Agricultural Sci. J. 42 : 1 (Suppl.) : 159-162 (2011) ว. วิทย. กษ. 42 : 1 (พิเศษ) : 159-162 (2554)

ประสิทธิภาพของไคโทซานในการควบคุมโรคเน่าราเขียว (*Penicillium digitatum* Sacc.) ของผลส้มโชกุนหลังการเก็บเกี่ยว

Efficiency of Chitosan on Green Mold (*Penicillium digitatum* Sacc.) Rot Control in Posthavest Mandarin cv.Shogun fruits

แววฤดี แววทองรักษ์[1], ศุภชัย ภิสัชเพ็ญ[2] และ วิจิตรา ลีละศุภกุล[1,3*]

Wawreadee Wawtongrak[1], Supachai Pisuchpen[2] and Wichitra Leelasupakul[1,3*]

Abstract

Chitosan, a natural polymer, has been shown to have not only antifungal activity, but also stimulating defense reaction in various plants. Moreover, it has been used as fruit coating material in order to prolong the storage life and provide disease protection. This work focused on the use of chitosan as a surface coating agent and its efficacy of controlling growth of green mold pathogen (*P. digitatum* Sacc.) in citrus after harvest. Various concentrations of chitosan solution (0.01, 0.05 and 0.1% (w/v)) were tested for fungal inhibition on PDA plates. The percentages of growth inhibition against *P. digitatum* of 92.06 and 100 were revealed after exposure to 0.05 and 0.1% chitosan on agar plates for weekly incubation, respectively. Efficacy test on citrus fruits coated with chitosan (0.1, 0.5 and 1.0 %) was conducted and challenged with *P. digitatum* (10^4spores/ml). All the treatments were stored in the plastic boxes at 25 °C, 95% RH for 7 days. The development of disease was daily monitored and recorded. The chitosan at 0.5 and 1.0% reduced 70-80% incidence of disease on fruits. However, the virulent symptom was detected on fruits treated with 0.1% chitosan. Thus, the potential of chitosan at concentrations higher than 0.5% was demonstrated to be able to control growth of green mold (*P. digitatum* Sacc.) in posthavest mandarin cv. Shogun fruits.

Keywords: chitosan, citrus, green mold rot disease

บทคัดย่อ

ไคโทซานเป็นพอลีเมอร์ธรรมชาติที่มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของเชื้อราและกระตุ้นระบบป้องกันตัวของพืช นอกจากนี้ไคโทซานถูกนำมาใช้ในการเคลือบผิวผลไม้เพื่อยืดอายุของผลผลิตและป้องกันโรค งานวิจัยนี้มุ่งเน้นการใช้ไคโทซานเป็นสารเคลือบผิวส้มและทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมโรคเน่าราเขียวสาเหตุจากเชื้อ *P. digitatum* Sacc. หลังการเก็บเกี่ยว การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อราเมื่อใช้ไคโทซานที่ความเข้มข้น 0.01, 0.05, และ 0.1 % (w/v) บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA พบว่าที่ความเข้มข้นของ 0.05 และ 0.1 % สามารถยับยั้งได้ 92.06 และ 100 % ตามลำดับ หลังจากบ่มเชื้อนาน 7 วัน เมื่อเคลือบผลส้มด้วยสารละลายไคโทซานที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5 และ 1% และปลูกเชื้อราเขียว จัดเรียงในกล่องพลาสติกที่มีความชื้น 95% และบ่มที่ 25 °C วัดขนาดบาดแผลทุกวันจนครบ 7 วัน พบว่าผลส้มที่เคลือบผิวด้วยสารละลายไคโคซานเกิดโรคน้อยกว่าชุดควบคุม โดยในชุดทดสอบผลส้มที่เคลือบด้วย 0.5 และ 1% ไคโทซานพบอาการของโรคลดลง 70-80% แต่ที่เคลือบด้วย 0.1% ไคโทซานนั้นอาการของโรคเกิดขึ้นอย่างรุนแรง ดังนั้นจากผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าศักยภาพของไคโทซานในการควบคุมโรคเน่าราเขียวของผลส้มโชกุนควรใช้ความเข้มข้นที่สูงกว่า 0.5 %

คำสำคัญ: ไคโทซาน, ส้ม, โรคเน่าราเขียว

[1]ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา 90112

[1] Department of Biochemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Songkhla, 90112

[2] ภาควิชาเทคโนโลยีวัสดุภัณฑ์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา 90112

[2] Department of Material Product Technology, Faculty of Argo-Industry, Prince of Songkla University, Songkhla, 90112

[3] ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว ภาคีมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา, 90112

[3] Postharvest Technology Innovation Center, Prince of Songkla University, Songkhla, 90112

* Correspondence wichitra.l@psu.ac.th

คำนำ

โรคผลเน่าราเขียวของส้มเกิดจากเชื้อรา *Penicillium digitatum* Sacc. เป็นสาเหตุหลักของการสูญเสียผลิตผลของส้ม เนื่องจากรูป รส และกลิ่นของผลส้มที่เน่า ไม่สามารถนำมารับประทานได้ เชื้อดังกล่าวเข้าทำลายทางบาดแผลบริเวณเปลือกที่เกิดขึ้นจากกระบวนการเก็บเกี่ยว การขนส่งเป็นต้น (Obagwa and Korsten, 2003) จึงจำเป็นต้องมีการการควบคุมโรคดังกล่าว โดยส่วนใหญ่แล้วนิยมใช้สารเคมียาฆ่าเชื้อรา (Kinay *et al*., 2007) แต่วิธีนี้อาจเป็นอันตรายต่อสุขภาพของผู้บริโภค จึงจำเป็นต้องหาวิธีการอื่นที่มีความปลอดภัยสูงและประสิทธิภาพเทียบเท่าการใช้สารเคมี (Janisiewicz and Korsten, 2002) สารเคลือบผิวผลไม้เป็นอีกช่องทางเลือกที่ช่วยรักษาความสดใหม่ ยืดอายุ ลดการสูญเสียน้ำ ชะลอการแลกเปลี่ยนแก๊ส ทำให้สามารถเก็บผลไม้ได้เป็นเวลานานขึ้นพร้อมทั้งยังช่วยในเรื่องการป้องกันโรคต่างๆ มักใช้เป็นสารเคลือบผิวจากธรรมชาติ (natural wax) ซึ่งเป็นกลุ่มสารเคมีที่สามารถรับประทานได้ หรือทำจากวัสดุชีวภาพที่สลายได้เองตามธรรมชาติ ไม่เป็นอันตรายหรือเป็นพิษต่อมนุษย์ สัตว์และสิ่งแวดล้อม เช่น ไคโทซานซึ่งปัจจุบันถูกนำไปใช้งานในด้านต่างๆมากมาย อาทิเช่น การเกษตร การแพทย์ หรือเป็นส่วนผสมของเวชภัณฑ์หลากหลายชนิด ในทางด้านการเกษตรนั้นนอกจากนำมาใช้เป็นปุ๋ยหรือสารเคลือบผิวแล้ว ยังพบว่าไคโทซานสามารถควบคุมโรคพืชที่มีสาเหตุจากเชื้อราหลากหลายชนิด เช่น *P. digitatum* และ *P. expansum* หรือนำไปเคลือบผิวผลไม้เพื่อป้องกันโรคและยืดอายุของผลิตผล (Chien *et al*., 2007) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นการใช้ไคโทซานเป็นสารเคลือบผิวส้มและทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมโรคเน่าราเขียวสาเหตุจากเชื้อ *P. digitatum* Sacc. หลังการเก็บเกี่ยว

อุปกรณ์และวิธีการ

1. เชื้อรา *P. digitatum*

ใช้เชื้อรา *P. digitatum* ซึ่งเป็นสาเหตุโรคผลเน่าที่คัดแยกให้บริสุทธิ์ ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) ทดสอบความรุนแรงของเชื้อบนผลส้มเป็นครั้งคราวก่อนนำมาใช้ในการทดสอบ

2. ประสิทธิภาพของไคโทซานในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. digitatum* บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

ละลายเกล็ดไคโทซาน (95% deacetylation; food grade) ด้วย 2% acetic acid คนจนกระทั่งกลายเป็นเนื้อเดียวกันและปรับค่า pH เป็น 5.6 นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำที่ 121 °C นาน 15 นาที นำมาผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุ่นโดยมีความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายไคโทซานเป็น 0.01 0.05 และ 0.1% เทอาหารลงในจานอาหาร โดยชุดควบคุมนั้นมีเพียงอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เพียงอย่างเดียว ตั้งทิ้งไว้ให้แข็ง นำก้อนเชื้อราวางตรงกลางจาน บ่มไว้ที่ 25 °C จนกระทั่งโคโลนีเชื้อราของชุดควบคุมเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ วัดการเจริญของโคโลนีเชื้อราและคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งจากสูตร

3. ประสิทธิภาพของไคโทซานในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. digitatum* ที่ปลูกบนผลส้ม

คัดเลือกผลส้มที่แก่จัด สีเขียวทั้งผล ขนาดเท่ากัน มาล้างทำความสะอาดด้วยสารละลาย 0.1% Sodium hypochlorite เช็ดผิวด้วย 70% ethanol ตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นเคลือบผลส้มด้วยสารละลายไคโทซานที่ความเข้มข้น 0.1 0.5 และ 1.0% โดยใช้สารละลายไคโทซานปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อ 1 ผล ส่วนชุดควบคุมประกอบด้วยชุดควบคุมโรค (Disease control) หยดเฉพาะสารแขวนลอยสปอร์เชื้อราเพียงอย่างเดียว ชุดควบคุมปกติ (Healthy control) หยดเฉพาะน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และชุดควบคุมโรคด้วยสารเคมีฆ่าเชื้อรา imazalil ความเข้มข้น 100 ppm จากนั้นใช้เข็มเขี่ยเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วทำบาดแผลบนผิวส้มผลละ 2 บาดแผล โดยให้บาดแผลอยู่ระนาบเดียวกันกับด้านขั้วกลางผลและก้นของผลส้ม โดยแต่ละบาดแผลมี 5 รู ขนาดบาดแผลลึก 0.3 มิลลิเมตร กว้าง 0.1 มิลลิเมตร จัดเรียงส้มในกล่องที่เตรียมไว้ ใช้ปิเปตดูดสารแขวนลอยสปอร์เชื้อรา P. digitatum (1×10^4spore/ml) 20 ไมโครลิตร หยดบนบริเวณบาดแผล บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 95% สังเกตอาการของโรคและการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา P. digitatum วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบาดแผลที่เกิดจากการเจริญของเชื้อรา P. digitatum เป็นเวลา 7 วัน เกณฑ์สำหรับพิจารณาการเกิดโรคผลเน่าตัดสินจากเส้นผ่านศูนย์กลางบาดแผลมีขนาดมากกว่า 5 เซนติเมตรขึ้นไป โดยทำการทดลองชุดทดสอบละ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ผล วิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS 15.0

ผล

1. ไคโทซานกับการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. digitatum* บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

ติดตามการเจริญของเชื้อราที่เพาะเลี้ยงบนจานอาหาร PDA ที่ผสมสารละลายไคโทซานเข้มข้น 0.01 0.05 และ 0.1 % นาน 7 วัน พบว่าที่ความเข้มข้น 0.05 และ 0.1 % สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ 92.06 % และ 100 % ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ และลักษณะโคโลนีของเชื้อราผิดปกติเมื่อเทียบกับชุดควบคุมโดยพบว่าที่ความเข้มข้น 0.01 % การเจริญของเชื้อราค่อนข้างช้ากว่าชุดควบคุมแต่เมื่อตั้งทิ้งไว้ต่อไป โคโลนีของเชื้อราสามารถเจริญได้เต็มจานอาหาร ส่วนที่ความเข้มข้น 0.05 % พบว่าการเจริญของเส้นใยเชื้อราเกิดขึ้นได้ช้ามาก มีขนาดเล็กแต่สร้างสปอร์ได้ จานอาหาร PDA ที่ผสมไคโทซาน 0.1 % ไม่พบการเจริญของเส้นใยเชื้อราแม้ตั้งทิ้งไว้เป็นระยะเวลานาน ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าสารละลายไคโทซานที่ความเข้มข้นเหมาะสมสำหรับยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้ (Figure 1)

2.ไคโทซานกับการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. digitatum* บนผลส้ม

หลังจากปลูกเชื้อรานาน 7 วัน พบว่าผลส้มที่เคลือบผิวด้วยสารละลายไคโคซานแสดงอาการของโรคน้อยกว่าชุดควบคุม โดยในชุดทดสอบผลส้มที่เคลือบด้วยไคโทซาน 0.5 และ 1.0 % พบอาการของโรคลดลง 70-80% แต่พบอาการของโรคที่ปรากฏรุนแรงกว่าในผลส้มที่เคลือบด้วยไคโทซาน 0.1 % แต่น้อยกว่าผลส้มในชุดควบคุมโรค (disease control) ที่ไม่ได้เคลือบสารละลายไคโทซาน ผลการทดลองนี้บ่งชี้ว่าสารละลายไคโทซานสามารถยับยั้งการเกิดโรคเน่าราเขียวได้ โดยความเข้มข้นของไคโทซาน 0.5-1.0 % ลดอัตราการเกิดโรคและการเน่าเสียในผลส้มได้อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อสังเกตลักษณะของผลส้มที่เคลือบด้วยไคโทซานแม้ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลาหลายวัน สีของผิวส้มเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย

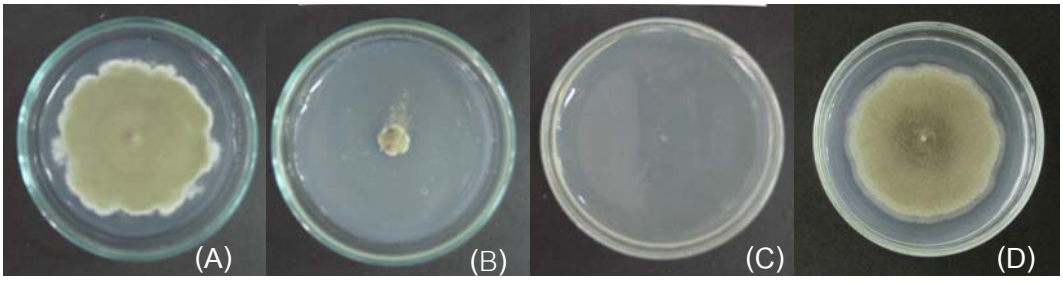

Figure 1 Inhibitory effect of chitosan at different concentrations on hyphal growth of *P. digitatum*. 0.01% chitosan (A) 0.05**%** chitosan (B), 0.10**%** chitosan (C), and control (D) after incubation at 25°C for 7 days

Table 1 Percentage of decay and disease incidence of mandarin cv.Shogun coated with chitosan at different concentrations, incubated at 25°C for 7 day.

Treatment	% Disease incidence [a]	% Decay[b]
Healthy control	13.33c	0b
Disease control	80.00a	80.00a
0.1%chitosan	46.67a	33.33c
0.5%chitosan	26.67b	26.67b
1.0%chitosan	26.67b	20.00b
Imazalil	6.63d	6.67b

[a,b] Values in a column followed by different letter are significantly different according to Fisher's least significance difference (P = 0.05)

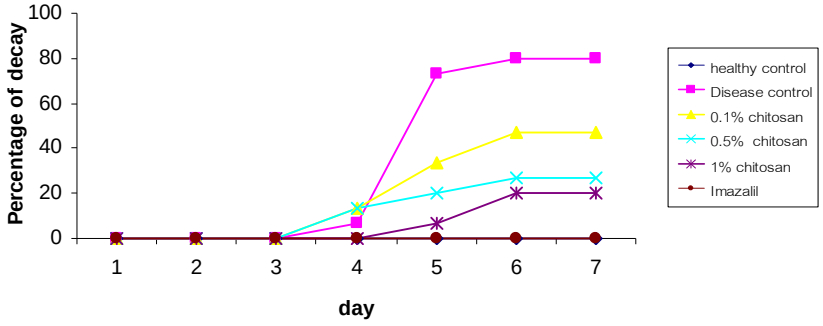

Figure 2 Decay of the chitosan coated mandarin cv. Shogun citrus fruits infected with *P. digitatum* during incubation at 25 °C for 7 days

วิจารณ์ผล

จากการทดลองพบว่าสารละลายไคโทซานสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *P. digitatum* Sacc. ในระดับอาหารเลี้ยงเชื้อและผลส้มได้ สามารถเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาของเชื้อราโดยทำให้เกิดการรั่วของผนังเซลล์หรือให้เกิดการบวมของไซโทพลาสซึม (Chung and Chen, 2008) ซึ่งการทดลองในระดับจานอาหารนั้นพบว่าสารละลายไคโทซานที่ความเข้มข้น 0.05% สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราแต่เชื้อรายังสามารถสร้างสปอร์ได้เป็นจำนวนมาก เนื่องจากการเลี้ยงเชื้อราในสภาวะเครียดนั้นเป็นการกระตุ้นให้เชื้อราสร้างสปอร์มากกว่าการสร้างเส้นใยซึ่งจากผลการทดลองดังกล่าวบ่งชี้ว่าไคโทซานมีผลต่อการเจริญของเส้ยใยรามากกว่าการสร้างสปอร์อย่างเห็นได้ชัดเจน ส่วนการเคลือบผลส้มด้วยสาระลายไคโทซานที่ระดับความเข้มข้น 0.1-1 % อาการเน่าเสียของผลส้มลดลงอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเทียบกับผลส้มที่ไม่ได้เคลือบไคโทซาน ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับการทดลองของ Chien *et al.* (2007) รายงานว่าไคโทซานลดอาการเน่าเสียของผลส้มที่มีสาเหตุมาจากเชื้อรา 2 ชนิดคือ *P. digitatum* และ *P. italicum* สามารถเก็บผลไม้ได้นานถึง 56 วัน ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส Bautista-Baños *et al.* (2006) รายงานว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราเพิ่มมากขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายไคโทซาน ดังนั้นในการประยุกต์ใช้นั้นจึงต้องเลือกใช้ความเข้นของไคโทซานที่เหมาะสม

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ เอื้อเฟื้อสถานที่และเครื่องมือในการทำงานวิจัย ทุนความเป็นเลิศทางชีวเคมี และทุนการศึกษาโครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก (สกว) และ ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยวภาคีมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่สนับสนุนทุนการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

Bautista-Baños, S., A.N. Hernández-Lauzardo, M.G. Velázquez-del Valle, E. Hernández-López, M. Ait Barka, E. Bosquez-Molina and C.L. Wilson, 2005. Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. Crop Protection 25:108–118.

Chien, P., F. Sheu and H. Lin. 2007. Coating citrus (Murcott tangor) fruit with low molecular weight chitosan increases postharvest quality and shelf life. Food Chemistry 100: 1160–1164.

Chung, Y. and C. Chen. 2008. Antibacterial characteristics and activity of acid-soluble chitosan. Bioresource Technology 99 :2806–2814.

Janisiewicz, W.J. and L. Korsten. 2002. Biological control of postharvest disease of fruits. Annual Review of Phytopathology 40 :411-441.

Kinay, P., F.M. Mansour, F.M. Gabler, D.A. Margosan and J.L. Smilanick. 2007. Characterization of fungicide-resistant isolates of *Penicillium digitatum* collected in California. Crop Protection 26: 647-656.

Obagwa, J. and L. Korsten. 2003. Integrated control of citrus green and blue molds using *Bacillus subtilis* in combination with sodium bicarbonate or hot water. Postharvest Biology and Technology 28: 187-194.