือ กรรมวิธีที่รมด้วย MS ความเข้มข้น 0.75 µl/l และ MJ ความเข้มข้น 2 µl/l และ รรมวิธีที่รมด้วย MS ความเข้มข้น 1.50µl/l และ MJ ความเข้มข้น 2 µl/l ตามลำดับ การทดลองเชื้อตามธรรมชาติสำหรับลองกอง พบว่า เปอร์เซนต์การเกิดโรค คุณภาพ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติระหว่างกรรมวิธี อย่างไรก็ตามการรมด้วย MJ ทำให้ลองกองมีวิตามินซีสูงกว่ากรรมวิธีควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนเงาะพบว่ากรรมวิธีที่รมด้วย MJ ความเข้มข้น 2 µl/l มีเปอร์เซนต์การเกิดโรคมากที่สุด กรรมวิธีควบคุมมีการสูญเสียน้ำและความแน่นเนื้อสูงสุด เพราะ MS และ MJ สามารถรักษาความแข็งแรงของเยื่อหุ้มเซลล์ได้ ดังนั้นจึงลดการสูญเสียน้ำและความแน่นเนื้อ เมื่อวัดกิจกรรมของเอนไซม์ β-1 ,3 glucanase ของลองกอง พบว่า การรมด้วย MJ ความเข้มข้น 2 และ 4 µl/l และ MS ความเข้มข้น 0.75 µl/l มีกิจกรรมสูงกว่ากรรมวิธีควบคุมแสดงว่า MJ และ MS สามารถชักนำให้ลองกองสร้างสารต้านทานทางธรรมชาติได้ ส่วนเงาะพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ β-1 ,3 glucanase และ chitinase ไม่มีความแตกต่างทางสถิติระหว่างกรรมวิธี

คำสำคัญ: โรคผลเน่า, *Phomopsis spp.,* Methyl Jasmonate, Methyl Salicylate, ลองกอง

ABSTRACT

Fruit rot caused by *Phomopsis spp.* is the important disease of longkong and rambutan which is controlled by prochloraz and imazalil 0.05 % (v/v). However consumers are concerned with food safety, therefore Methyl Jasmonate (MJ) and Methyl Salicylate (MS) are used to reduce rot due to their induction of disease resistance. The researches were carried out at Post-harvest and Products Processing Research and Development Division from 2012 to 2015.The experiments were divided into 2 parts *in vitro* and *in vivo*. The *in vitro* experiment was consisted of 9 treatments with 4 replications including 0, 1.52, 15.24, 152.4 and 1524 µl/l MS, 2.24, 22.4, 224 and 2240 µl/l MJ. The result showed that every concentration of MS inhibited mycelium growth of *Phomopsis spp*. of longkong by 100% whereas every concentration of MJ did not inhibit it. The potent treatments to inhibit mycelium growth of *Phomopsis spp.* of rambutan by 100% were 152 and 1524 µl/l MS and 1.52 and 15.2 µl/l MS inhibited it by 68 and 79%, respectively whereas MJ treatments inhibited by 29-49%. The *in vivo* experiments were divided into 3 parts including pre-inoculation, post- inoculation and non-inoculation. Pre-inoculation experiment was consisted of 3 treatments including 0, 0.75 and 1.50 µl/l MS. The result showed that the potent treatment to control rot of longkong kept at 13 °C was 1.5 µl/l MS whereas 0.75 and 1.5 µl/l MS had potential to control rot at room temperature. The potent treatment to control rot of rambutan kept at 13 °C was 0.75 µl/l MS whereas 1.5 µl/l MS had potential to control rot at room temperature. Post-inoculation experiment was consisted of 5 treatments including 0, 0.75, 1.50 µl/l MS, 2 and 4 µl/l MJ. The potent treatments to control rot of longkong kept at 13 °C and room temperature were 0.75 µl/l MS, 2 and 4 µl/l MJ having lower

wounded diameter than control treatment. The potent treatments to control rot of rambutan kept at 13 °C and room temperature were 0.75 µl/l MS and 2 µl/l MJ, and 1.50 µl/l MS and 2 µl/l MJ, respectively. The disease percentage and quality of non-inoculation longkong experiment were not statistically different among treatments but MJ treatments had higher vitamin C content than control treatment. The 2 µl/l MJ showed the highest disease percentage in non-inoculation rambutan experiment and control treatment had the highest weight and firmness losses since MS and MJ treatments maintained integrity of cell membrane. Thus they reduced weight and firmness losses. The 2 and 4 µl/l MJ and 0.75 µl/l MS treatments had higher activity of β-1 ,3 glucanase than control since they induced disease resistance. The β-1 ,3 glucanase and chitinase activities of rambutan were not statistically different among treatments.

Key words: Fruit rot, *Phomopsis spp.,* Methyl Jasmonate, Methyl Salicylate, longkong

6. คำนำ

Phomopsis spp. เป็นเชื้อราที่มีการแพร่ระบาดอยู่ทั่วประเทศไทยโดยส่วนใหญ่แพร่ระบาดในบริเวณสวนผลไม้เนื่องจากมีสภาพอากาศร้อนชื้นเหมาะกับการเจริญของเชื้อก่อให้เกิดความเสียหายกับผลไม้หลายชนิด เช่น เงาะ ทุเรียน มังคุด ขนุน (Sangchote, 1987) และลองกอง (สมใจ 2548) โดยเชื้อสามารถเข้าสู่ผลตั้งแต่ระยะพัฒนาขนาดของผลและพักตัวจนผลแก่ เชื้อรา *Phomopsis* spp. เข้าทำลายผลไม้ทางบาดแผลหรือเข้าทำลายได้โดยตรงผ่านทาง style แล้วพัฒนาเพิ่มจำนวนสปอร์พักตัวอยู่จนผลเริ่มสุกจึงแสดงอาการ โดยเริ่มแรกจะเกิดแผลเป็นจุดกลมเล็กๆสีน้ำตาลดำและนิ่มจากนั้นจะเน่าลามตลอดทั้งผล โรคผลเน่าจากเชื้อ *Phomopsis* spp. ควบคุมได้ด้วยสารเคมี Prochloraz และ Imazaril ความเข้มข้น 0.05 % แต่ปัจจุบันผู้บริโภคได้คำนึงถึงความปลอดภัยด้านอาหารดังนั้นจึงนำ Methyl Jasmonate และ Methyl Salicylate มาใช้เพื่อควบคุมโรค Jasmonic acid และ Methyl Jasmonate เป็นสารระเหยธรรมชาติที่ลดการเน่าเสียในสตอร์เบอร์รี่ (Moline et al., 1997) กีวี่ (Wang and Buta 2003) มะละกอ (Gonzalery-Aguilar et al., 2004) และผลิตผลอื่นๆ (Tripathi and Dubey 2004) โดย Jasmonic acid และ Methyl Jasmonate เป็นสารที่มีกลิ่นหอมและไม่เป็นพิษกับสิ่งแวดล้อม Methyl Salicylate ซึ่งเป็นสารระเหยกลิ่นหอมที่ถูกผลิตออกมาเมื่อผล peach สุกสามารถควบคุมการเจริญของเชื้อราในหลอดทดลอง (Wilson et al., 1987) และควบคุมเชื้อราที่ปลูกบนผล peach, nectarine และ plum (Caccioni et al., 1995)

7. วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์ ที่ใช้ในการทดลอง

1. ผลไม้ (ลองกอง เงาะ)
2. จานเลี้ยงเชื้อ
3. เข็มเขี่ย
4. อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA)

5. สารเคมี Methyl Salicylate และ Methyl Jasmonate
6. ตู้เขี่ยเชื้อ
7. ตะกร้าพลาสติก ถุงพลาสติก ถุง active M1 ขนาด 18.5x29 เซ็นติเมตร หนังสือพิมพ์ และถังพลาสติก
8. หม้อนึ่งความดันไอ
9. แท่งแก้ว
10. Forsepts
11. ตะเกียงแอลกอฮอล์
12. ตู้เย็น
13. ฟิล์มยืด PVC, พาราฟิล์ม
14. กระดาษกรอง

วิธีการ

7.1 แยกเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่า

7.1.1 แยกเชื้อรา *Phomopsis* spp. จากผลลองกอง เงาะ ที่เป็นโรคผลเน่า โดยตัดบริเวณเป็นโรคที่ต่อกับเนื้อเยื่อปกติ ขนาด 0.5×0.5 เซนติเมตร นำไปแยกเชื้อด้วยวิธี tissue transplanting technique โดยแช่ชิ้นตัวอย่างในโซเดียมไฮโปคลอไรด์ความเข้มข้น 10% นาน 5 นาที ล้างด้วยน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง ซับให้แห้งด้วยกระดาษนึ่งฆ่าเชื้อ จากนั้นนำชิ้นตัวอย่างวางบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เก็บเชื้อในหลอดอาหารเอียง

7.1.2 พิสูจน์โรคตามวิธีของ Koch (Koch’s postulation) โดยเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร PDA นาน 7-10 วัน คว่ำชิ้นวุ้นบนผลปกติที่ทำแผลไว้ บ่มเชื้อในที่ชื้นนาน 24-48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจดูอาการโรคที่เกิดขึ้นและแยกเชื้อซ้ำอีกครั้งเพื่อพิสูจน์ว่าเป็นเชื้อชนิดเดียวกัน

7.2 การทดสอบประสิทธิภาพของ MS และ MJ ที่มีผลต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าในจานเลี้ยงเชื้อ (*in vitro*)

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) มี 9 กรรมวิธี 4 ซ้ำ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan’s Multiple Range Test (DMRT)

กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุม (น้ำ)
กรรมวิธีที่ 2 1.52 µl/l MS
กรรมวิธีที่ 3 15.24 µl/l MS
กรรมวิธีที่ 4 152.4 µl/l MS
กรรมวิธีที่ 5 1524 µl/l MS
กรรมวิธีที่ 6 2.4 µl/l MJ
กรรมวิธีที่ 7 22.4 µl/l MJ
กรรมวิธีที่ 8 224 µl/l MJ
กรรมวิธีที่ 9 2240 µl/l MJ

เตรียมอาหาร PDA เทลงในจานเลี้ยงเชื้อรอจนอาหารแข็ง วางเชื้อสาเหตุโรคเน่า *Phomopsis* spp. ของลองกองและเงาะตรงกลางจานเลี้ยงเชื้อ โดยนำชิ้นวุ้นที่ได้จากการใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะเส้นใยรอบโคโลนีเชื้อราที่มีอายุ 7 วัน วางบนผิวหน้าอาหาร หยดสาร MS และ MJ ความเข้มข้นต่างๆ ข้างต้น ลงบนกระดาษกรองที่ติดเทปไว้บนฝาจานเลี้ยงเชื้อ ปิดฝา และพันด้วยพาราฟิล์ม รมสารนาน 18 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเอากระดาษกรองออก บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ตรวจผลเมื่อเชื้อราในชุดควบคุมเจริญเต็มจานเลี้ยงเชื้อ โดยการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา นำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใย โดยใช้สูตรดังต่อไปนี้

เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใย = $[(A-B)/A] \times 100$

เมื่อ A คือ ค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราที่เจริญบนอาหาร PDA ชุดควบคุม

เมื่อ B คือ ค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราที่เจริญบนอาหาร PDA ชุดที่รมสาร

7.3 การทดสอบประสิทธิภาพของ MJ และ MS ในการยับยั้งการเกิดโรคผลเน่าของลองกองและเงาะ (*in vivo*)

7.3.1 การทดสอบประสิทธิภาพของ MS และ MJ ในการยับยั้งการเกิดโรคผลเน่าบนผลที่มีการปลูกเชื้อ

7.3.1.1 ปลูกเชื้อรา *Phomopsis* spp. ก่อนรมสาร MS (Pre-inoculation)

ก.ลองกอง วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCB) ทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง โดยให้จำนวนครั้งของการทดลองเป็น Block ประกอบด้วย 3 กรรมวิธี 5 ซ้ำๆ ละ 1 ช่อ

กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุม (น้ำ)

กรรมวิธีที่ 2 0.75 µl/l MS

กรรมวิธีที่ 3 1.50 µl/l MS

คัดเลือกลองกองที่มีความสม่ำเสมอทั้งขนาดและสี ปราศจากโรคและรอยตำหนิ ใน 1 ช่อมีประมาณ 35-40 ผล ฉีดพ่นด้วยแอลกอฮอล์ 70% จนทั่วทั้งช่อ ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ทำแผลลองกองโดยใช้เข็มปลายแหลมที่ผ่านการฆ่าเชื้อแทงลงบนผลลองกองลึก 1 มม. ผลละ 1 แผล 1 ช่อทำแผล 15 ผล แล้ววางชิ้นวุ้นที่มีเชื้อ *Phomopsis* spp. stain 1 และ stain 2 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มม.ลงบนแผล เรียงลองกองใส่ตะกร้าหุ้มถุงพลาสติกที่พ่นด้วยน้ำกลั่น เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเอาชิ้นวุ้นออก ใส่ลองกองลงในกล่องพลาสติกขนาด 32 ลิตร หยดสาร MS ความเข้มข้นต่างๆ ลงบนกระดาษกรองที่ฝาของกล่อง ปิดฝาและพันด้วยพาราฟิล์ม รมไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 6 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเปิดฝาและเอาลองกองออกจากกล่อง ปล่อยทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง ใส่ลองกองแต่ละช่อ

ก. ในถาดโฟมหุ้มด้วยพลาสติก PVC แล้วเก็บไว้ที่ 13 °C ความชื้นสัมพัทธ์ 90-95% ตรวจวัดเส้นผ่าศูนย์กลางแผลและเช็คเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค โดยนับจำนวนผลที่เป็นโรค/จำนวนผลทั้งหมด ตรวจเช็ควันที่ 10 และ 13 หลังเก็บรักษา

ข. ในตะกร้าพลาสติกเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องวัดเส้นผ่าศูนย์กลางแผลและเช็คเปอร์เซ็นต์การเกิดโรควันที่ 3 หลังเก็บรักษา

ข.เงาะ วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCB) ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง โดยให้จำนวนครั้งของการทดลองเป็น Block ประกอบด้วย 3 กรรมวิธี 10 ซ้ำๆละ 10 ผล

กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุม (น้ำ)

กรรมวิธีที่ 2 0.75 µl/l MS

กรรมวิธีที่ 3 1.50 µl/l MS

คัดเลือกเงาะระยะ 3 สีที่มีความสม่ำเสมอทั้งสีและขนาด 1 กก.มีประมาณ 26-28 ผล ปราศจากโรคและรอยตำหนิ ฉีดพ่นด้วยแอลกอฮอล์ 70% จนทั่วทั้งผล ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ทำแผลเงาะโดยใช้มีดที่ผ่านการฆ่าเชื้อตัดขน 1 เส้น แล้ววางชิ้นวุ้นที่มีเชื้อ *Phomopsis* spp. อายุ 7 วันมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มม. ลงบนแผล เรียงเงาะใส่ตะกร้าหุ้มถุงพลาสติกที่พ่นด้วยน้ำกลั่น เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเอาชิ้นวุ้นออก ใส่เงาะลงในกล่องพลาสติกขนาด 32 ลิตร หยดสาร MS ความเข้มข้นต่างๆ ลงบนกระดาษกรองที่ฝาของกล่อง ปิดฝาและพันด้วยพาราฟิล์ม รมไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 6 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเปิดฝาและเอาเงาะออกจากกล่อง ปล่อยทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง บรรจุเงาะ 10 ผลในถุง active M1ขนาด 18.5x29 เซ็นติเมตร แล้วเก็บไว้ที่

ก.13 °C ความชื้นสัมพัทธ์ 90-95% วัดเส้นผ่าศูนย์กลางแผลและเช็คเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค โดยนับจำนวนผลที่เป็นโรค/จำนวนผลทั้งหมด ตรวจเช็ควันที่ 9 หลังเก็บรักษา

ข.ที่อุณหภูมิห้องวัดเส้นผ่าศูนย์กลางแผลและเช็คเปอร์เซ็นต์การเกิดโรควันที่ 3 หลังเก็บรักษา

7.3.1.2 ปลูกเชื้อรา *Phomopsis* spp. หลังรมสาร MS และ MJ (Post-inoculation)

ก.ลองกอง วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCB) ทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง โดยให้จำนวนครั้งของการทดลองเป็น Block ประกอบด้วย 4 กรรมวิธี 5 ซ้ำๆ ละ 1 ช่อ

กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุม (น้ำ)

กรรมวิธีที่ 2 0.75 µl/l MS

กรรมวิธีที่ 3 1.50 µl/l MS

กรรมวิธีที่ 4 2.00 µl/l MJ

กรรมวิธีที่ 5 4.00 µl/l MJ

ดำเนินการเหมือน 7.3.1.1 แต่ปลูกเชื้อหลังรมสาร โดยรมสารนาน 18 ชั่วโมง

<u>หมายเหตุ</u> ช่วงแรกดำเนินการทดลองตามจานเลี้ยงเชื้อแต่เนื่องจาก MS และ MJเกิดความเป็นพิษกับผลลองกอง จึงปรับลดความเข้มข้นลงจนเหลือ 5 กรรมวิธีดังกล่าว

ข.เงาะ วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCB) ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง โดยให้จำนวนครั้งของการทดลองเป็น Block ประกอบด้วย 5 กรรมวิธี 10 ซ้ำๆละ 10 ผล

กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุม (น้ำ)

กรรมวิธีที่ 2 0.75 µl/l MS

กรรมวิธีที่ 3 1.50 µl/l MS

กรรมวิธีที่ 4 2.00 µl/l MJ

กรรมวิธีที่ 5 4.00 µl/l MJ

ดำเนินการเหมือน 7.3.1.1 แต่ปลูกเชื้อหลังรมสาร โดยรมสารนาน 18 ชั่วโมง

7.3.2 การทดสอบประสิทธิภาพของ MJ และ MS ในการยับยั้งการเกิดโรคผลเน่าบนผลที่มีการติดเชื้อตามธรรมชาติ (ไม่ปลูกเชื้อ)

วางแผนการทดลองแบบ CRD ประกอบด้วย 5 กรรมวิธี 5 ซ้ำๆละ 1 ช่อ

ก.ลองกอง กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุม (น้ำ)

กรรมวิธีที่ 2 0.75 µl/l MS

กรรมวิธีที่ 3 1.50 µl/l MS

กรรมวิธีที่ 4 4.00 µl/l MS

กรรมวิธีที่ 5 5.00 µl/l MJ

ดำเนินการเหมือน7.3.1.1 แต่ไม่ปลูกเชื้อ

ข.เงาะ วางแผนการทดลองแบบ CRD ประกอบด้วย 5 กรรมวิธี 10 ซ้ำๆละ 10 ผล

กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุม (น้ำ)

กรรมวิธีที่ 2 0.75 µl/l MS

กรรมวิธีที่ 3 1.50 µl/l MS

กรรมวิธีที่ 4 4.00 µl/l MS

กรรมวิธีที่ 5 5.00 µl/l MJ

ดำเนินการเหมือน 7.3.1.1 แต่ไม่ปลูกเชื้อ

7.4 วัดกิจกรรมของเอนไซม์ β-1 ,3 glucanase ทำการทดลองตาม 7.3.1.2 โดยไม่ปลูกเชื้อ เมื่อ 7 10 และ 13 วันเก็บเปลือกลองกองแช่ตู้-80 °C เพื่อทำการทดลองเอนไซม์ต่อไป สำหรับเงาะเก็บตัวอย่างเมื่อ 5 7 และ 9 วัน การสกัดโปรตีนจากพืชและวัดกิจกรรมของเอนไซม์ β-1 ,3 glucanase ดัดแปลงจากปุญญิศาและคณะ (2558) โดยชั่ง นน.ตัวอย่าง 10 กรัม เติม 50 mM sodium acetate buffer pH 5 ปริมาตร 30 มล.ลงในเครื่องปั่น บดตัวอย่างด้วยเครื่องปั่นนาน 2 นาทีต่อตัวอย่างแล้วบดต่อด้วยเครื่อง Polytron นาน 5 นาทีต่อ 1 ตัวอย่าง เทตัวอย่างใส่หลอดเซนติฟิวส์นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4 °C ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง Orto alresa รุ่น Digicen 20-R ความเร็วรอบ 6000 rpm เป็นเวลา 30 นาทีดูดส่วนใสไปเก็บไว้ที่ -20°Cจนกว่าจะนำมาใช้ในการทดลองต่อไป

การวัดปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์ β-1 ,3 glucanase นำ supernatant (ส่วนใส) 100 µl ผสมรวมกับ substrate 100 µl (laminain 2 mg/ml ใน 0.1M sodium acetate buffer pH5) บ่มปฏิกิริยาที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมงหยุดปฏิกิริยาด้วยการนำไปต้มในน้ำเดือด 100°C นาน 15 นาที เติม DNS solutionและ0.1M sodium acetate buffer ชนิดละ 200 µlต้มนาน 5 นาทีปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้องเติมน้ำกลั่น 2.7 มล. ตรวจวัดการดูดกลืนแสงที่ 540 nm ด้วยเครื่อง Spectophotometer ยี่ห้อ CECIL รุ่น CE 2021 การวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกย่อยจาก laminarin โดยใช้น้ำตาล D-glucose เป็นน้ำตาลรีดิวซ์มาตรฐาน กิจกรรมของเอนไซม์ประเมินจาก D-glucoseที่ถูกย่อยออกจาก laminain คิดเป็น µmol ต่อปริมาณโปรตีน 1 mg ในเวลา 1 ชั่งโมง

7.5 วัดกิจกรรมของเอนไซม์ chitinase การสกัดโปรตีนจากพืชทำเหมือน 7.4

การวัดปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์ chitinase ดัดแปลงจากวิธีของบุญญิศา และคณะ (2558) นำsupernatant (ส่วนใส) 1000 µl ผสมร่วมกับ substrate 1000 µl (1% swollen chitin buffer pH5) บ่มปฏิกิริยาที่ 37°C

นาน 1 ชั่วโมงหยุดปฏิกิริยาด้วยการนำไปต้มในน้ำเดือด 100°C 15 นาที ปล่อยให้เย็นดูดสารละลาย product 500 µl และเติม 0.8M $K_2B_4O_7$ 100 µl ต้มนาน 3 นาทีปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้องเติม DMAB 3 มล.บ่มที่ 37°C นาน 20 นาที ตรวจวัดการดูดกลืนแสงที่ 585 nm ด้วยเครื่อง Spectophotometer ยี่ห้อ CECIL รุ่น CE 2021 ภายใน 10 นาที การวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกย่อยจาก chitin โดยใช้ GlcNac เป็นน้ำตาลรีดิวซ์มาตรฐาน กิจกรรมของเอนไซม์ประเมินจาก GlcNac ที่ถูกย่อยออกจาก colloidal chitin คิดเป็น µmol ต่อปริมาณโปรตีน 1 mg ในเวลา 1 ชั่งโมง

ระยะเวลา 1 ตุลาคม 2555 - 30 กันยายน 2558

สถานที่ดำเนินการ สำนักวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

8.1 แยกเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่า

ลักษณะโคโลนีของเชื้อราบนอาหารพีดีเอ เส้นใยหยาบสีขาวถึงขาวเทา เชื้อราสร้างฟรุตติ้งบอดี้แบบพิคนิเดีย ผนังหนาสีน้ำตาลถึงดำ รูปร่างกลม ภายในพิคนิเดียสร้างโคนิดิโอฟอร์สีอ่อน รูปร่างเรียวยาวใสไม่มีสี ส่วนปลายโคนิดิโอฟอร์จะมีการแตกแขนงเป็นไฟอะลายด์ โคนิเดียมี 2 แบบ แบบอัลฟามีเซลล์เดียว ไม่มีสีรูปไข่หรือกระสวย แบบเบต้ามีเซลล์เดียว ไม่มีสีรูปร่างเรียวยาว ส่วนปลายโค้งงอคล้ายตะขอ (Figure 1 และ 2)

8.2 การทดสอบประสิทธิภาพของ MS และ MJ ที่มีผลต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าในจานเลี้ยงเชื้อ (*in vitro*)

กรรมวิธีที่มีศักยภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อจากลองกองคือ กรรมวิธีที่รมด้วย MS ทุกความเข้มข้นยับยั้งเชื้อได้ 100% ส่วน MJ ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยได้ แม้ความเข้มข้นจะสูง 2243 µl/l (Table 1 และ Figure 3) ส่วนกรรมวิธีที่มีศักยภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อจากเงาะได้แก่ กรรมวิธีที่รมด้วย MS ที่ความเข้มข้น MJ 152 และ 1524 µl/l ยับยั้ง ได้ 100% ที่ความเข้มข้น 1.52 และ15.2 µl/l ยับยั้งได้ 68 และ 79% ส่วน MJ ยับยั้งได้ 29-49% (Table 1 และ Figure 4)

8.3 การทดสอบประสิทธิภาพของ MS และ MJ ในการยับยั้งการเกิดโรคผลเน่าบนผล

8.3.1 การทดสอบประสิทธิภาพของ MS และ MJ ในการยับยั้งการเกิดโรคผลเน่าบนผลที่มีการปลูกเชื้อ

8.3.1.1 ปลูกเชื้อรา *Phomopsis* spp. ก่อนรมสาร MS (Pre-inoculation)

ผลการทดลองของลองกอง

ก. การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 13 °C พบว่า เมื่อวันที่ 10 หลังการเก็บรักษา กรรมวิธีที่รมด้วย MS ความเข้มข้น 1.5 µl/l มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคของ stain 1 ต่ำกว่ากรรมวิธีควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 18.73% ขณะที่กรรมวิธีควบคุมมีการเกิดโรค 41.94% (Table 2 และ Figure 5) สอดคล้องกับการทดลองในจานเลี้ยงเชื้อ เพราะMSสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้โดยตรงแต่เส้นผ่าศูนย์กลางแผลไม่มีความแตกต่างทางสถิติระหว่างกรรมวิธี วันที่ 13 ของการเก็บรักษาเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคและเส้นผ่านศูนย์กลางแผลไม่มีความแตกต่างทางสถิติระหว่างกรรมวิธี ส่วน stain 2 กรรมวิธีที่รมด้วย MS ความเข้มข้น 0.75

µl/l มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคและเส้นผ่าศูนย์กลางแผลต่ำกว่ากรรมวิธีควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เนื่องจาก stain 2 มีความรุนแรงของการเกิดโรคต่ำกว่า stain 1 วันที่ 13 ของการเก็บรักษา กรรมวิธีที่รมด้วย MS ความเข้มข้น 0.75 µl/l มีเส้นผ่าศูนย์กลางแผลและเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 13.34 มม.และ 22.45% ขณะที่กรรมวิธีควบคุม มีเส้นผ่าศูนย์กลางแผลและเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 30.42 มม.และ 59.76% (Table 3 และ Figure 6)

ข. การเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง พบว่า กรรมวิธีที่รมด้วย MS ความเข้มข้น 0.75 และ 1.50 µl/l ทำให้มีเส้นผ่าศูนย์กลางแผลของ stain 1 ต่ำกว่ากรรมวิธีควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคไม่มีความแตกต่างระหว่างกรรมวิธี ส่วน stain 2 ทั้งเส้นผ่าศูนย์กลางแผลและเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคไม่มีความแตกต่างทางสถิติระหว่างกรรมวิธี (Table 4)

ผลการทดลองของเงาะ

ก. การเก็บรักษาที่ 13 °C พบว่า การรมเงาะด้วย MS ความเข้มข้น 0.75 µl/l ทำให้มีเส้นผ่าศูนย์กลางแผลต่ำกว่ากรรมวิธีควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีเส้นผ่าศูนย์กลางแผลเท่ากับ 22.19 มม. ขณะที่กรรมวิธีควบคุมมีเส้นผ่านศูนย์กลางแผลเท่ากับ 81.04 มม. (Table 5 และ Figure 7)

ข. การเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง พบว่ากรรมวิธีที่มีศักยภาพคือ การรมด้วย MS ความเข้มข้น 1.50 µl/l มีเส้นผ่าศูนย์กลางแผลต่ำกว่ากรรมวิธีควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีเส้นผ่าศูนย์กลางแผลเท่ากับ 36.84 มม. ขณะที่กรรมวิธีควบคุมมีเส้นผ่าศูนย์กลางของแผลเท่ากับ 44.60 มม. (Table 6)

8.3.1.2. ปลูกเชื้อรา *Phomopsis* spp. หลังรมสาร MS และ MJ (Post-inoculation)

ผลการทดลองของลองกอง

ก. การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 13 °C พบว่ากรรมวิธีที่รมด้วย MS ความเข้มข้น 0.75 µl/l และ MJ ความเข้มข้น 2 และ 4 µl/l ทำให้ลองกองมีเส้นผ่าศูนย์กลางแผลและเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคของ stain 1 ต่ำกว่ากรรมวิธีควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติหลังเก็บรักษา 13 วัน โดยกรรมวิธีที่รมด้วย MS ความเข้มข้น 0.75 µl/l มีเส้นผ่าศูนย์กลางแผลเท่ากับ 22.68 มม. และมีเปอร์เซ็นการเกิดโรคเท่ากับ 58.74% ส่วน MJ ที่ความเข้มข้น 2 และ 4 µl/l มีเส้นผ่าศูนย์กลางแผล 22.54 และ 26.51 มม. เปอร์เซ็นการเกิดโรค 55.79 และ 62.52% ตามลำดับ ขณะที่กรรมวิธีควบคุมมีเส้นผ่าศูนย์กลางแผลเท่ากับ 34.28 มม.และเปอร์เซ็นการเกิดโรคเท่ากับ 71.89% (Table 7 และ Figure 8) ส่วน stain 2 กรรมวิธีที่รมด้วย MS ความเข้มข้น 0.75 µl/l และ MJ ความเข้มข้น 4 µl/l ทำให้ลองกองมีเส้นผ่าศูนย์กลางแผลและเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคต่ำกว่ากรรมวิธีควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทั้ง 3 ช่วงเวลาของการเก็บรักษา (Table 8 และ Figure 9) เพราะstain 2 มีระดับความรุนแรงของการเกิดโรคต่ำกว่า stain 1 ดังนั้นจึงเห็นประสิทธิภาพของการ MS และ MJ ชัดเจน กรรมวิธีที่รมด้วย MS สามารถลดเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคของการทดลองนี้ สอดคล้องกับการรายงานของ Aghdam *et al*. (2011) และ Sheng (2011) Aghdam *et al*. (2011) และ Sheng (2011) พบว่าการรมกีวีพันธุ์ Hay ward ด้วย MS ความเข้มข้น 32 µl/l นาน 16 ชั่วโมงที่ 20°C ช่วยลดการเน่าเสีย การผลิตเอทิลีน การสูญเสียน้ำหนัก ความแน่นเนื้อ ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้และวิตามินซี นอกจากนี้ยังลดกิจกรรมของเอนไซม์ ascorbate peroxidase และ catalase ซึ่งส่งผลให้เพิ่มระดับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ในเซลล์ โดย H_2O_2 เป็น second messenger ในการกระตุ้นให้มีการ

แสดงออกของยีนที่เกี่ยวกับการป้องกันตัวเอง กลไกการทำงานของ MS ได้แก่ 1) กระตุ้นให้ผลิตผลแสดงอาการ hypersensitive โดยทำให้เนื้อเยื่อแห้งซึ่งเป็นการจำกัดอาหารดังนั้นทำให้โรคเจริญต่อไปไม่ได้ 2) สร้างระบบภูมิคุ้มกันตัวเองจากโรค (systemic acquired resistance) ผ่านการยับยั้งการสร้างเอนไซม์ catalase และ ascorbate peroxidase นอกจากนี้ MS ยังชักนำให้สร้าง pathogen related protein, เอนไซม์ phenylalanine ammonia-lyase, chitinase, β-1,3 glucanaseและperoxidase 3) ช่วยลดอาการสะท้านหนาวในทับทิม (Sayyari *et al*. 2011) และมะเขือเทศ cherry (Sheng 2011) โดยกระตุ้นให้มีการสะสมของ spermine และ spermidine ซึ่งมีบทบาทในการรักษาเยื่อหุ้มเซลล์ให้แข็งแรง สามารถควบคุมการเข้าออกของสารได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นจึงทำให้ผลิตผลมีความแน่นเนื้อและทนทานต่อการเข้าทำลายของโรค

กรรมวิธีที่รมด้วย MJ ลดระดับความรุนแรงและเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคของการทดลองนี้สอดคล้องกับการลดการเกิดโรคใน sweet cherry (Yao and Tian, 2005) loquat (Yao and Tian, 2005) peach (Yao and Tian, 2005) กีวี ตัดแต่งพร้อมบริโภค (Yao and Tian, 2005) มะละกอ (Gonzaley-Aguilar *et al*, 2003) คื่นไช่และพริกหวานตัดแต่งพร้อมบริโภค (Buta and Moline,1998) Chinese bayberry (Wang *et al*, 2009) และ grapefruit (Droby *et al*, 1999) Wang *et al*. (2009) รายงานว่าการรม Chinese bayberry ด้วย MJ ที่ความเข้มข้น 10 μmol/l นาน 6 ชั่วโมงที่ 20°C และเก็บรักษาที่ 0°C นาน 12 วัน พบว่า MJ ช่วยลดการเน่าเสีย เพิ่มคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระและเพิ่มสารประกอบฟีนอล ฟลาโอนอยด์และแอนโธไซยานินและมีกิจกรรมของเอนไซม์ Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) เพิ่มขึ้น Gonzaley-Aguilar *et al*. (2003) พบว่า การรมมะละกอด้วย MJ ความเข้มข้น 10^{-5} หรือ 10^{-6} M นาน 16 ชั่วโมงที่ 20°C สามารถลดการเน่าเสียชะลอการสูญเสียความแน่นเนื้อ ลดอาการสะท้านหนาว นอกจากนี้ MJ ยังเพิ่มปริมาณกรดอินทรีย์ Yao and Tian (2005) รายงานว่าการใช้ Salicylic acid (SA) ที่ความเข้มข้น 2 mM และ MJ ความเข้มข้น 0.2 mM ก่อนและหลังเก็บเกี่ยว Sweet cherry สามารถลดการเน่าเสียได้ โดยการใช้ก่อนเก็บเกี่ยวมีประสิทธิภาพมากกว่าการใช้หลังเก็บเกี่ยว SA และ MJ ชักนำให้มีกิจกรรมของเอนไซม์ β-1,3 glucanase, phenylalanine ammonia-lyase และ Peroxidase (POD) กลไกการทำงานของ MJ คือ1) ชักนำให้ผลิตผลสร้างสารต้านทานตามธรรมชาติ เช่น Plant Pathogen Related Protein, Phytoalexin และชักนำให้มีการสร้างเอนไซม์ Phenylalamine ammonia lyase, Polyphenol oxidase, Peroxidase, Chitinase, β-1,3 glucanase 2) ชักนำให้ผลิตผลทนต่อสภาพห้องเก็บที่หนาวเย็นและป้องกันการเกิดการสะท้านหนาวโดยการสร้าง Heat Shock Protein ดังนั้นจึงทำให้เยื่อหุ้มเซลล์แข็งแรงทนทานต่อความหนาวเย็นและการเข้าทำลายของโรคพืช การที่ MS และ MJ ลดเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคของลองกองในครั้งนี้อาจจะเป็นเพราะ 1) รักษาเยื่อหุ้มเซลล์และความแน่นเนื้อของลองกอง ทำให้ลองกองทนทานต่อการเข้าทำลายของโรค 2) ชักนำให้ลองกองสร้างสารต้านทานทางธรรมชาติ

ข. การเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องพบว่ากรรมวิธีที่รมด้วย MS ความเข้มข้น 0.75 μl/l และ MJ ความเข้มข้น 2 และ 4 μl/l ทำให้เส้นผ่าศูนย์กลางแผลและเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคของ stain 1 และ 2 ต่ำกว่ากรรมวิธีควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Table 9) สอดคล้องกับการเก็บรักษาที่ 13 °C

ผลการทดลองของเงาะ

ก. การเก็บรักษาที่ 13 องศาเซลเซียส พบว่า กรรมวิธีที่มีศักยภาพ คือการรมด้วย MS ความเข้มข้น 0.75 µl/l และ MJ ความเข้มข้น 2 µl/l ทำให้มีเส้นผ่าศูนย์กลางแผลต่ำกว่ากรรมวิธีควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยมีเส้นผ่าศูนย์กลางแผลเท่ากับ 27.04 และ 20.48 มม. ขณะที่กรรมวิธีควบคุมมีเส้นผ่าศูนย์กลางแผลเท่ากับ 47.32 มม. (Table 10 และ Figure 10)

ข. การเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง พบว่ากรรมวิธีรมด้วย MS ความเข้มข้น 1.50 µl/l และ MJ ความเข้มข้น 2 µl/l ทำให้มีเส้นผ่าศูนย์กลางแผลต่ำกว่ากรรมวิธีควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยมีเส้นผ่าศูนย์กลางแผลเท่ากับ 31.73 และ 31.14 มม. ขณะที่กรรมวิธีควบคุมมีเส้นผ่าศูนย์กลางแผลเท่ากับ 41.70 มม. (Table 11)

8.3.2. การทดสอบประสิทธิภาพของ MS และ MJ ในการยับยั้งการเกิดโรคผลเน่าบนผลที่มีการติดเชื้อตามธรรมชาติ

ผลการทดลองของลองกอง

พบว่าเปอร์เซนต์การเกิดโรคไม่แตกต่างทางสถิติระหว่างกรรมวิธี เปอร์เซนต์การสูญเสียน้ำ TSS TA ความแน่นเนื้อ ค่าความสว่าง สีแดง สีเหลือง ไม่มีความแตกต่างทางสถิติระหว่างกรรมวิธี แสดงว่าการรมด้วย MS และ MJ ไม่มีผลต่อคุณภาพของลองกอง นอกจากนี้การรมด้วย MS และ MJ ทำให้ลองกองมีวิตามินซีสูงกว่ากรรมวิธีควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Table 12)

ผลการทดลองของเงาะ

พบว่า เปอร์เซนต์การเกิดโรคของกรรมวิธีที่รมด้วย MJ ความเข้มข้น 2 µl/l มีเปอร์เซนต์การเกิดโรคสูงกว่ากรรมวิธีอื่น เพราะเงาะมีโรคมากทำให้ MJ ไม่สามารถควบคุมโรคได้ กรรมวิธีควบคุมมีค่า TSS และวิตามินซีสูงกว่ากรรมวิธีอื่น แต่มีเปอร์เซนต์การสูญเสียน้ำและความแน่นเนื้อสูงกว่ากรรมวิธีอื่น แสดงว่ากรรมวิธีที่รมด้วย MS และ MJ สามารถรักษาเยื่อหุ้มเซลล์ให้แข็งแรงได้จึงชะลอการสูญเสียน้ำและความแน่นเนื้อ นอกจากนี้กรรมวิธีที่รมด้วย MJ 4 µl/l ช่วยชะลอการเปลี่ยนแปลงสี โดยมีค่าความสว่างและค่าสีเหลืองสูงกว่าแต่ค่าสีแดงต่ำกว่ากรรมวิธีอื่น (Table 13)

8.4 กิจกรรมของเอนไซม์ β -1,3 glucanase

การทดลองกับลองกอง พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเมื่ออายุการเก็บรักษานานขึ้น โดยวันที่ 7 ของการเก็บรักษาไม่มีความแตกต่างทางสถิติระหว่างกรรมวิธี เมื่อวันที่ 10 ของการเก็บรักษา พบว่า MJ ความเข้มข้น 2 และ 4 µl/l และ MS ความเข้มข้น 0.75 µl/l มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่ากรรมวิธีควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงว่า MS และ MJ สามารถชักนำให้มีการสร้างเอนไซม์ β - 1,3 glucanase ดังนั้นกรรมวิธีเหล่านี้จึงมีเปอร์เซ็นการเกิดโรค และเส้นผ่าศูนย์กลางแผลต่ำกว่ากรรมวิธีควบคุม ในวันที่ 13 ของการเก็บรักษา MS ความเข้มข้น 1.5 µl/l มีกิจกรรมสูงสุด (Table 14)

การทดลองกับเงาะ พบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติทั้ง 3 วันของการเก็บรักษา (Table 15)

8.5 กิจกรรมของเอนไซม์ chitinase

การทดลองกับลองกอง ไม่ได้ทดลอง เนื่องจากตัวอย่างเสียหาย

การทดลองกับเงาะ พบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติทั้ง 3 วันของการเก็บรักษา (Table 16)

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

1. การทดลองที่ทำการปลูกเชื้อก่อนรมแล้วเก็บไว้ที่ 13 องศาเซลเซียส สำหรับลองกอง พบว่ากรรมวิธีที่มีศักยภาพสำหรับควบคุม Phomopsis stain 1 คือ MS ความเข้มข้น 1.50 µl/l และ stain 2 คือความเข้มข้น 0.75 µl/l ส่วนลองกองที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องพบว่ากรรมวิธีที่มีศักยภาพ stain 1 คือ MS ความเข้มข้น 0.75 และ 1.50 µl/l ส่วน stain 2 ไม่แตกต่างทางสถิติ

2. การทดลองที่ปลูกเชื้อก่อนรมแล้วเก็บที่ 13 องศาเซลเซียส สำหรับเงาะพบว่า กรรมวิธีที่มีศักยภาพคือ MS ความเข้มข้น 0.75 µl/l แต่ที่อุณหภูมิห้องคือกรรมวิธีที่รมด้วย MS ความเข้มข้น 1.50 µl/l แสดงว่าที่อุณหภูมิต่ำใช้ MS ความเข้มข้นต่ำก็สามารถควบคุมโรคได้แล้วและควบคุมโรคได้ดีกว่าที่อุณหภูมิสูง

3. การทดลองที่ปลูกเชื้อหลังรมแล้วเก็บรักษาที่ 13 องศาเซลเซียสและที่อุณหภูมิห้อง สำหรับลองกอง พบว่ากรรมวิธีมีศักยภาพในการควบคุมโรคได้แก่ กรรมวิธีที่รมด้วย MS ความเข้มข้น 0.75 µl/lและ MJ ความเข้มข้น 2 และ 4 µl/l

4. การทดลองที่ปลูกเชื้อหลังรมและเก็บรักษาที่ 13 องศาเซลเซียส สำหรับเงาะพบว่า กรรมวิธีที่มีศักยภาพคือ MS ความเข้มข้น 0.75 µl/l และ MJ ความเข้มข้น 2 µl/l เป็นไปทำนองเดียวกับลองกอง ส่วนเงาะที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง พบว่า MS ความเข้มข้น1.5 µl/lและ MJ ความเข้มข้น 2 µl/l มีศักยภาพในการควบคุมโรค

5. การรมลองกองด้วย MS และ MJ โดยไม่ได้ปลูกเชื้อ (เชื้อตามธรรมชาติ) พบว่า เปอร์เซนต์การเกิดโรคไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ระหว่างกรรมวิธีเพราะโรคอาจมีไม่มาก ดังนั้น จึงเห็นประสิทธิภาพของ MS และMJ ไม่ชัดเจน ส่วนคุณภาพตัวอื่นๆ ส่วนมากไม่แตกต่างทางสถิติ แต่การรมด้วย MS และMJ ทำให้ลองกองมีวิตามินซีสูงกว่ากรรมวิธีควบคุม

6. การรมเงาะด้วย MS และ MJ โดยไม่ได้ปลูกเชื้อ พบว่าการรมด้วย MJ ความเข้มข้น 2 µl/l มีเปอร์เซนต์การเกิดโรคมากที่สุด เพราะเงาะมีโรคมากทำให้ MJ ไม่สามารถควบคุมโรคได้ส่วนค่าคุณภาพค่อนข้างแปรผัน กรรมวิธีควบคุมมีการสูญเสียน้ำและความแน่นเนื้อสูงสุด

7. กิจกรรมของเอนไซม์ β -1,3 glucanase ในลองกอง พบว่า เมื่อวันที่ 10 ของการเก็บรักษา พบว่า MJ ความเข้มข้น 2 และ 4 µl/l และMS ความเข้มข้น 0.75 µl/l มีกิจกรรมขงเอนไซม์สูงกว่ากรรมวิธีควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

8. กิจกรรมของเอนไซม์ β -1,3 glucanase ในเงาะ พบว่า ไม่มีความแตกต่างทางสถิติระหว่างกรรมวิธี

9. กิจกรรมของเอนไซม์ chitinase ในเงาะ พบว่า ไม่มีความแตกต่างทางสถิติระหว่างกรรมวิธี

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

สามารถแนะนำให้เกษตรกร/ผู้ประกอบการนำไปใช้ได้

11. คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ นางสาววิไล เนียมพิบูลย์ นางสาวปิยะลักษณ์ อยู่สบาย และนางสาวนุจรี เพลา ที่ช่วยปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการและเตรียมต้นฉบับนี้

12. เอกสารอ้างอิง

ปุญญิศา ชารีรักษ์ วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์ วรรณดี บัญญัติรัชต. 2558. กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลาย chitinase

และ β - 1,3 glucanase ในใบมะเขือเทศที่ชักนำโดยเชื้อรา *Trichoderma spp*.gsbooks.gs. kku.ac.th/51/gradresearch10/file/BMO11.pdf 08/02/2015

Aghdam, M.S., A. Motallebiagar, Y. Mostofi, J.F. Moghaddam and M. Ghasemneghad. 2011. Methyl salicylate affects the quality of hayward kiwifruits during storge at low temperature. J. Agri. Sei3 (2): 149-156.

Buta, J.G. and H.E. Moline. 1998. Methyl jasmonate extends shelf life and reduces microbial contamination of fresh-cut celery and peppers. J. Agric. Food Chem. 46: 1253-1256

Caccioni, D.R.L., G. Tonini and M. Guizzardi. 1995. Antifungal activity of stone fruit aroma compounds against *Monilinia laxa* (Aderh. Et Ruhl.) honey and *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.): *In vivo* trials. J. Plant. Dis.Prot.102: 518-525

Cao, S., Y. Zheng, Z. Yang, S. Tang, P. Jin, K. Wang and X. Wang. 2008. Effect of methyl jasmonate on the inhibition of *Colletotrichum acutatum* infection in loquat fruit and the possible mechanisms. Postharvest Biol. Tech. 49: 301-307.

Droby, S., R. Porat, L. Cohen, B. Weiss, B. Shapiro, S. Philosoph-Hadas and S. Meir. 1999. Suppressing green mold decay in grapefruit with postharvest jasmonate application. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 124 (2): 184-188.

Gonzalez-Aguilar, G.A., J.G. Buta and C.Y. Wang. 2003. Methyl jasmonate and modified atmosphere packaging (MAP) reduce decay and maintain postharvest quality of papaya 'Sunrise'. Postharvest Biol. Tech. 25: 361-370.

Moline, H.E., J.G. Buta, R.A. Saftner and J.C. Maas. 1997. Comparison of three volatile natural products for the reduction of postharvest diseases in strawberries. Adv. Strawberry Res. 16: 43-48

Sangchote, 1987. Postharvest disease of mango fruits and lossed. Kasetsart (Natural Sci.) 21: 81-85

Sayyari, M., M. Babalar, S. Kalantari, D. Martinef-Romeo, F. Guillen, M.Serrano and D. Valero. 2011. Vapour treatments with melhyl salicylate or methyl jasmonate alleviated chilling injury and enhanced antioxidant potential during postharvest storage of pomegranates. Food chem.174 (3): 964-970.

Sheng, J. 2011. Effect of melhyl salicylate on chilling injury and endogenous polymine in postharvest cherry tomato fruit. Food sci 32(20): 286-289.

Tian, S., G. Qin, B. Li, Q. Wang and X. Meng. 2007. Effects of salicylic acid on disease resistance and postharvest decay control of fruits. Steward Post.Rev.6 (2).

Tripathi, P and N.K. Dubey. 2004. Exploitation of natural products as an alternative strategy

to control postharvest fungal rotting of fruits and Vegetables. Postharvest. Biol. Technol. 32: 235-245

Wang, K., P. Jin, S. Cao, H. Shang, Z. Yang and Y. Zheng. 2009. Methyl jasmonate reduces decay and enhances antioxidant capacity in chinese bayberries. J. Agri. Food Chem 57: 5809-5815.

Wang, C.Y. and J.G. Buta. 2003. Maintaing quality of fresh-cut kiwi fruit with volalite compounds. Postharvest. Biol. Tech. 28: 181-186.

Wilson, C.L., J.D. Franklin and B.E. Otto. 1987. Fruit Volatiles Inhibitory to *Monilinia fructicola* and *Botrytis cinera*. Plant. Dis.71: 316-319

Yao, H and S. Tian. 2005. Effect of pre- and post- harvest application of salicylic acid or methyl jasmonate on inducing disease resistance of sweet cherry fruit in storage. Postharvest Biol. Tech. 35: 253-262.

Yao, H.J. and S.P. Tian. 2005. Effects of biocontrol agent and methyl jasmonate on postharvest disease of peach fruit and the possible mechanisms involved. J. Appl. Micro.98: 941-950.

13. ภาคผนวก

Table 1 Effect of MS and MJ on mycelium growth inhibition of longkong and rambutan *Phomopsis spp.*

Treatment	Longkong	Rambutan
water (control)	0 b	0 f

1.52 µl/l MS	100 a	68.49 c
15.24 µl/l MS	100 a	79.47 b
152.4 µl/l MS	100 a	100 a
1524 µl/l MS	100 a	100 a
2.24 µl/l MJ	0 b	29.45 e
22.4 µl/l MJ	0 b	46.18 d
224.3µl/l MJ	0 b	48.74 d
2243µl/l MJ	0 b	49.36 d
CV	0	5.71
F-test	**	**

Table 2 Effect of MS on pre-inoculated *Phomosis spp.* Stain 1 longkong kept at 13 °C

Treatment	Day 10		Day 13	
	Wounded diameter (mm)	Disease percentage (%)	Wounded diameter (mm)	Disease percentage (%)
water (control)	14.20 a	41.94 b	18.04 a	72.32 a
0.75 µl/l MS	9.50 a	30.10 ab	11.79 a	55.13 a
1.50 µl/l MS	13.05 a	18.73 a	15.35 a	57.02 a
CV	53.84	42.99	55.23	31.14
F test	ns	**	ns	ns

Table 3 Effect of MS on pre-inoculated *Phomosis spp.* Stain 2 longkong kept at 13 °C

Treatment	Day 10		Day 13	
	Wounded diameter (mm)	Disease percentage (%)	Wounded diameter (mm)	Disease percentage (%)
water (control)	24.93 b	34.20 b	30.42 b	59.76 b
0.75 µl/l MS	13.48 a	14.71 a	13.34 a	22.45 a
1.50 µl/l MS	27.85 b	40.81 b	32.33 b	58.26 b
CV	25.45	42.74	20.51	34.19
F-test	**	**	**	**

Table 4 Effect of MS on pre-inoculated *Phomosis spp.* Stain 1 and 2 longkong kept at room temperature

Treatment	stain 1		stain 2	
	Wounded diameter (mm)	Disease percentage (%)	Wounded diameter (mm)	Disease percentage (%)
water (control)	12.26 b	54.65 a	4.46 a	45.23 a
0.75µl/l MS	7.24 a	32.23 a	7.84 a	45.80 a
1.50µl/l MS	7.21 a	41.69 a	5.71 a	44.60 a
CV	38.93	43.81	28.89	27.97
F-test	*	ns	ns	ns

Table 5 Effect of MS on pre-inoculated *Phomosis spp.* of rambutan kept at 13 °C

Treatment	Day 9
	Wounded diameter (mm)
water (control)	81.04 b
0.75 µl/l MS	22.19 a
1.50 µl/l MS	87.37 b
CV	74.50
F-test	*

Table 6 Effect of MS on pre-inoculated *Phomosis spp.* of rambutan kept at room temperature

Treatment	Day 3
	Wounded diameter (mm)
water (control)	44.60 b
0.75 µl/l MS	42.91 b
1.50 µl/l MS	36.84 a
CV	10.90
F-test	**

Table 7 Effect of MS and MJ on post-inoculated *Phomosis spp.* Stain 1 longkong kept at 13 ℃

Treatment	Day 7		Day 10		Day 13	
	Wounded diameter (mm)	Disease percentage (%)	Wounded diameter (mm)	Disease percentage (%)	Wounded diameter (mm)	Disease percentage (%)
water (control)	4.17 a	34.22 a	15.21 a	43.47 a	34.28 bc	71.89 bc
0.75 µl/l MS	1.92 a	33.18 a	9.14 a	53.35 a	22.68 a	58.74 a
1.50 µl/l MS	4.47 a	46.14 a	13.53 a	65.06 a	35.18 c	87.66 c
2.00 µl/l MJ	2.49 a	27.87 a	12.33 a	46.38 a	22.54 a	55.79 a
4.00 µl/lMJ	3.38 a	33.64 a	14.53 a	56.36 a	26.51 ab	66.52 a
CV	64.55	50.76	42.7	33.04	29.78	26.06
F-test	ns	ns	ns	ns	**	**

Table 8 Effect of MS and MJ on post-inoculated *Phomosis spp.* Stain 2 longkong kept at 13℃

Treatment	Day 7		Day 10		Day 13	
	Wounded diameter (mm)	Disease percentage (%)	Wounded diameter (mm)	Disease percentage (%)	Wounded diameter (mm)	Disease percentage (%)
water (control)	4.50 a	45.27 b	18.65 bc	60.99 bc	36.40 bc	89.91 b
0.75 µl/l MS	2.00 a	28.23 a	6.69 a	40.70 a	26.65 a	63.11 a
1.50 µl/l MS	12.28 b	66.30 c	24.73 c	77.27 c	44.04 c	93.76 b
2.00 µl/l MJ	5.68 a	50.98 b	27.67 c	67.08 bc	38.20 c	87.81 b
4.00 µl/lMJ	3.92 a	27.76 a	12.53 ab	50.61	28.67 ab	71.32 a
CV	72	28.95	51.62	27.39	25.61	17.51
F-test	**	**	**	**	**	**

Treatment	stain 1		stain 2	
	Wounded diameter (mm)	Disease percentage (%)	Wounded diameter (mm)	Disease percentage (%)
water (control)	12.02 b	41.48 a	18.42 c	73.31 b
0.75µl/l MS	7.38 a	29.23 a	6.46 a	33.86 a
1.50µl/l MS	11.51 b	40.79 a	14.85 bc	44.85 a
2.00µl/l MJ	7.80 a	31.81 a	9.86 ab	39.25a

Table 9 Effect of MS and MJ on post-inoculated *Phomosis spp.* Stain 1 and 2 longkong kept at room temperature

4.00µl/l MJ	9.09 ab	33.23 a	16.51 c	48.24 a
CV	33.18	44.1	41.3	39.99
F-test	*	ns	**	**

Table 10 Effect of MS and MJ on post-inoculated *Phomosis spp.* of rambutan kept at 13 °C

Treatment	Day 9
	Wounded diameter (mm)
water (control)	47.32 c
0.75 µl/l MS	27.04 ab
1.50 µl/l MS	45.13 bc
2 µl/l MJ	20.48 a
4 µl/l MJ	47.17 c
CV	92.14
F-test	*

Table 11 Effect of MS and MJ on post-inoculated *Phomosis spp.* of rambutan kept at room temperature

Treatment	Day 3
	Wounded diameter (mm)
water (control)	41.70 b

0.75 µl/l MS	37.04 ab
1.50 µl/l MS	31.74 a
2 µl/l MJ	31.14 a
4 µl/l MJ	36.17 ab
CV	18.15
F-test	*

Table 12 Effect of MS and MJ on longkong quality kept at 13 °C for 15 days

Treatment	Disease (%)	Firmness (N)	Wtloss (%)	Vit C (mg/ 100 ml)	TA	TSS (%)	L*	a*	b*
water (control)	25.39 a	12.49 a	3.83 a	4.37 c	0.45 a	18.26 a	61.1 a	7.48 a	32.14 a
0.75 µl/l MS	19.67 a	12.29 a	3.7 a	5.06 b	0.38 a	16.90 a	61.42 a	7.15 a	32.01 a
1.5 µl/l MS	22.95 a	11.75 a	3.61 a	4.94 b	0.42 a	17.16 a	59.66 a	8.21 a	32.14 a
2.00 µl/l MJ	14.8 a	11.71 a	3.51 a	5.63 a	0.41 a	17.62 a	60.76 a	7.47 a	32.58 a
4.00 µl/l MJ	30.34 a	12.11 a	3.23 a	5.52 a	0.44 a	17.2 a	59.93 a	8.04 a	31.71 a
CV	77.11	5.02	8.46	6.76	9.21	4.86	2.27	8.01	2.83
F test	ns	ns	ns	**	ns	ns	ns	ns	ns

Table 13 Effect of MS and MJ on rambutan quality kept at 13 °C for 9 days

Treatment	Disease (%)	Firmness (N)	Wtloss (%)	Vit C (mg/ 100 ml)	TA (%)	TSS (%)	L*	a*	b*
water (control)	68 a	39.99 d	0.54 b	63.93 a	2.07 c	19.22 a	30.44 bc	16.27 c	20.11 b
0.75 µl/l MS	64 a	46.52 ab	0.40 a	53.98 b	2.29 bc	18.56 ab	28.99 bc	16.77 c	17.60 c
1.5 µl/l MS	63 a	47.53 a	0.38 a	50.54 c	2.23 bc	18.06 b	30.77 b	15.35 bc	18.47 bc
2.00 µl/l MJ	88 b	41.96 cd	0.42 a	53.23 bc	2.43 b	18.50 ab	28.08 c	13.20 a	18.63 bc
4.00 µl/l MJ	80 ab	43.36 bc	0.41 a	54.95 b	2.79 a	18.00 b	36.05 a	13.37 ab	23.13 a
CV	26.91	8.01	25.46	4.44	9.84	3.2	9.43	15.35	16.01
F test	*	**	*	**	**	*	**	**	**

Table 14 Effect of MS and MJ on β-1,3 glucanase activity of longkong

Treatment	β-1,3 glucanase activity (μmole glucose/mg protein/hour)		
	Day 7	Day 10	Day 13
water (control)	25.40 a	0 c	5.51 b
0.75 μl/l MS	21.96 a	18.73 b	5.21 b
1.5 μl/l MS	22.78 a	0 c	7.07 a
2.00 μl/l MJ	182.26 a	38.76 a	4.13 c
4.00 μl/l MJ	65.55 a	26.67 ab	5.09 b
CV	187.78	42.43	20.29
F test	ns	**	**

Table 15 Effect of MS and MJ on β-1,3 glucanase activity of rambutan

Treatment	β-1,3 glucanase activity (μmole glucose/mg protein/hour)		
	Day 5	Day 7	Day 9
water (control)	74.15 a	104.76 a	81.63 a
0.75 μl/l MS	76.99 a	90.80 a	98.68 a
1.5 μl/l MS	104.30 a	78.88 a	94.24 a
2.00 μl/l MJ	73.84 a	90.00 a	114.73 a
4.00 μl/l MJ	72.26 a	96.02 a	88.43 a
CV	72.10	64.88	30.27
F test	ns	ns	ns

Table 16 Effect of MS and MJ on chitinase activity of rambutan

Treatment	Chitinase activity (μmole GlcNac/mg protein/hour)		
	Day 5	Day 7	Day 9
water (control)	119.22 a	112.44 a	109.33 a
0.75 μl/l MS	144.93 a	124.45 a	109.73 a
1.5 μl/l MS	125.15 a	118.80 a	112.22 a
2.00 μl/l MJ	112.02 a	128.12 a	116.41 a
4.00 μl/l MJ	128.83 a	123.04 a	112.05 a
CV	45.83	8.27	11.58
F test	ns	ns	ns

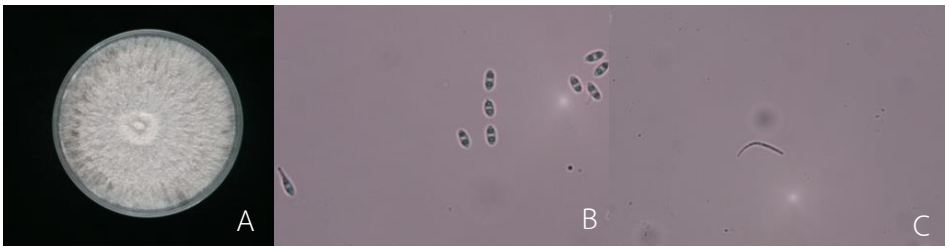

Figure 1 *Phomopsis spp.* of lonkong. Colony on PDA (A) Beta conidia (B) Alpha conidia (C)

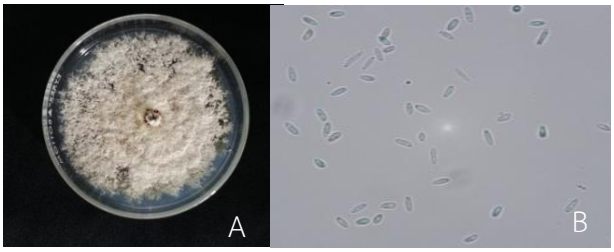

Figure 2 *Phomopsis spp.* of rambutan. Colony on PDA (A) Alpha conidia (B)

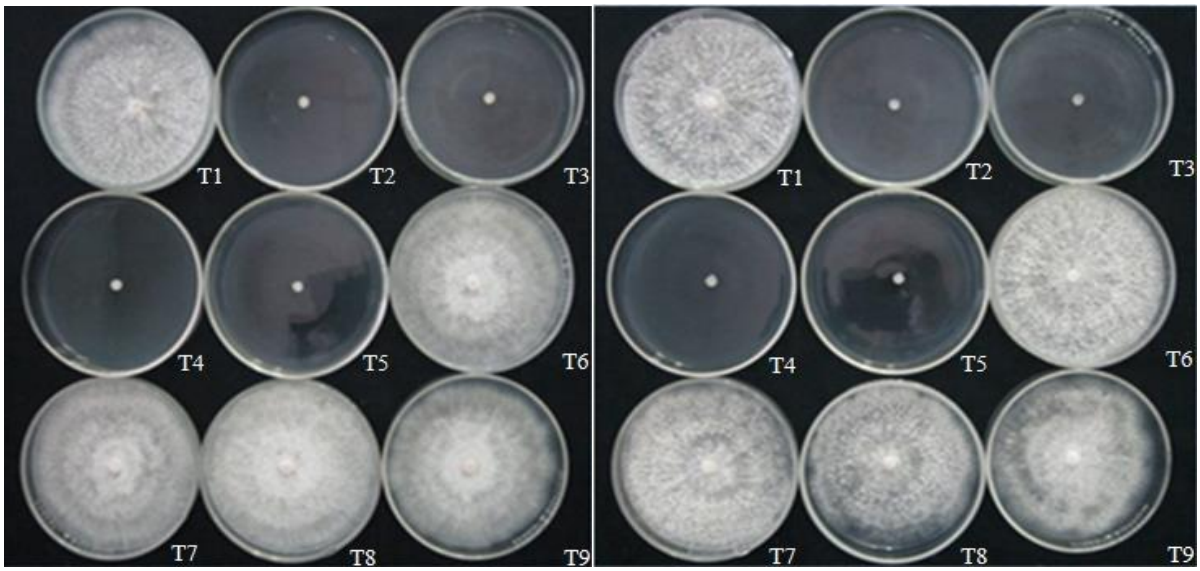

Figure 3 Effect of MS and MJ on mycelium growth inhibition of *Phomopsis spp.* Stain 1 (left hand) and stain 2 (right hand) of longkong (T1 water (control), T2 MS 1.524 µl/l, T3 MS 15.24 µl/l,T4 MS 152.4 µl/l, T5 MS 1524 µl/l, T6 MJ 2.243 µl/l, T7 MJ 22.43 µl/l, T8 MJ 224.3 µl/l, T9 MJ 2243 µl/l)

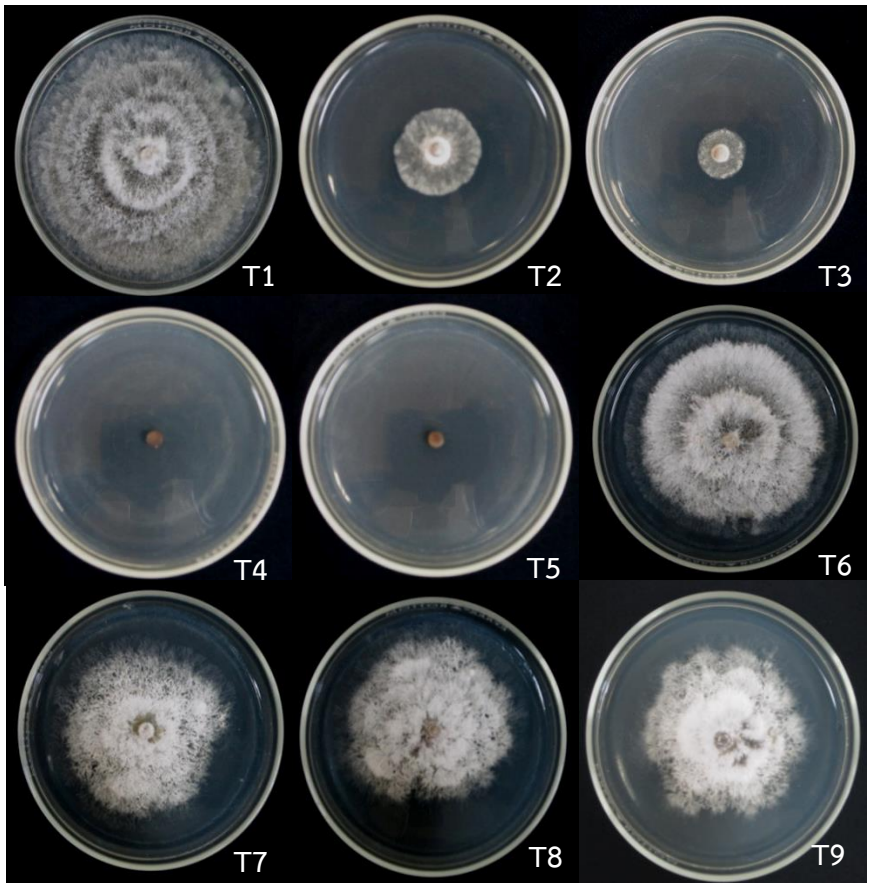

Figure 4 Effect of MS and MJ on mycelium growth inhibition of *Phomopsis spp.* of rambutan (T1 water (control), T2 MS 1.524 µl/l, T3 MS 15.24 µl/l, T4 MS 152.4 µl/l, T5 MS 1524 µl/l, T6 MJ 2.243 µl/l, T7 MJ 22.43 µl/l, T8 MJ 224.3 µl/l, T9 MJ 2243 µl/l)

Figure 5 Effect of MS on pre-inoculated *Phomopsis spp.* Stain 1 longkong kept at 13 C.

Figure 6 Effect of MS on pre-inoculated *Phomopsis spp.* Stain 2 longkong kept at 13 C °

Figure 7 Effect of MS on pre-inoculated *Phomopsis spp.* rambutant kept at 13 C°

Figure 8 Effect of MS and MJ on post-inoculated *Phomopsis spp.* Stain 1 longkong kept at 13 C°

Figure 9 Effect of MS and MJ on post-inoculated *Phomopsis spp.* Stain 2 longkong kept at 13 C°

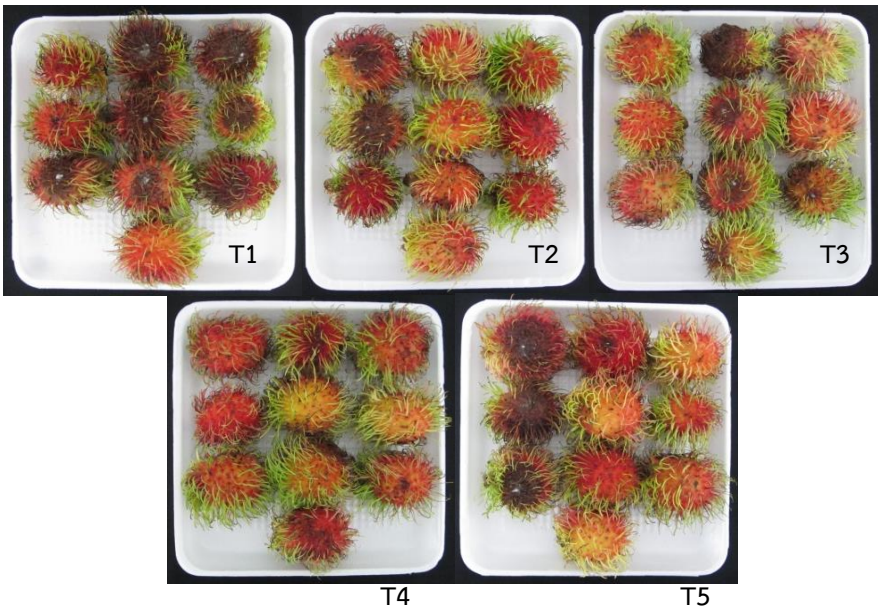

Figure 10 Effect of MS and MJ on post-inoculated *Phomopsis spp.* rambutant kept at 13 C°

Figure 11 Effect of MS and MJ on natural longkong kept at 13 C°

Figure 12 Effect of MS and MJ on natural rambutant kept at 13 C°