รายงานผลการวิจัย

เรื่อง

ความสัมพันธ์ระหว่างกลไกความต้านทานและการเกิดโรคแอนแทรกโนส ของผลมะม่วง

The relationship between resistant mechanisms and pathogenicity of anthracnose disease of mango fruits

จัดทำโดย

ผ่องเพ็ญ จิตอารีย์รัตน์ ศิริชัย กัลยาณรัตน์ ทรงศิลป์ พจนชนะชัย
วิษณุ นิยมเหลา อินทิรา ลิจันทร์พร ชัยรัตน์ เตชะวุฒิ
คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณวิจัยจาก
โครงการพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยเทคโนโลยี ประจำปีงบประมาณ 2547

คำนำ

มะม่วงเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย เนื่องจากเป็นพืชที่มีศักยภาพในการส่งออกสูง สามารถนำรายได้เข้าสู่ประเทศชาติปีละหลายล้านบาท ประเทศที่เป็นลูกค้าที่สำคัญของประเทศไทย ได้แก่ ญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกา และประเทศแถบยุโรป แต่ปัญหาที่สำคัญในการผลิตมะม่วงที่มีคุณภาพดีเพื่อการส่งออกคือ การเน่าเสีย ซึ่งเกิดจากเชื้อราหลากหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรกโนสของมะม่วง เชื้อราชนิดนี้จะเข้าทำลายผลมะม่วงได้ทุกระยะการเจริญเติบโตและทุกชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อพืช หากการเข้าทำลายเกิดที่ผล อาการของโรคจะยังไม่ปรากฏในระยะผลดิบแต่จะปรากฏเมื่อผลเริ่มสุก เนื่องจากในผลที่ดิบอาจจะมีสารประกอบที่มีฤทธิ์ต่อต้านเชื้อรา เช่น สารประกอบในกลุ่มฟีนอล หรือมีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคสูง เช่น peroxidase, phenylammonia lyase, chitinase, β-1,3-glucanase เป็นต้น แต่เมื่อผลสุกหรือเกิดการชราภาพสารประกอบหรือเอนไซม์ที่ต่อต้านเชื้อราจะค่อยๆ ลดลง ซึ่งมะม่วงแต่ละพันธุ์จะมีความต้านทานโรคในระดับที่แตกต่างกันออกไป ในปัจจุบันการศึกษาถึงความต้านทานโรคของมะม่วงพันธุ์ต่างๆ ที่มีอยู่ในประเทศไทยมีน้อยมาก มีเพียงรายงานของ ดร.สมศิริ แสงโชติ ในปี 2541 ที่พบว่าพันธุ์น้ำดอกไม้เป็นพันธุ์ที่อ่อนแอต่อการเกิดโรคแอนแทรกโนส ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงมีความตั้งใจที่จะศึกษาถึงความต้านทานโรคแอนแทรกโนสของมะม่วงพันธุ์ต่างๆ จำนวน 5 พันธุ์ โดยพิจารณาจากเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคพืชในระหว่างกระบวนการสุกของมะม่วง ซึ่งคณะผู้วิจัยได้ดำเนินการวิจัยและเสนอผลการทดลองไว้ในรายงานฉบับนี้แล้ว

ผ่องเพ็ญ จิตอารีย์รัตน์ และคณะผู้วิจัย

21 มกราคม 2548

สารบัญ

	หน้า
คำนำ	ข
สารบัญ	ค
บทคัดย่อ	1
บทนำ	2
- หลักการและเหตุผล	2
- วัตถุประสงค์	2
- ขอบเขตของงานวิจัย	3
- ระยะเวลาในการดำเนินงาน	3
- ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
- งบประมาณ	4
การ ตรวจและทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย	5
อุปกรณ์และวิธีการ	8
- ศึกษาการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคในระหว่างกระบวนการสุกของผลมะม่วง	8
- ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเข้าทำลายมะม่วงของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรกโนส	8
- ศึกษาการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคแอนแทรกโนสของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ในระหว่างการเกิดโรค	9
ผลการทดลอง	10
- การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคในระหว่างกระบวนการสุกของผลมะม่วง	10
- กิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเข้าทำลายมะม่วงของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรกโนส	22
- การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคแอนแทรกโนสของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ในระหว่างการเกิดโรค	23
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	26
เอกสารอ้างอิง	30

ความสัมพันธ์ระหว่างกลไกความต้านทานและการเกิดโรคแอนแทรกโนสของผลมะม่วง

บทคัดย่อ

การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคพืช ได้แก่ peroxidase, β-1,3-glucanase, chitinase และ polygalacturonase (PAL) ที่เปลือกและเนื้อของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ โชคอนันต์ หนังงกลางวัน อกร่อง และแรด ในระหว่างการสุก โดยแบ่งการทดลองเป็น 2 ส่วน คือ มะม่วงที่จุ่มและไม่จุ่มเอทิฟอนก่อนเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง ได้ผลการวิจัยดังนี้ มะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ที่ไม่ได้จุ่มเอทิฟอน พบว่ากิจกรรม β-1,3-glucanase, chitinase และ PAL ทั้งที่เปลือกและเนื้อสูงกว่ามะม่วงทุกสายพันธุ์ตลอดอายุการเก็บรักษา ส่วนเอนไซม์ peroxidase มีสูงที่สุดในเปลือกมะม่วงพันธุ์แรด รองลงมาคือพันธุ์หนังกลางวัน ในขณะที่พันธุ์น้ำดอกไม้มีที่เนื้อสูงกว่าที่เปลือก มะม่วงพันธุ์โชคอนันต์ หนังกลางวันอกร่อง และแรด มีกิจกรรมของเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิด ทั้งที่เปลือกและเนื้อค่อนข้างใกล้เคียงกันตลอดอายุการเก็บรักษา สำหรับมะม่วงที่จุ่มเอทิฟอนก่อนการเก็บรักษา พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ peroxidase, β-1,3-glucanase, chitnase, PAL ทั้งในเนื้อและเปลือกของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้มีสูงที่สุด ขณะที่สายพันธุ์อื่นๆ ไม่มีความแตกต่างกัน การจุ่มเอทิฟอนไม่มีผลกระตุ้นหรือลดกิจกรรมของ peroxidase ที่เปลือกและเนื้อของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ โชคอนันต์ และอกร่อง แต่มีผลไปลดกิจกรรม peroxidase ในพันธุ์หนังกลางวันและแรด และกระตุ้นกิจกรรมของ β-1,3-glucanase ให้สูงเพิ่มขึ้นในพันธุ์หนังกลางวัน นอกจากนี้การจุ่มเอทิฟอนจะไปมีผลกระตุ้นการทำงานของ PAL ที่เนื้อของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ให้สูงขึ้นด้วย อย่างไรก็ตาม การจุ่มเอทิฟอนมีผลต่ออายุการเก็บรักษาของมะม่วงโดยตรง คือทำให้มะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้และโชคอนันต์สุกเร็วขึ้น การตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายผนังเซลล์พืชของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* พบว่า เชื้อมีการผลิตเอนไซม์ polygalacturonase ในปริมาณสูงที่สุด รองลงมาคือ pectate lyase, cellulase และ protease ตามลำดับ การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ peroxidase, β-1,3-glucanase และ chitinase ในมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ที่ปลูกเชื้อรา *C. gloeosporioides* เป็นเวลา 0, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง พบว่า การปลูกเชื้อรามีผลกระตุ้นกิจกรรมของ peroxidase และ β-1,3-glucanase ให้สูงมากขึ้นทั้งที่เปลือกและเนื้อเป็นระยะเวลาสั้นๆ โดยเฉพาะที่เนื้อมะม่วงจะพบกิจกรรมของ peroxidase สูงกว่าส่วนเปลือกมากถึง 9 เท่า นอกจากนี้การปลูกเชื้อราบนมะม่วงมีผลไปเพิ่มการแสดงออกของ chitinase ที่เปลือกให้สูงขึ้น แต่ไม่มีผลในส่วนเนื้อของมะม่วง

คำสำคัญ: มะม่วง, โรคแอนแทรกโนส, กลไกความต้านทานโรคพืช, pectinolytic enzymes, cellulose, protease

บทนำ

หลักการและเหตุผล

โรคแอนแทรกโนสของมะม่วงเป็นโรคภายหลังการเก็บเกี่ยวชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญที่ก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจสูง มีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (นิพนธ์, 2521; บรรณ, 2543) เชื้อราชนิดนี้จะเข้าทำลายผลมะม่วงตั้งแต่ระยะผลดิบและจะปรากฏลักษณะอาการเมื่อผลเริ่มสุก ทั้งนี้เนื่องจากในผลที่ดิบจะมีสารประกอบที่มีฤทธิ์ต่อต้านเชื้อรา หรือ antifungal compound อยู่สูงโดยเฉพาะที่เปลือกของผลิตผล และเมื่อผลิตผลเริ่มสุกปริมาณ antifungal compound จะค่อยๆ ลดลง ทำให้เชื้อราสามารถเข้าทำลายและเจริญเติบโตจนกระทั่งผลผลิตแสดงอาการของโรคออกมาให้เห็น (Prusky และคณะ, 1993) มะม่วงแต่ละสายพันธุ์มีระดับความต้านทานต่อโรคที่แตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบความต้านทานโรคของมะม่วงพันธุ์อกร่อง น้ำดอกไม้ แก้ว และทองดำ พบว่ามะม่วงพันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรคแอนแทรกโนสที่สุด คือพันธุ์น้ำดอกไม้ (Sangchote, 1998) อย่างไรก็ตามกลไกความต้านทานโรคของมะม่วงมีการศึกษากันไม่มากนัก โดยเฉพาะอย่างยิ่งการศึกษาเกี่ยวกับชนิดของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคของผลมะม่วงสายพันธุ์ต่างๆ ในระหว่างกระบวนการสุกและในขณะที่มีการพัฒนาอาการของโรคแอนแทรกโนส ตลอดจนกลไกการเข้าทำลายมะม่วงของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ดังนั้นการศึกษาถึงข้อมูลดังกล่าวนี้ข้างต้นนี้จะทำให้ทราบถึงการใช้เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานเป็นตัวบ่งชี้ถึงลักษณะความต้านทานโรคของมะม่วง และมีประโยชน์ต่อการงานวิจัยอื่นๆ เช่น นำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานด้านความต้านทานโรคของมะม่วง ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์มะม่วงให้ต้านทานต่อโรคโดยการสร้างพืชจำลองพันธุ์ หรือการชักนำความต้านทานโรคให้กับผลมะม่วงตลอดอายุการเก็บรักษา

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคของผลมะม่วงสายพันธุ์ต่างๆ ในระหว่างกระบวนการสุก
2. เพื่อศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเข้าทำลายของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรกโนสมะม่วง
3. เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคแอนแทรกโนสหลังการปลูกเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* บนผลมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้

ขอบเขตของงานวิจัย

1. ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคในระหว่างกระบวนการสุกของมะม่วง ได้แก่ peroxidase, β-1,3-glucanase, chitinase และ phenylammonia lyase บนผลมะม่วงพันธุ์ต่างๆ จำนวน 5 พันธุ์ ได้แก่
    1. พันธุ์น้ำดอกไม้ (เป็นพันธุ์ที่มีรายงานว่าอ่อนแอต่อโรคแอนแทรกโนสมากที่สุด จึงใช้เป็นพันธุ์ resistant check - Sangchote, 1998)
    2. พันธุ์อกร่อง (เป็นพันธุ์ที่มีรายงานว่าต้านทานต่อโรคแอนแทรกโนส จึงใช้เป็นพันธุ์ susceptible check- Sangchote, 1998)
    3. พันธุ์หนังกลางวัน
    4. พันธุ์โชคอนันต์
    5. พันธุ์แรด
2. ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเข้าทำลายของเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรกโนสของมะม่วง ได้แก่ pectate lyase, polygalacturonase, cellulose และ protease
3. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคแอนแทรกโนสของมะม่วงในระหว่างการเกิดโรค ได้แก่ peroxidase, β-1,3-glucanase, chitinase และ phenylammonia lyase

ระยะเวลาในการดำเนินงาน

พฤศจิกายน 2546- ตุลาคม 2547

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เพื่อทราบถึงกลไกความต้านทานโรคของมะม่วงแต่ละสายพันธุ์ว่ามีผลมาจากกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคชนิดใด
2. เพื่อทราบถึงการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคในระหว่างกระบวนการสุกของมะม่วงพันธุ์ต่างๆ
3. เพื่อทราบชนิดและปริมาณของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเข้าทำลายของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรกโนสของมะม่วง
4. เพื่อทราบถึงความสัมพันธ์ระหว่างกลไกความต้านทานโรคและการเกิดโรคแอนแทรกโนสของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้โดยพิจารณาจากการเปลี่ยนแปลงของ enzyme activity ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคบนผลมะม่วง

5. เพื่อนำข้อมูลที่ได้มาใช้เป็นแนวทางในการปรับปรุงพันธุ์มะม่วงให้ต้านทานต่อโรคแอนแทรกโนส หรือชักนำให้มะม่วงผลิตเอนไซม์ที่ต้านทานต่อโรคในระดับสูงตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา

งบประมาณ

งบประมาณที่ได้รับการอนุมัติตลอดโครงการเท่ากับ 113,784 บาท

<u>หมายเหตุ</u> เนื่องจากผู้วิจัยเห็นว่าการศึกษามะม่วงพันธุ์อื่นๆ ที่ไม่ได้เสนอในแบบโครงร่างวิจัย ก็มีความสำคัญไม่น้อย จึงได้ทำการศึกษามะม่วงพันธุ์แรดเพิ่มขึ้นมา โดยใช้เงินสนับสนุนจากห้องปฏิบัติการโรคพืชหลังการเก็บเกี่ยว คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี

การ ตรวจและทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย

โรคแอนแทรกโนสที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. เป็นโรคที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของพืชหลายชนิดโดยเฉพาะพืชที่ปลูกในเขตร้อน เช่น มะม่วง มะละกอ อะโวกาโด เชื้อราจะเข้าทำลายและแอบแฝง (latent infection) อยู่บนผลดิบโดยไม่แสดงอาการจนกระทั่งผลเริ่มสุกอาการของโรคจึงจะปรากฏออกมาให้เห็นอย่างเด่นชัด ลักษณะการเข้าทำลายของเชื้อราชนิดนี้จัดเป็นพวก intracellular hemibiotrophy ประกอบด้วยช่วงเวลาการเข้าทำลาย 2 ระยะคือ biotrophic phase เป็นระยะที่เส้นใยเจริญอยู่ใน intracellular ของ epidermalacells ซึ่งจะไม่ปรากฏอาการของโรคในระยะนี้ ส่วนระยะ necrotrophic phase เป็นระยะที่เส้นใยเจริญอยู่ใน intracellular และ intercellular cells ของพืชอาศัยและเป็นระยะที่แสดงอาการของโรคแอนแทรกโนสออกมาให้เห็น ซึ่งในช่วงเดียวกันนี้ก็เกิดการเสื่อมสลายของเนื้อเยื่อพืชเนื่องมาจากกิจกรรมของเอนไซม์ที่ของเชื้อราผลิตออกมาย่อยผนังเซลล์พืช (cell-wall degrading enzymes, CWDEs) มีปริมาณสูงขึ้น (Wei และคณะ, 1997) CWDEs ของเชื้อราสาเหตุโรคพืชส่วนมากเป็นเอนไซม์ในกลุ่ม pectinases ได้แก่ polygalacturonase (PG), pectin lyase (PNL) และ pectate lyase (PEL) ทำหน้าที่ย่อยเพคติน (pectin) ที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์พืช (Annis และ Goodwin, 1997) อย่างไรก็ตามในเนื้อเยื่อพืชที่ปกติพบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์ PG อยู่แต่ในปริมาณไม่มากนัก นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าเชื้อสาเหตุโรคพืชบางชนิดสามารถผลิตเอนไซม์ cellulase และ protease ออกมาย่อยเซลลูโลสและโปรตีนของพืชอาศัยได้พร้อมๆ กันกับการปลดปล่อย pectinases อีกด้วย จากงานทดลองของ Wattad และคณะ (1997) พบว่าผลอะโวกาโดที่ถูกเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* เข้าทำลายจะมีกิจกรรมของ pectate lyase เพิ่มมากขึ้นในเนื้อเยื่อที่แสดงอาการโรคแอนแทรกโนส โดยเฉพาะบริเวณขอบแผลมากกว่าบริเวณกลางผลซึ่งมีการเสื่อมสลายของเนื้อเยื่อไปแล้ว ในขณะเดียวกันพบว่าสารประกอบ antifungal ในบริเวณเนื้อเยื่อที่ถูกทำลายนั้นจะมีปริมาณลดลง

ความต้านทานของพืชต่อเชื้อราขณะที่ผลผลิตยังดิบอยู่มีรายงานว่าเป็นผลจากพืชมีสารประกอบที่มีฤทธิ์ต่อต้านเชื้อรา (antifungal compound) อยู่สูงโดยเฉพาะที่เปลือกของผลิตผล เช่น 1-acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-heneicosa-12,15 diene และเมื่อผลิตผลเริ่มสุกปริมาณ antifungal compound จะค่อยๆ ลดลง ทำให้เชื้อราสามารถเข้าทำลายได้มากขึ้น ในที่สุดทำให้ผลิตผลแสดงอาการของโรคออกมา (Prusky และคณะ, 1993) การลดลงของ antifungal compound มีความเกี่ยวข้องกับการทำงานของเอนไซม์ lipoxygenase โดยจะทำหน้าไป oxidize สาร antifungal compound ไปเป็นสารประกอบที่ไม่มีฤทธิ์ในการต่อต้านเชื้อรา กิจกรรมของ lipoxygenase อยู่ภายใต้การควบคุมของสารจำพวก flavan-3-ol, epicatechin และ antioxidant ที่พบในเปลือกของผลผลิตตามธรรมชาติ ซึ่งสารเหล่านี้จะลดลงเมื่อผลผลิตเริ่มเข้าสู่กระบวนการสุก (Prusky และคณะ, 1988)

โดยทั่วไปพืชจะมีการตอบสนองต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคอย่างรวดเร็วโดยการผลิต reactive oxygen species ซึ่งจะมีผลทำให้พืชเกิดปฏิกิริยาการตอบสนองแบบ hypersensitive response (HR) เกิดการสะสมของ antimicrobial phytoalexins มีกิจกรรมของ phenylpropanoid metabolism เพิ่มสูงขึ้น และมีการผลิตโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรค (pathogenesis-related proteins หรือ PR proteins) หรือผนังเซลล์ของพืชมีความแข็งแรงเนื่องจากมีการสะสมของ lignin และ hydroxyproline-rich proteins (Linthorst, 1991; Dixon และคณะ, 1994) PR-protein ประกอบด้วยโปรตีนหลายกลุ่ม สามารถแบ่งได้เป็นพวกที่เป็นกรด (acidic) และเบส (basic) ปกติ basic PR-protein มักจะพบบริเวณ vacuole และ acidic PR-protein มักจะถูกปลดปล่อยออกมาอยู่ที่ cell surface (Bol, 1996; Kitajima และ Sato, 1999) เช่น chitinase จัดอยู่ในกลุ่ม PR groups 3 และ β-1,3-glucanases จัดอยู่ใน PR groups 2 ซึ่งพบอยู่ในส่วนของ vacuole

β-1,3-glucanases และ chitinase เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม hydrolases ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ โดย β-1,3-glucanases จะทำหน้าที่ hydrolyse สายโพลิเมอร์ของ β-1,3-linkaged-glucan ที่เป็นองค์ประกอบหลักของเชื้อราชั้นสูง (Melchers และคณะ, 1994; Boller, 1985) ปกติปริมาณเอนไซม์ glucanase จะมีอยู่ในระดับที่ต่ำในเนื้อเยื่อพืชทั่วไป และถูกชักนำได้เมื่อถูกเชื้อรา ไวรัส แบคทีเรียเข้าทำลาย หรือเมื่อได้รับสิ่งกระตุ้น (elicitors) ตลอดจนการให้สารเคมีหรือเอทิลีนจากภายนอก (Kim และ Hwang, 1994; Wubben และคณะ, 1996) ส่วน chitinase สามารถ hydrolyze สารโพลิเมอร์ของ β-1,4-linkage ของ *N*-acetylglucosamine ของไคติน (chitin) ที่พบในองค์ประกอบของผนังเซลล์เชื้อราแต่ไม่พบในพืชชั้นสูง chitinase จะมีผลไปย่อยปลายเส้นใยของเชื้อรา (hypha tip) จากกิจกรรมของเอนไซม์ทำให้ได้ oligosaccharide elicitor ที่สามารถกระตุ้นให้พืชสังเคราะห์สารจำพวก antimicrobial phytoalexins และพบว่ามักมีกิจกรรมของเอนไซม์ glucanase เกิดร่วมด้วยเสมอ (Keen และ Yoshikawa, 1983; Mauch, 1988)

เอนไซม์หลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานของพืชต่อเชื้อสาเหตุโรค เช่น L-phenylalanine ammonia-lyase (PAL), chalcone synthase (CHS) และ chalcone reductase (CHR) เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารประกอบ phenol หรือ phytoalexin ที่เกิดขึ้นใน phenylpropanoid biosynthetic pathway หรือ phenolic compound biosynthesis เอนไซม์เหล่านี้จะผลิตขึ้นอย่างรวดเร็วหลังจากได้รับตัวกระตุ้นจากสิ่งแวดล้อม เช่น การเข้าทำลายของเชื้อโรค หรือการเกิดบาดแผล โดย PAL เป็นเอนไซม์ตัวแรกใน phenylpropanoid pathway ตามด้วยเอนไซม์ CHS จะทำให้ได้ผลผลิตคือ chalcone ซึ่งต่อมาจะถูกเปลี่ยนไปเป็น flavanone โดยเอนไซม์ chalcone isomerase (CHI) (Hahlbrock และ Scheel, 1989) นอกจากนี้ยังมี oxidase enzymes ต่างๆ ได้แก่ peroxidase (POX) และ polyphenol

oxidase (PPO) ซึ่งทำหน้าที่ในขบวนการสร้าง lignin และ oxidative phenols อื่นๆ เพื่อช่วยเพิ่มความต้านทานให้กับโครงสร้างของเซลล์พืช (Avdiushko และคณะ, 1993)

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคในระหว่างกระบวนการสุกของผลมะม่วง

ผลมะม่วงสายพันธุ์ต่างๆ ที่ใช้ในการตรวจสอบ มีจำนวน 5 พันธุ์ ได้แก่ น้ำดอกไม้ หนังกลางวัน อกร่อง โชคอนันต์ และแรด (พันธุ์แรดเป็นสายพันธุ์ที่คณะผู้วิจัยศึกษาเพิ่มเติมจากโครงร่างงานวิจัย) นำผลมะม่วงสีเขียวที่สุกแก่จัดเต็มที่มาล้างทำความสะอาดผิวและผึ่งให้แห้งก่อนนำเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง ทำการตรวจวัดกิจกรรมของเอ็นไซม์ทุกๆ 24 ชั่วโมง จนกระทั่งผิวของผลมะม่วงเริ่มเปลี่ยนเป็นสีเหลืองทั่วทั้งผล โดยการเก็บตัวอย่าง (จำนวน 4 ซ้ำ) จากส่วนเปลือกของผลมะม่วง โดยปอกเปลือกให้มีความหนาลึกประมาณ 2 มิลลิเมตร มาตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคดังต่อไปนี้คือ

- Peroxidase (POX) โดยวิธีของ Harrison และคณะ (1995)
- β-1,3-glucanase โดยวิธีของ Hwang และคณะ (1997)
- Chitinase โดยวิธีของ Hwang และคณะ (1997)
- Phenylammonia lyase (PAL) โดยวิธีของ Camm และ Towers (1973)

2. ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเข้าทำลายมะม่วงของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรกโนส

ทำการสกัด crude protein จากเชื้อรา *C. gleosporioides* ตามวิธีการที่ดัดแปลงมาจาก Jitareerat และคณะ (1991) โดยทำการแยกเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรกโนสจากผลมะม่วงให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ก่อนนำมาเลี้ยงในอาหาร PDB (Potato Dextrose Broth) ที่ตั้งอยู่บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง นานเป็นเวลา 5-7 วัน และนำมาตกตะกอนเส้นใยด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง แยกเก็บส่วนที่เป็นเส้นใยและน้ำใส ส่วนที่เป็นน้ำใส หรือ Extracellular enzymes เก็บใส่หลอดเพื่อให้ในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ ส่วนเส้นใยที่ได้นำมาบดด้วยทรายและไนโตรเจนเหลว เติมสารละลาย 0.05 M Tris-HCl pH 7.5 และนำมาปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเอาส่วนเศษซากเชื้อราออกและเก็บส่วนน้ำใส หรือ Intracellular enzymes มาไว้ใช้ในการตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเข้าทำลายพืชดังต่อไปนี้

- Pectate lyase โดยวิธีของ Ried และ Collmer (1985)
- Cellulase โดยวิธีของ Chatterjee และคณะ (1995)

- Polygalacturonase โดยวิธีของ Chatterjee และคณะ (1995)
- Protease โดยวิธีของ Chatterjee และคณะ (1995)

3. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคแอนแทรกโนสของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ในระหว่างการเกิดโรค

นำผลมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ที่สุกแก่เต็มที่และไม่มีร่องรอยของโรคและแมลงมาล้างทำความสะอาดและผึ่งให้แห้ง และทำแผลบนกลางผลมะม่วงโดยใช้เข็มแทงลึกประมาณ 2 มิลลิเมตร จากนั้นทำการปลูกด้วยเส้นใย (mycelium disc) ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่เจาะด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร บนกลางผลมะม่วง จากนั้นทำการตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์หลังการปลูกเชื้อราในชั่วโมงที่ 0,12, 24, 36 และ 48 โดยกิจกรรมของเอนไซม์หลังการปลูกเชื้อราที่ตรวจวัดมีดังนี้

- Peroxidase โดยวิธีของ Harrison และคณะ (1995)
- β-1,3-glucanase โดยวิธีของ Hwang และคณะ (1997)
- Chitinase โดยวิธีของ Hwang และคณะ (1997)

สถานที่ทำการทดลอง

สายวิชาเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี วิทยาเขตบางขุนเทียน
แขวงท่าข้าม เขตบางขุนเทียน กรุงเทพ 10150

ผลการทดลอง

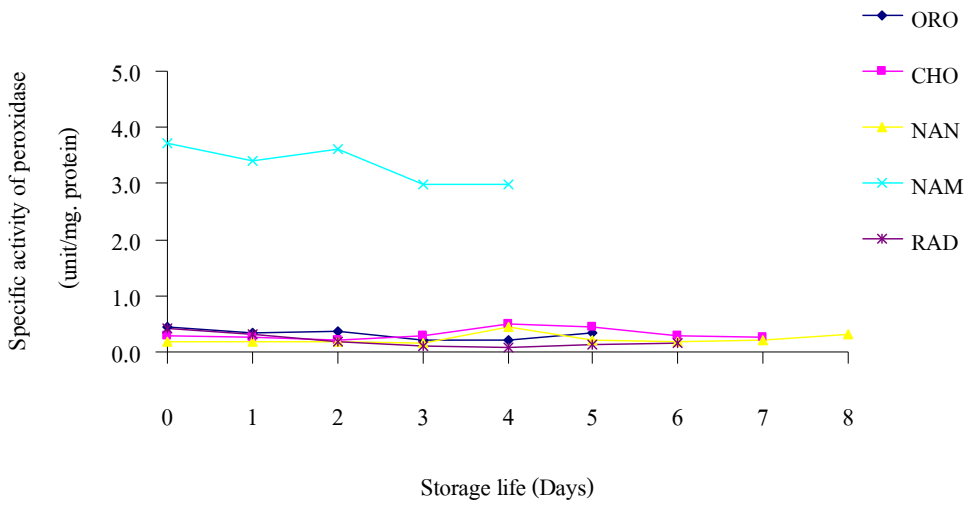
1. การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคในระหว่างกระบวนการสุกของผลมะม่วง

1.1 การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ peroxidase ของมะม่วงในระหว่างกระบวนการสุก

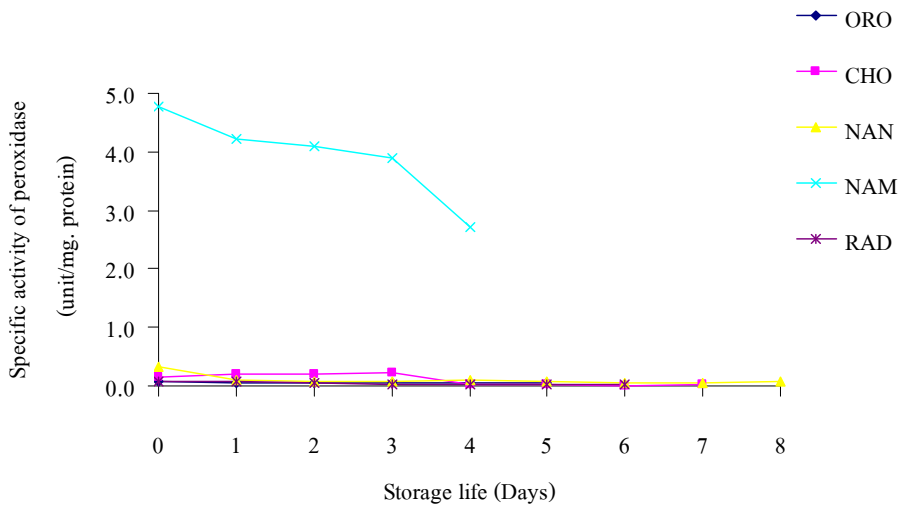
กิจกรรมของเอนไซม์ peroxidase ที่เปลือกและเนื้อของมะม่วงพันธุ์อกร่องโชคอนันต์ หนังกลางวัน น้ำดอกไม้ และแรดภายหลังการเก็บเกี่ยว โดยนำมาจุ่มด้วยเอทิฟอนก่อนเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ peroxidase ทั้งในเนื้อและเปลือกของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้สูงกว่ามะม่วงทุกสายพันธุ์อย่างเด่นชัดตลอดอายุการเก็บรักษา โดยกิจกรรมของ peroxidase ในมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้สูงกว่าพันธุ์อื่นๆ ถึง 100 เท่า นอกจากนี้ยังพบว่าที่ส่วนเนื้อของมะม่วงมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่าส่วนเปลือกของมะม่วงเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์ peroxidase ของมะม่วงอกร่อง โชคอนันต์ หนังกลางวัน และแรด ทั้งที่เปลือกและเนื้อพบว่าอยู่ในช่วงระหว่าง 0.01-0.31 unit/mg protein ซึ่งแต่ละสายพันธุ์ไม่มีความแตกต่างกันมากนัก แต่กิจกรรมของ peroxidase ในทุกสายพันธุ์มีแนวโน้มลดลงตลอดอายุการเก็บรักษา (รูปที่ 1A และ 1B)

ส่วนมะม่วงที่เก็บเกี่ยวมาแล้วไม่ได้จุ่มเอทิฟอนก่อนการเก็บรักษา พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ peroxidase ในส่วนเปลือกและเนื้อของมะม่วงมีความคล้ายคลึงกับมะม่วงที่จุ่มเอทิฟอนก่อนการเก็บรักษา (รูปที่ 2A และ 2B) ยกเว้นส่วนเปลือกของมะม่วงพันธุ์แรดและหนังกลางวันมีกิจกรรมของ peroxidase สูงมากกว่ามะม่วงทุกสายพันธุ์ โดยเฉพาะในช่วง 2 วันแรกของการเก็บรักษา พบว่าพันธุ์แรดมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุด คือมีค่าเท่ากับ 27.83 unit/mg protein รองลงมาคือ พันธุ์หนังกลางวันมีค่าเท่ากับ 18.87 unit/mg protein (รูปที่ 2A) นอกจากนี้พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ peroxidase ในเปลือกของมะม่วงทั้งสองพันธุ์ที่ไม่ได้จุ่มเอทิฟอนนี้ มีค่าสูงกว่าผลที่จุ่มเอทิฟอนก่อนการเก็บรักษา ประมาณ 11.25 เท่า (รูปที่ 1A และ 2A)

A

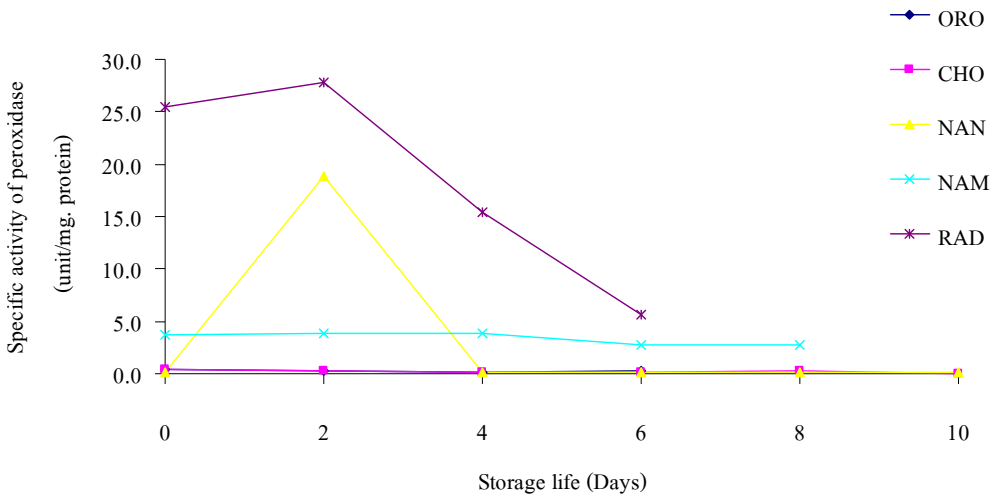


B

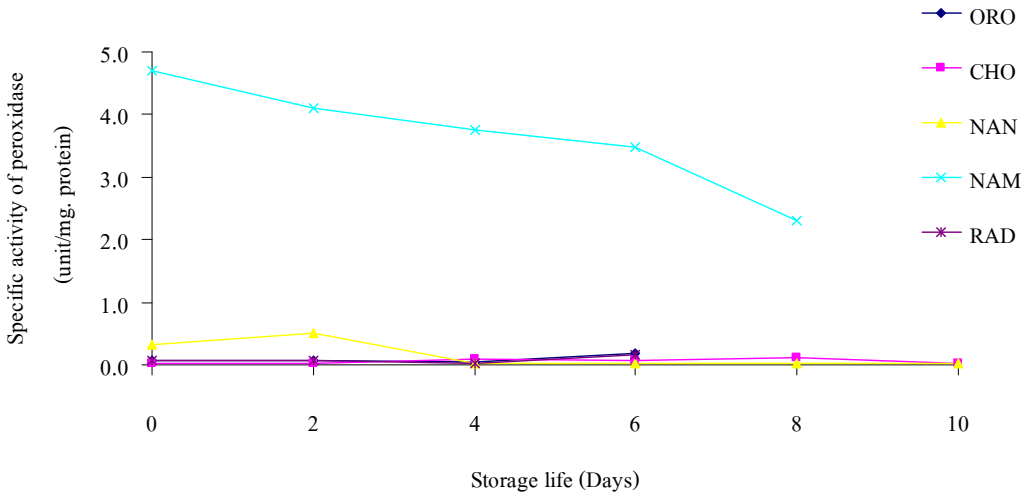


รูปที่ 1 กิจกรรมของเอนไซม์ Peroxidase ที่เปลือก (A) และเนื้อ (B) ของมะม่วงพันธุ์อกร่อง (ORO), โชคอนันต์ (CHO), หนังกลางวัน (NAN), น้ำดอกไม้ (NAM), และ แรด (RAD) ที่จุ่มเอทิฟอนและเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

A



B



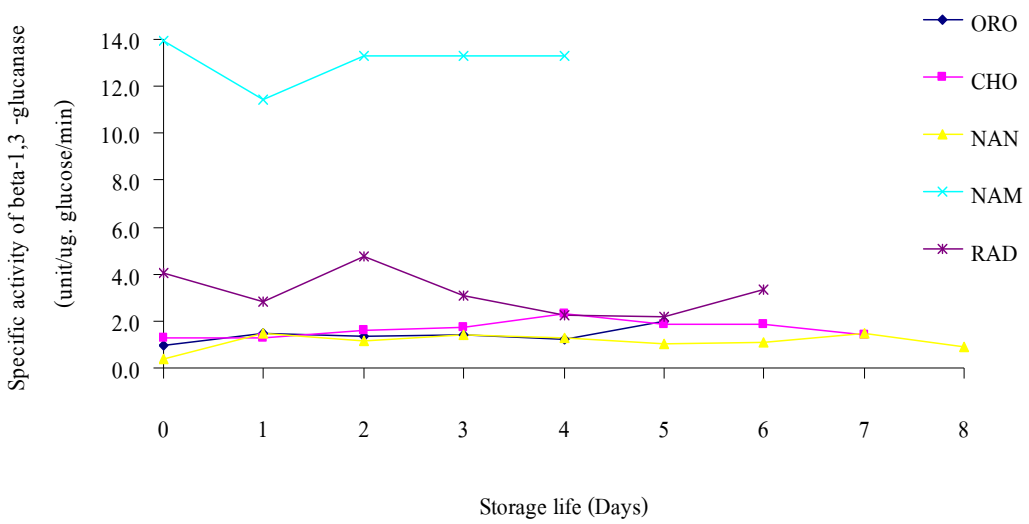
รูปที่ 2 กิจกรรมของเอนไซม์ Peroxidase ที่เปลือก (A) และเนื้อ (B) ของมะม่วงอกร่อง (ORO), โชคอนันต์ (CHO), หนังกลางวัน (NAN), น้ำดอกไม้ (NAM), และ แรด (RAD) ที่ไม่จุ่มเอทิฟอน และเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

1.2 การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ β-1,3-glucanase ของมะม่วงในระหว่างกระบวนการสุก

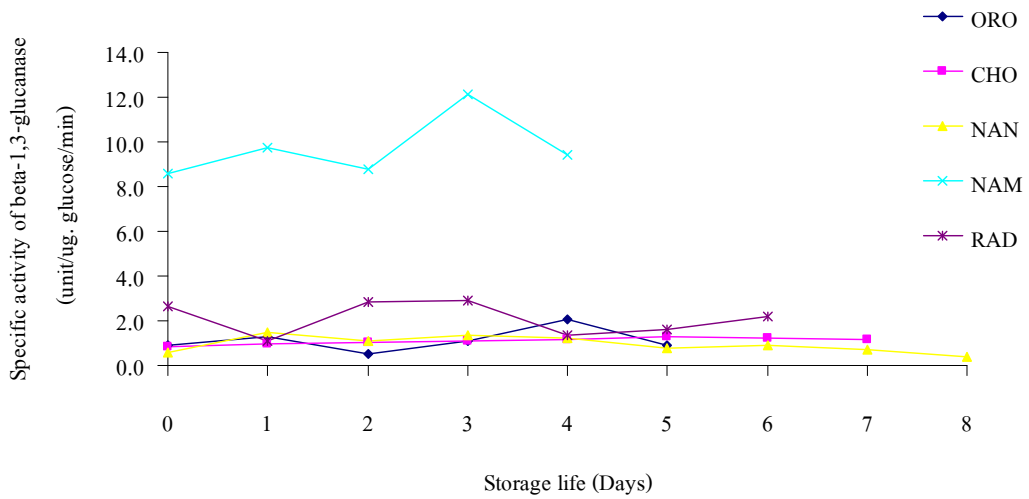
กิจกรรมของเอนไซม์ β-1,3-glucanase ที่เปลือกและเนื้อของมะม่วงพันธุ์อกร่อง โชคอนันต์ หนังกลางวัน น้ำดอกไม้ และแรด ภายหลังการเก็บเกี่ยวที่จุ่มเอทิฟอนก่อนการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ β -1,3-glucanase ในทุกสายพันธุ์มีแนวโน้มลดลงเพียงเล็กน้อยตลอดอายุการเก็บรักษา (รูปที่ 3A และ 3B) กิจกรรมของ β-1,3-glucanase ที่เปลือกและเนื้อของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้สูงกว่ามะม่วงสายพันธุ์อื่นๆ ประมาณ 3-14 เท่า คือที่เปลือกมีกิจกรรมสูงในช่วง 11.35-13.90 unit/μg glucose/min และที่ส่วนเนื้อมีกิจกรรมในช่วง 8.58-12.15 unit/μg glucose/min ในขณะที่สายพันธุ์อื่นจะมีกิจกรรมของเอนไซม์ที่เปลือกและเนื้ออยู่ในช่วง 0.3-4.7 unit/μg glucose/min และพบว่ากิจกรรมของ β -1,3-glucanase ที่เปลือกของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้มีมากกว่าที่เนื้อเพียงเล็กน้อย มะม่วงพันธุ์แรดเป็นมะม่วงที่มีกิจกรรมของ β-1,3-glucanase ที่บริเวณเปลือกและเนื้อสูงเป็นอันดับที่สองรองจากมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ ในขณะที่กิจกรรมของเอนไซม์ β -1,3-glucanase ของมะม่วงพันธุ์อกร่อง โชคอนันต์ และหนังกลางวัน ทั้งในส่วนเปลือกและเนื้อนั้นไม่มีความแตกต่างกันมากนักตลอดอายุการเก็บรักษา

ส่วนมะม่วงที่ไม่จุ่มเอทิฟอน พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ β -1,3-glucanase คล้ายคลึงกับมะม่วงที่จุ่มเอทิฟอน คือ กิจกรรมของเอนไซม์ในพันธุ์น้ำดอกไม้มีสูงมากกว่าพันธุ์อื่นๆ ที่ทดสอบ คือ ที่เปลือกอยู่ในช่วงระหว่าง 11.5-15.6 unit/μg glucose/min และที่เนื้อมีอยู่ในช่วง 8.3-10.8 unit/μg glucose/min (รูปที่ 4A และ 4B) และเมื่อพิจารณาผลของการจุ่มและไม่จุ่มเอทิฟอนต่อกิจกรรมของเอนไซม์ β-1,3-glucanase พบว่าการจุ่มเอทิฟอนไม่มีผลต่อการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของกิจกรรมของเอนไซม์ β-1,3-glucanase ทั้งที่เปลือกและเนื้อของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ อกร่อง โชคอนันต์ และแรดมากนัก คือค่อนข้างคงที่ตลอดอายุการเก็บรักษา ยกเว้นพันธุ์หนังกลางวัน ซึ่งพบว่าการจุ่มเอทิฟอนมีผลกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ชนิดนี้ให้สูงขึ้นอย่างเด่นชัด (รูปที่ 3A)

A

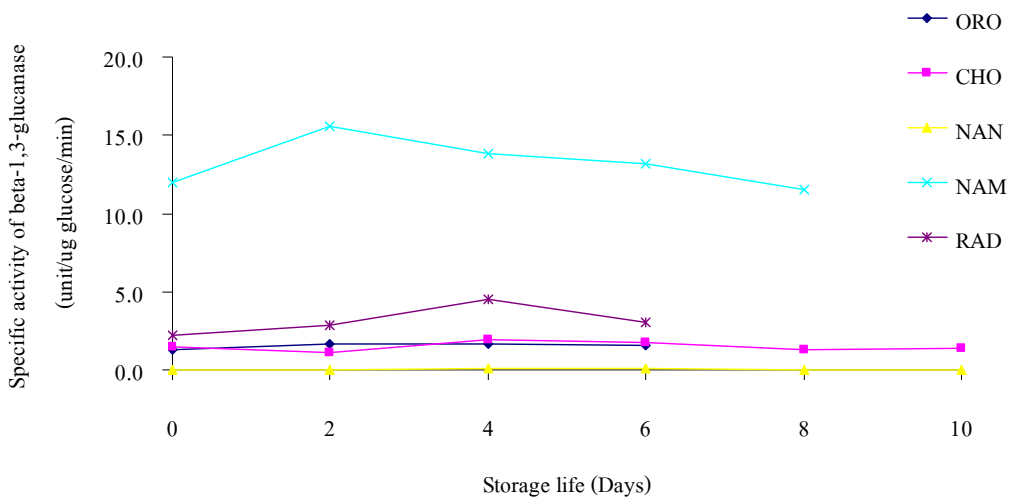


B

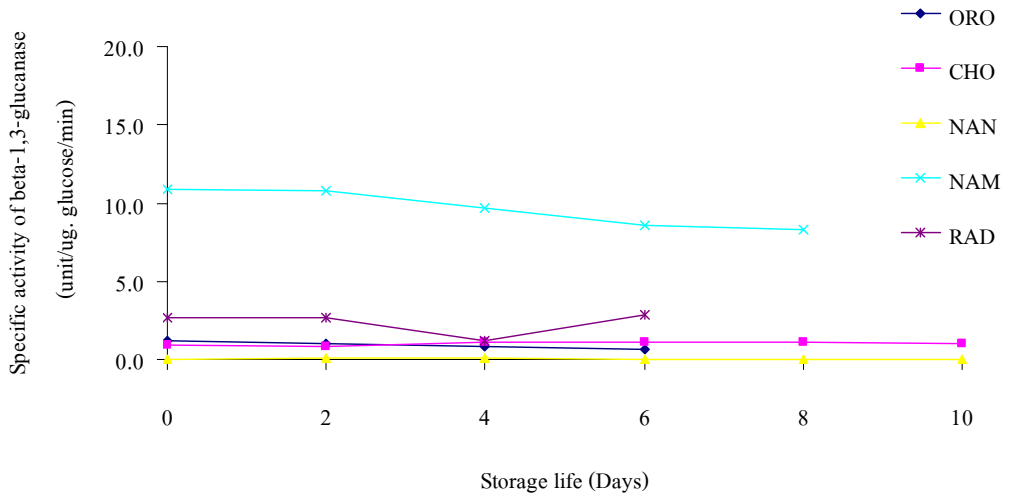


รูปที่ 3 กิจกรรมของเอนไซม์ β-1,3-glucanase ที่เปลือก (A) และเนื้อ (B) ของมะม่วงอกร่อง (ORO), โชคอนันต์ (CHO), หนังกลางวัน (NAN), น้ำดอกไม้ (NAM), และ แรด (RAD) ที่จุ่มเอทิฟอนและเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

A



B



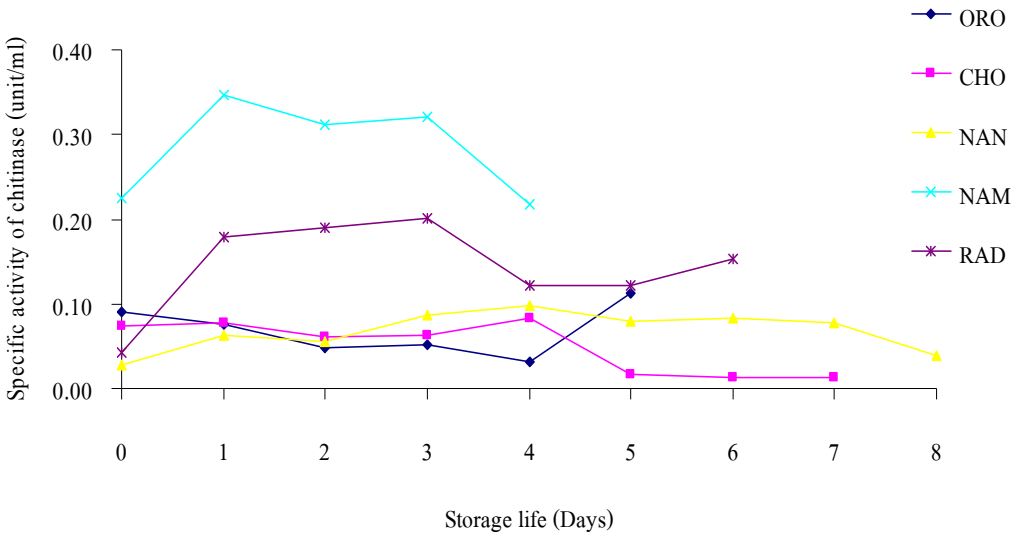
รูปที่ 4 กิจกรรมของเอนไซม์ β -1,3-glucanase ที่เปลือก (A) และเนื้อ (B) ของมะม่วงอกร่อง (ORO), โชคอนันต์ (CHO), หนังกลางวัน (NAN), น้ำดอกไม้ (NAM), และ แรด (RAD) ที่ไม่จุ่มเอทิฟอน และเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

1.3 การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ chitinase ของมะม่วงในระหว่างกระบวนการสุก

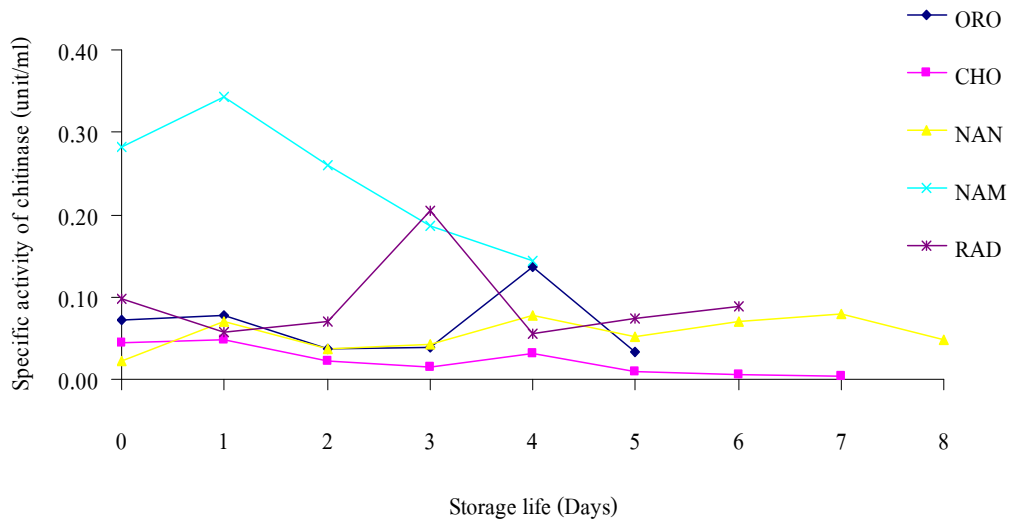
กิจกรรมของเอนไซม์ chitinase ที่เปลือกและเนื้อของมะม่วงพันธุ์อกร่อง โชคอนันต์ หนังกลางวัน น้ำดอกไม้ และแรด ภายหลังการเก็บเกี่ยวที่จุ่มเอทิฟอนและเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ chitinase ในมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้สูงที่สุดและสูงกว่ามะม่วงทุกสายพันธุ์อย่างเด่นชัด และกิจกรรมของ chitinase ที่เปลือกและเนื้อของมะม่วงมีค่าใกล้เคียงกัน คือ ในส่วนเปลือกจะอยู่ในช่วง 0.21-0.34 unit/ml และส่วนเนื้อจะอยู่ในช่วง 0.14-0.34 unit/ml โดยเอนไซม์จะเพิ่มสูงขึ้นในช่วงแรกและลดลงในช่วงหลังของการเก็บรักษา มะม่วงพันธุ์แรดมีกิจกรรรมของเอนไซม์มากเป็นอันดับที่ 2 รองจากพันธุ์น้ำดอกไม้ โดยมีกิจกรรมอยู่ในช่วง 0.04-0.20 unit/ml และพบว่าเอนไซม์ที่เปลือกและเนื้อเพิ่มสูงขึ้นและสูงสุดใน 3 วัน ก่อนจะลดลงและเพิ่มสูงขึ้นอีกครั้งในช่วงสุดท้ายของการเก็บรักษา ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์ chitinase ของมะม่วงพันธุ์อกร่อง โชคอนันต์ และหนังกลางวัน ทั้งที่เปลือกและเนื้อไม่มีความแตกต่างกันมากนัก (รูปที่ 5A และ 5B)

มะม่วงที่ไม่จุ่มเอทิฟอนก่อนเก็บรักษา พบว่าที่เปลือกของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้มีกิจกรรมของเอนไซม์ chitinase สูงที่สุดและสูงกว่าพันธุ์อื่นๆ คือในวันแรกหลังการเก็บเกี่ยวมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้มีกิจกรรมของ chitinase เท่ากับ 0.26 unit/ml ต่อมาจะลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 6 วันแรก และค่อยๆ ลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึงวันสุดท้ายของการเก็บรักษา (8 วัน) ส่วนกิจกรรมของ chitinase ที่เปลือกของมะม่วงพันธุ์อกร่องค่อนข้างสูงปานกลาง (0.12 unit/ml) และต่อมาจะคงที่ตลอดอายุการเก็บรักษา มะม่วงพันธุ์แรดมีกิจกรรมของ chitinase ต่ำในวันแรกของการเก็บรักษา จากนั้นจะค่อยๆ สูงขึ้นและสูงที่สุดในวันที่ 4 ก่อนจะลดลงเล็กน้อยในวันที่ 6 ของการเก็บรักษา ส่วนพันธุ์โชคอนันต์มีกิจกรรมของเอนไซม์เริ่มต้นเพียง 0.07 unit/ml และลดลงเรื่อยๆ จนกระทั่งหมดอายุการเก็บรักษา ในขณะที่พันธุ์หนังกลางวันมีกิจกรรมของเอนไซม์ chitinase ต่ำที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์อื่นๆ ที่ทดสอบ และไม่มีการเปลี่ยนแปลงตลอดอายุการเก็บรักษา คือประมาณ 0.02 unit/ml (รูปที่ 6A) การตรวจสอบกิจกรรมของ chitinase ที่เนื้อของมะม่วง พบว่ามะม่วงส่วนใหญ่ที่ทดสอบมีกิจกรรมของเอนไซม์ที่เนื้อมีน้อยกว่าที่เปลือก โดยที่เนื้อของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้มีกิจกรรมของเอนไซม์ประมาณ 0.15 unit/ml ในวันแรกและค่อยๆลดลงจนถึง 0.07 unit/ml ในวันที่ 8 ของการเก็บรักษา เช่นเดียวกับพันธุ์อกร่อง ซึ่งจะพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์จะสูงในวันแรกและค่อยๆ ลดลงเมื่อมะม่วงเข้าสู่กระบวนการชราภาพ ส่วนพันธุ์แรด พบว่ากิจกรรม chitinase ในวันเริ่มต้นมีค่อนข้างสูง (0.11 unit/ml) ต่อมาจะลดลงวันที่ 4 (0.05 unit/ml) และเพิ่มอีกครั้งหลังจากนั้นจนถึงวันสุดท้ายของการเก็บรักษา (0.12 unit/ml) อย่างไรก็ตามพบว่าพันธุ์โชคอนันต์เป็นพันธุ์ที่มีกิจกรรมของ chitinase ต่ำที่สุดตลอดการทดลอง ในขณะที่พันธุ์หนังกลางวันมีกิจกรรมต่ำในช่วงแรกแล้วค่อยๆ สูงขึ้น จนสูงที่สุดในวันที่ 8 ก่อนจะลดลงในวันที่ 10 (รูปที่ 6B)

A

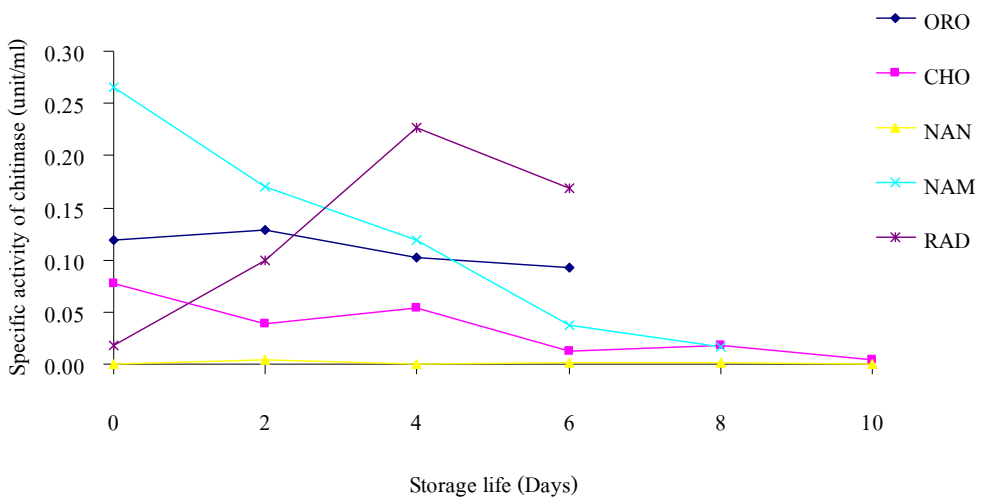


B

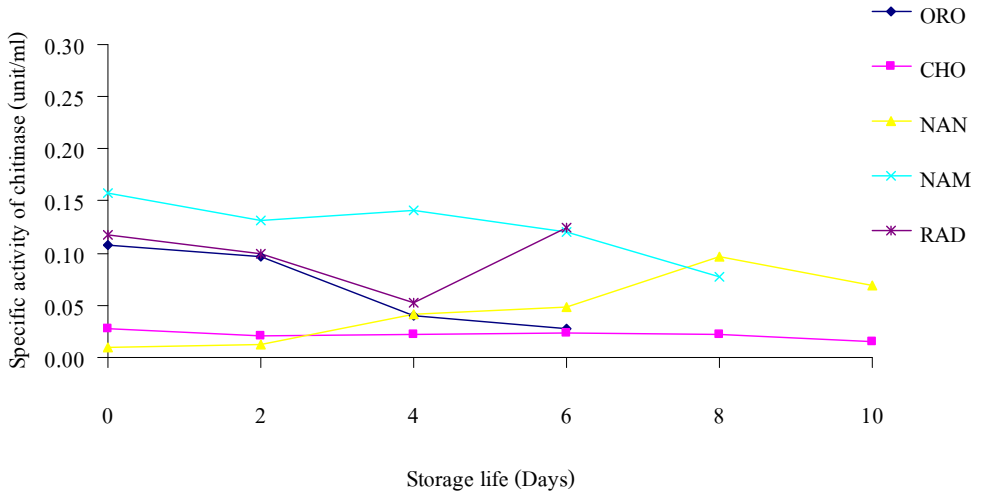


รูปที่ 5 กิจกรรมของเอนไซม์ Chitinase ที่เปลือก (A) และเนื้อ (B) ของมะม่วงอกร่อง (ORO), โชคอนันต์ (CHO), หนังกลางวัน (NAN), น้ำดอกไม้ (NAM), และ แรด (RAD) ที่จุ่มเอทิฟอนและเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

A



B



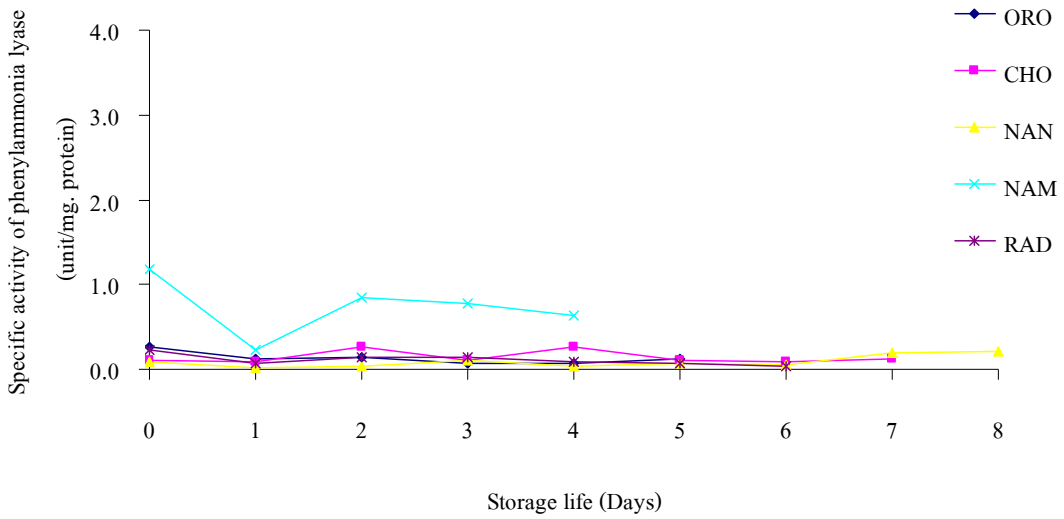
รูปที่ 6 กิจกรรมของเอนไซม์ chitinase ที่เปลือก (A) และเนื้อ (B) ของมะม่วงอกร่อง (ORO), โชคอนันต์ (CHO), หนังกลางวัน (NAN), น้ำดอกไม้ (NAM), และ แรด (RAD) ที่ไม่จุ่มเอทิฟอนและเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

1.4 การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ phenylammonia lyase (PAL) ของมะม่วงในระหว่างกระบวนการสุก

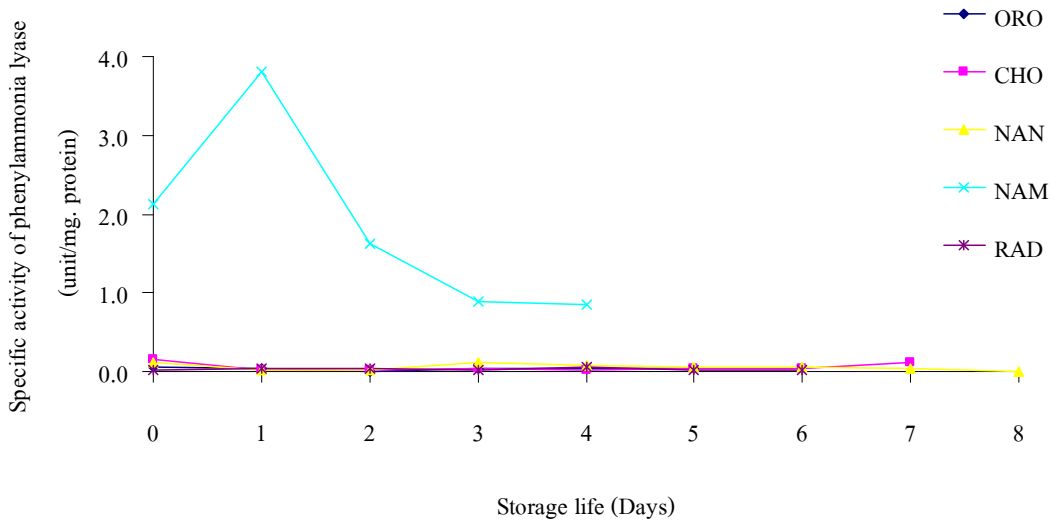
กิจกรรมของเอนไซม์ PAL ของมะม่วงพันธุ์อกร่อง โชคอนันต์ หนังกลางวัน น้ำดอกไม้ และแรด ภายหลังการเก็บเกี่ยวที่จุ่มเอทิฟอนก่อนการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ PAL ที่เปลือกของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้สูงกว่ามะม่วงทุกสายพันธุ์ตั้งแต่เก็บเกี่ยวมาจนกระทั่งหมดอายุการเก็บรักษา ยกเว้นวันที่ 1 ของการเก็บรักษาที่พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ PAL ลดลงอย่างมากก่อนจะสูงขึ้นอีกครั้ง และพบว่าในพันธุ์น้ำดอกไม้ที่ส่วนเนื้อมีกิจกรรม PAL มากกว่าส่วนเปลือกของมะม่วงประมาณ 1.5-3 เท่า โดยในวันเริ่มต้นมีค่าเท่ากับ 2.1 unit/mg. protein และต่อมาจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อเก็บรักษานาน 1 วัน ซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุดเท่ากับ 3.8 unit/mg. protein จากนั้นจะลดลงอย่างรวดเร็วและคงที่ในช่วงท้ายของการเก็บรักษา ส่วนเอนไซม์ PAL ที่เนื้อของมะม่วงในพันธุ์อกร่อง โชคอนันต์ หนังกลางวัน และแรดไม่มีความแตกต่างกัน คือกิจกรรมของเอนไซม์มีแนวโน้มคงที่ตลอดอายุการเก็บรักษา (รูปที่ 7A และ 7B)

ส่วนมะม่วงที่ไม่จุ่มเอทิฟอนก่อนการเก็บรักษา พบว่า กิจกรรม PAL ที่เปลือกของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ที่ไม่จุ่มเอทิฟอนคล้ายกับมะม่วงที่จุ่มด้วยเอทิฟอน โดยมีกิจกรรม PAL จะเริ่มต้นที่ 0.8 unit/mg. protein จากนั้นจะลดลงตลอดอายุการเก็บรักษา ส่วนมะม่วงพันธุ์อื่นๆ จะมีกิจกรรม PAL ค่อนข้างต่ำ และไม่ค่อยมีความแตกต่างกันมากนัก ยกเว้นพันธุ์โชคอนันต์ ซึ่งกิจกรรม PAL จะเพิ่มสูงอย่างมากในวันที่ 6 ของอายุการเก็บรักษาก่อนจะลดลงในวันถัดมา (รูปที่ 8A) กิจกรรม PAL ที่เนื้อของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้สูงมากกว่าพันธุ์อื่นๆ ตั้งแต่เก็บเกี่ยวมาจากต้น คือมีค่าประมาณ 0.6 unit/mg. protein และจะสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องและรวดเร็วจนกระทั่งถึงวันที่ 6 ซึ่งมีกิจกรรมสูงที่สุดเท่ากับ 1.8 unit/mg. protein ต่อมาจะค่อยๆ ลดลง ซึ่งกิจกรรมของ PAL ของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้จะมีสูงกว่าพันธุ์อื่นๆ ประมาณ 2-8 เท่า ขณะที่พันธุ์อื่นๆ มีกิจกรรมของ PAL ใกล้เคียงกันตลอดอายุการเก็บรักษา คือประมาณ 0.006-1.074 unit/mg. protein (รูปที่ 8B)

A

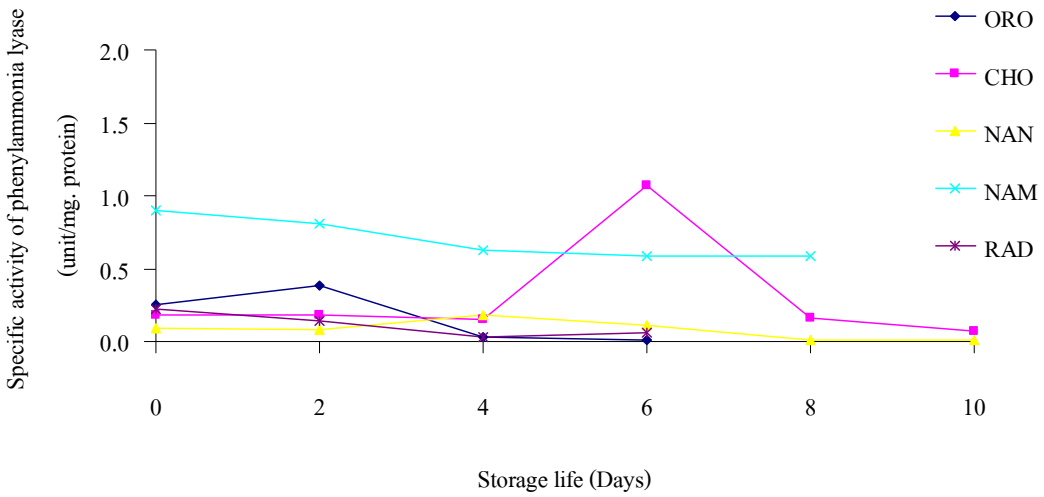


B

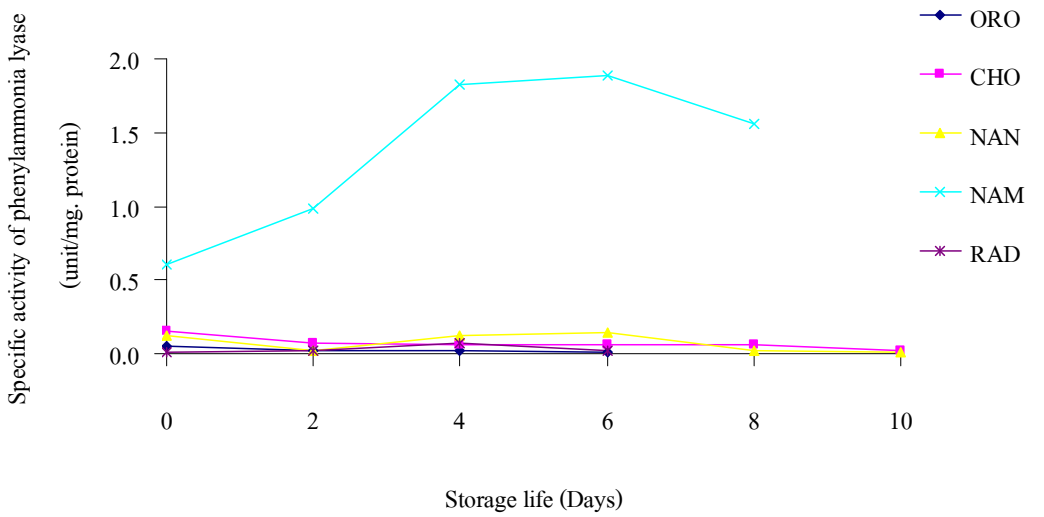


รูปที่ 7 กิจกรรมของเอนไซม์ phenylammonia lyase ที่เปลือก (A) และเนื้อ (B) ของมะม่วงอกร่อง (ORO), โชคอนันต์ (CHO), หนังกลางวัน (NAN), น้ำดอกไม้ (NAM), และ แรด (RAD) ที่จุ่มเอทิฟอนและเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

A



B



รูปที่ 8 กิจกรรมของเอนไซม์ phenylammonia lyase ที่เปลือก (A) และเนื้อ (B) ของมะม่วงอกร่อง (ORO), โชคอนันต์ (CHO), หนังกลางวัน (NAN), น้ำดอกไม้ (NAM), และ แรด (RAD) ที่ไม่จุ่มเอทิฟอนและเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

2. กิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเข้าทำลายมะม่วงของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรกโนส

กิจกรรมของเอนไซม์ pectate lyase, polygalacturonase, cellulase และ protease ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่ตรวจสอบในหลอดทดลอง พบว่า การเกิดกิจกรรมของเอนไซม์แต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน โดยที่กิจกรรมของเอนไซม์ polygalacturonase จะเกิดสูงถึง 3.93 OD_{500}/min/mg. protein ซึ่งสูงกว่าเอนไซม์ชนิดอื่นหลายเท่าตัว รองลงมาคือเอนไซม์ pectate lyase เกิดกิจกรรมต่ำ 0.53 OD_{235}/min/mg. protein ส่วนเอนไซม์ cellulase พบว่ามีกิจกรรมต่ำเพียง 0.23 OD_{500}/min/mg. protein และเอนไซม์ protease มีกิจกรรมต่ำสุดเพียง 0.0017 OD_{280}/min/mg. protein (ตารางที่ 1)

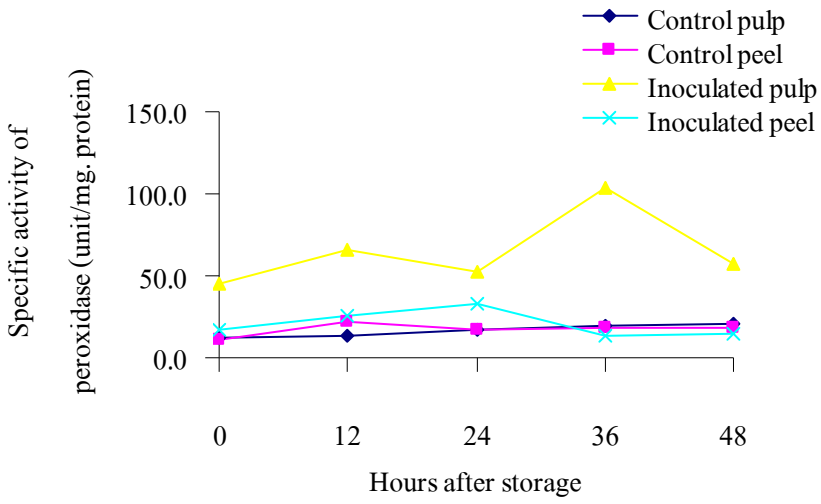
ตารางที่ 1 กิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเข้าทำลายมะม่วงของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรกโนส

Enzyme	Specific activity of enzyme
Pectate lyase	0.5358 OD_{235}/min/mg. protein
Polygalacturonase	3.9397 OD_{500}/min/mg. protein
Cellulase	0.2324 OD_{500}/min/mg. protein
Protease	0.0017 OD_{280}/min/mg. protein

3. การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคแอนแทรกโนสของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ในระหว่างการเกิดโรค

3.1 การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ peroxidase ของมะม่วงที่ถูกเชื้อ *C. gloeosporioides* เข้าทำลาย

จากการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ peroxidase ในมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ที่ปลูกเชื้อรา *C. gloeosporioides* เปรียบเทียบกับมะม่วงที่ไม่ปลูกเชื้อที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 0, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ peroxidase ทั้งที่เปลือกและเนื้อของมะม่วงน้ำดอกไม้ที่ปลูกเชื้อรามีสูงมากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งในส่วนเนื้อของมะม่วงพบกิจกรรมของเอนไซม์ peroxidase สูงที่สุดในชั่วโมงที่ 36 หลังจากการปลูกเชื้อรา คือมีค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 103.2 unit/mg. protein แตกต่างจากมะม่วงที่ไม่ปลูกเชื้อซึ่งมีกิจกรรมเท่ากับ 19.1 unit/mg. protein (รูปที่ 9) โดยที่ลักษณะการเพิ่มขึ้นของกิจกรรมจะเพิ่มขึ้นหลังจากปลูกเชื้อทั้งในส่วนเปลือกและเนื้อของมะม่วง กิจกรรมของเอนไซม์ peroxidase ในส่วนเปลือก พบสูงมากที่สุดหลังการปลูกเชื้อได้ 24 ชั่วโมง (มีค่าเท่ากับ 32.4 unit/mg. protein) และค่อยๆ ลดลงในเวลาต่อมา เมื่อเปรียบเทียบกับกิจกรรมของเอนไซม์ peroxidase ในมะม่วงที่ไม่ปลูกเชื้อกับมะม่วงที่ปลูกเชื้อ พบว่ามะม่วงที่ไม่ได้ปลูกเชื้อมีกิจกรรมของเอนไซม์ peroxidase ค่อนข้างคงที่ตลอดระยะการเก็บรักษา (48 ชั่วโมง)

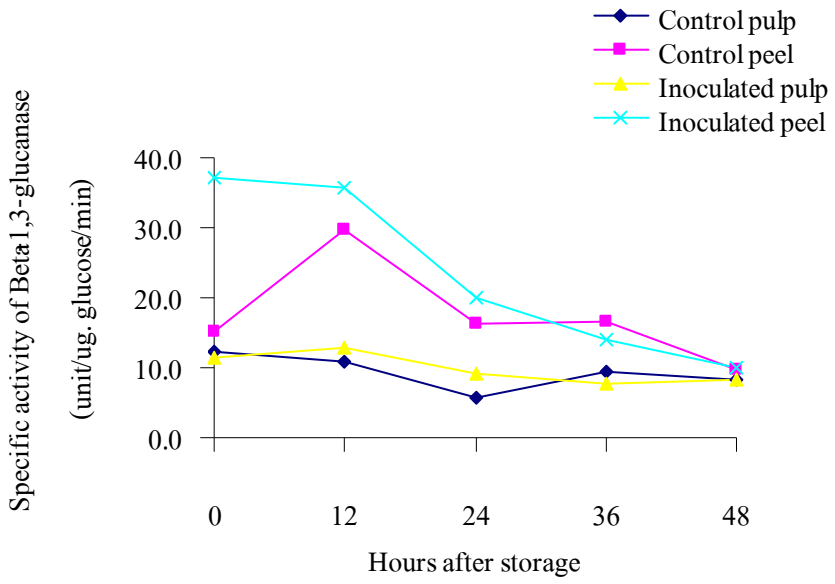


รูปที่ 9 กิจกรรมของเอนไซม์ peroxidase ของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ที่ปลูกเชื้อรา *C. gloeosporioides* นานเป็นเวลา 0, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง

3.2 การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ β -1,3-glucanase ของมะม่วงที่ถูกเชื้อ *C. gloeosporioides* เข้าทำลาย

จากการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ β -1,3-glucanase ในมะม่วงน้ำดอกไม้ที่ปลูกเชื้อรา *C. gloeosporioides* เปรียบเทียบกับมะม่วงที่ไม่ปลูกเชื้อราเป็นเวลา 0, 12, 24, 36, และ 48 ชั่วโมง พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ β-1,3-glucanase มีที่เปลือกของมะม่วงมากกว่าที่เนื้อของมะม่วงทั้งที่ปลูกและไม่ปลูกเชื้อรา โดยเฉพาะช่วงแรกของการเก็บรักษาได้ แต่หลังจาก 48 ชั่วโมงกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งที่เปลือกและเนื้อไม่มีความแตกต่างกัน การปลูกเชื้อที่ผลมะม่วงมีผลกระตุ้นกิจกรรมของ β-1,3-glucanase ที่เปลือกให้สูงขึ้นอย่างมากหลังการปลูกเชื้อทันที (0 ชั่วโมง) จนถึงชั่วโมงที่ 12 ก่อนจะลดลงอย่างรวดเร็ว จนมีกิจกรรมเท่ากับมะม่วงที่ไม่ได้ปลูกเชื้อในช่วงชั่วโมงที่ 24 ขณะที่ β-1,3-glucanase ในส่วนเนื้อมะม่วงจะถูกกระตุ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้น

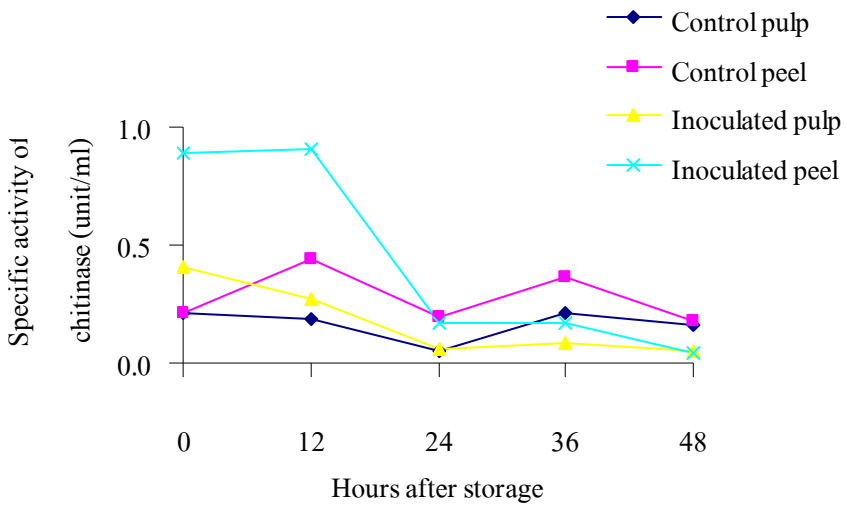
ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์ β-1,3-glucanase ในเนื้อของมะม่วงที่ไม่ปลูกเชื้อ พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ค่อนข้างต่ำและมีแนวโน้มลดลงตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา จากการทดลองแสดงให้เห็นว่า ทันทีมะม่วงที่ถูกเชื้อเข้าทำลาย มะม่วงจะมีการตอบสนองโดยการสร้างเอนไซม์ β-1,3-glucanase ที่เปลือกเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเพื่อต่อต้านการเข้าทำลายของเชื้อได้เพียงระยะเวลาสั้นๆ เท่านั้น (รูปที่ 10)



รูปที่ 10 กิจกรรมของเอนไซม์ β-1,3-glucanase ของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ที่ปลูกเชื้อรา *C. gloeosporioides* นานเป็นเวลา 0, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง

3.3 การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ Chitinase ของมะม่วงที่ถูกเชื้อ *C. gloeosporioides* เข้าทำลาย

กิจกรรมของเอนไซม์ chitinase ในมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ที่ปลูกเชื้อ *C. gloeosporioides* เปรียบเทียบกับมะม่วงที่ไม่ปลูกเชื้อ พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ chitinase ที่เปลือกของมะม่วงที่ปลูกเชื้อรามีสูงมากทันทีหลังที่ปลูกเชื้อ ชั่วโมงที่ 0 มีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 0.89 unit/ml โดยสูงมากเป็น 2 เท่าของมะม่วงที่ไม่ได้ปลูกเชื้อ (0.44 unit/ml) และยังคงสูงจนกระทั่งเวลาผ่านไป 12 ชั่วโมงก่อนจะลดลงอย่างรวดเร็วจนมีกิจกรรมน้อยกว่ากับมะม่วงที่ไม่ได้ปลูกเชื้อ (0.17 unit/ml) ส่วนกิจกรรมของ chitinase ที่เนื้อของมะม่วงที่ปลูกเชื้อไม่มีความแตกต่างจากมะม่วงที่ไม่ได้ปลูกเชื้อ แสดงว่า การปลูกเชื้อมีผลกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ chitinase ที่เปลือกของมะม่วงได้นานเพียง 12 ชั่วโมงเท่านั้น (รูปที่ 11)



รูปที่ 11 กิจกรรมของเอนไซม์ chitinase ของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ที่ปลูกเชื้อรา *C. gloeosporioides* นานเป็นเวลา 0, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

1. การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคในระหว่างกระบวนการสุกของผลมะม่วง

จากการศึกษาถึงเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคพืชที่เปลือกและเนื้อของมะม่วงพันธุ์ต่างๆ ในระหว่างกระบวนการสุก ได้แก่ peroxidase, β-1,3-glucanase, chitinase และ PAL โดยแบ่งมะม่วงเป็น 2 ส่วน คือ มะม่วงที่จุ่มเอทิฟอนและไม่จุ่มเอทิฟอนก่อนเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งได้ผลการวิจัยดังต่อไปนี้

มะม่วงที่ไม่ได้จุ่มเอทิฟอนก่อนการเก็บรักษา พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ β-1,3-glucanase, chitinase และ PAL ทั้งที่เปลือกและเนื้อของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้สูงกว่ามะม่วงทุกสายพันธุ์อย่างเด่นชัดตลอดอายุการเก็บรักษา รวมถึงกิจกรรม peroxidase ที่เนื้อของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้มีสูงกว่าพันธุ์อื่นๆ ด้วย ยกเว้นกิจกรรมของ peroxidase ที่ส่วนเปลือกของมะม่วงจะมีปานกลาง โดยพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ peroxidase ที่เปลือกของมะม่วงพันธุ์แรดนั้นมีสูงที่สุด จากการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิดนี้ในมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ ทำให้ทราบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคพืชในมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้นั้นมีสูงมาก ดังนั้นมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ก็ควรมีความต้านทานต่อการเกิดโรคได้สูงเช่นกัน ซึ่งผลการทดลองนี้แตกต่างจากรายงานที่ผ่านมาของ Sangchote (1998) พบว่ามะม่วงพันธุ์ดอกไม้เป็นพันธุ์ที่อ่อนแอต่อการเกิดโรคแอนแทรกโนสมากที่สุดเมื่อทำการทดสอบเปรียบเทียบกับมะม่วงสายพันธุ์อกร่อง แก้ว และทองดำ โดยการปลูกเชื้อรา *C. gloeosporioides* ลงบนผลมะม่วงเหล่านี้ อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ว่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคในมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้จะสูงกว่าสายพันธุ์อื่นหลายเท่าในช่วงแรกของการเก็บรักษาก็ตาม แต่หลังจากนั้นกิจกรรมของเอนไซม์เหล่านี้ ก็จะลดลงอย่างรวดเร็วจนมีค่ากิจกรรมใกล้เคียงกับมะม่วงพันธุ์อื่นที่ใช้ทดสอบเมื่อผลมะม่วงเริ่มสุกหรือใกล้ชราภาพ ถึงแม้ว่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคในมะม่วงพันธุ์ โชคอนันต์ หนังกลางวัน อกร่อง และแรด จะมีต่ำกว่าในมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ แต่กิจกรรมของเอนไซม์ต่างๆ เหล่านั้นก็ค่อนข้างคงที่ตลอดกระบวนการสุกของผลมะม่วง ดังนั้นการลดลงอย่างรวดเร็วของกิจกรรมเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคในมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้นี้ อาจมีผลทำให้สัดส่วนของความต้านทานโรคลดลงอย่างมากและรวดเร็วเมื่อเทียบกับปริมาณกิจกรรมที่มีเริ่มต้นของเอนไซม์เหล่านั้น จนมีผลทำให้มะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้อ่อนแอต่อการเกิดโรคในระหว่างผลสุกหรือชราภาพ ส่วนมะม่วงพันธุ์โชคอนันต์ หนังกลางวันอกร่อง และแรด มีกิจกรรมของเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิด ค่อนข้างใกล้เคียงกันตลอดอายุการเก็บรักษา โดยพันธุ์แรดจะมีกิจกรรมของเอนไซม์ peroxidase

ที่เปลือกสูงที่สุดในช่วงวันแรกๆ ของการเก็บรักษา และมีกิจกรรมของเอนไซม์ chitinase สูงในช่วงสุดท้ายของการเก็บรักษา แสดงว่า การแสดงออกของ chitinase ในมะม่วงพันธุ์แรดจะเกิดในขณะที่มะม่วงเกิดการชราภาพมากหรือสุกมากขึ้น และเมื่อเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ที่เปลือกและเนื้อของมะม่วง พบว่า ที่เปลือกของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ จะมีกิจกรรมของเอนไซม์ chitinase และ PAL สูงกว่าที่เนื้อ ในทางตรงกันข้ามกิจกรรมของ peroxidase และ β-1,3-glucanase จะพบที่เนื้อมากกว่าที่เปลือก ส่วนมะม่วงพันธุ์อื่นๆ พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิด ทั้งที่เปลือกและเนื้อไม่มีความแตกต่างกันมากนัก ยกเว้นเอนไซม์ peroxidase ที่เปลือกของพันธุ์หนังกลางวัน, chitinase ที่เปลือกของมะม่วงพันธุ์แรด และ PAL ที่เปลือกของมะม่วงพันธุ์โชคอนันต์จะสูงกว่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ตรวจพบในเนื้อของมะม่วง

มะม่วงที่จุ่มเอทิฟอนก่อนการเก็บรักษา พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ peroxidase ทั้งในเนื้อและเปลือกของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้สูงกว่าสายพันธุ์อื่นๆ ถึง 100 เท่า และพบว่าที่ส่วนเนื้อมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่าส่วนเปลือกของมะม่วงเพียงเล็กน้อยเท่านั้น อย่างไรตาม การจุ่มเอทิฟอนไม่มีผลกระตุ้นหรือชะงักกิจกรรมของเอนไซม์ peroxidase ที่เปลือกและเนื้อของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ โชคอนันต์ และอกร่อง ยกเว้นพันธุ์หนังกลางวันและแรดที่มีผลไปชะงักกิจกรรม peroxidase แสดงให้เห็นว่ามะม่วงแต่ละสายพันธุ์ของการตอบสนองต่อเอทิลีนที่แตกต่างกัน และการจุ่มเอทิฟอนมีผลต่ออายุการเก็บรักษาของมะม่วงโดยตรง คือทำให้มะม่วงสุกเร็วขึ้น มะม่วงที่จุ่มเอทิฟอนนั้นจะมีอายุการเก็บรักษาสั้นกว่ามะม่วงที่ไม่จุ่มเอทิฟอน ในมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ที่จุ่มเอทิฟอนจะมีอายุการเก็บรักษาเพียง 4 วัน แต่มะม่วงที่ไม่จุ่มเอทิฟอนจะมีอายุการเก็บรักษานาน 8 วัน มะม่วงพันธุ์โชคอนันต์ที่จุ่มเอทิฟอนมีอายุการเก็บรักษาเพียง 7 วัน แต่มะม่วงที่ไม่จุ่มเอทิฟอนมีอายุการเก็บรักษาถึง 10 วัน ส่วนมะม่วงพันธุ์หนังกลางวัน โชคอนันต์ และแรด การจุ่มเอทิฟอนไม่มีผลต่ออายุการเก็บรักษามากนัก ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์ β -1,3-glucanase ในทุกสายพันธุ์มีแนวโน้มลดลงเพียงเล็กน้อยตลอดอายุการเก็บรักษา กิจกรรมของ β-1,3-glucanase ที่เปลือกและเนื้อของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้สูงกว่ามะม่วงสายพันธุ์อื่นๆ ประมาณ 3-14 เท่า รองลงมาคือพันธุ์แรด ส่วนสายพันธุ์ที่เหลือจะมีกิจกรรมของเอนไซม์ที่ใกล้เคียงกัน และพบว่าการจุ่มเอทิฟอนไม่มีผลต่อการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งที่เปลือกและเนื้อของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ อกร่อง โชคอนันต์ และแรดมากนัก ยกเว้นพันธุ์หนังกลางวัน ซึ่งพบว่าการจุ่มเอทิฟอนมีผลกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ชนิดนี้ให้สูงขึ้น กิจกรรมของเอนไซม์ chitinase พบมากที่สุดในมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ทั้งที่เปลือกและเนื้อ รองลงมาคือพันธุ์แรด โดยในช่วงแรกเอนไซม์จะเพิ่มสูงขึ้นและลดลงในช่วงหลังของการเก็บรักษา ส่วนพันธุ์อื่นๆ ไม่มีความแตกต่างกันมากนัก กิจกรรมของเอนไซม์ PAL ที่เปลือกของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้สูงกว่ามะม่วงทุกสายพันธุ์ และพบว่าที่ส่วนเนื้อมีกิจกรรม PAL มากกว่าส่วนเปลือก ส่วนเอนไซม์ PAL ที่เนื้อของมะม่วงในพันธุ์อกร่อง โชคอนันต์ หนังกลางวัน

และแรดค่อนข้างคงที่ตลอดอายุการเก็บรักษา และผลของการจุ่มเอทิฟอนจะไปกระตุ้นการทำงานของ PAL ที่เนื้อของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ให้สูงขึ้น

2. กิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเข้าทำลายมะม่วงของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรกโนส

กิจกรรมของเอนไซม์ pectate lyase, polygalacturonase, cellulase และ protease ของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ที่ปลดปล่อยออกมาจากเชื้อราที่เลี้ยงในอาหารเหลว พบว่า เชื้อรามีการผลิตเอนไซม์แต่ละชนิดที่เกี่ยวข้องกับการย่อยผนังเซลล์พืชในปริมาณที่แตกต่างกัน โดยที่เชื้อรามีการผลิตเอนไซม์ polygalacturonase ในปริมาณที่สูง และสูงกว่าเอนไซม์ชนิดอื่นหลายเท่าตัว ซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Sarah และคณะ (1999) ที่พบว่าขณะที่เชื้อรา *Colletotrichum lindemuthianum* เข้าทำลายถั่ว เชื้อจะมีการผลิตเอนไซม์ของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการทำลายผนังเซลล์พืช (plant cell wall degrading enzyme) เพิ่มขึ้น เช่น เอนไซม์ endo-polygalacturonases (endo-PG) และ pectin lyase และก่อนหน้านี้ Wijesundera และคณะ (1984, 1989) ได้แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ endo-PG ที่อยู่ในรูปของ pectin lyase, alfa และ β-galactopyranosidase, alfa-arabinofuranosidase และ protease จะมีการปลดปล่อยออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของ polypectate หรือบนผนังเซลล์ของถั่ว (bean cell wall) สูง โดยที่จะตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์ pectin lyase เป็นอันดับแรกหลังจากปลูกเชื้อบนถั่วเป็นเวลา 4 วัน และจะเพิ่มขึ้นสูงสุดในวันที่ 7 จากนั้นจะลดลง ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์ pectate lyase และ cellulose เกิดกิจกรรมค่อนข้างต่ำ ส่วนหนึ่งอาจมีสาเหตุเนื่องมาจากอาหารเหลว (PDB) ที่ใช้เลี้ยงเชื้อในครั้งมีส่วนประกอบที่ไม่เหมาะสมต่อการกระตุ้นให้เชื้อสังเคราะห์เอนไซม์ในกลุ่มดังกล่าว

3. การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคแอนแทรกโนสของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ในระหว่างการเกิดโรค

จากการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ peroxidase, β-1,3-glucanase และ chitinase บนมะม่วงพันธุ์ดอกไม้ที่ปลูกเชื้อรา *C. gloeosporioides* เป็นเวลา 0, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับมะม่วงที่ไม่ปลูกเชื้อ พบว่า การปลูกเชื้อราบนมะม่วงน้ำดอกไม้มีผลกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ peroxidase และ β-1,3-glucanase ให้สูงมากขึ้นทั้งที่เปลือกและเนื้อ โดยเฉพาะที่ส่วนเนื้อจะพบกิจกรรมของเอนไซม์ peroxidase สูงกว่าส่วนเปลือก โดยจะสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 36 และสูงเป็น 9 เท่าของมะม่วงที่ไม่ได้ปลูกเชื้อรา ในทางตรงกันข้าม กิจกรรมของเอนไซม์ β-1,3-glucanase มีที่เปลือกมากกว่าที่เนื้อของมะม่วงทั้งที่ปลูกและไม่ปลูกเชื้อรา โดยกิจกรรมของเอนไซม์ β-1,3-glucanase จะ

มีสูงในระยะแรกของการปลูกเชื้อเป็นเวลาสั้นๆ และต่อมาจะลดลงอย่างรวดเร็ว การปลูกเชื้อราที่ผลมะม่วงมีผลไปกระตุ้นกิจกรรมของ chitinase ที่เปลือกให้สูงขึ้น แต่ไม่มีผลกระตุ้นการแสดงออกของเอนไซม์ chitinase ในส่วนเนื้อของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าขณะที่มะม่วงถูกเชื้อเข้าทำลาย มะม่วงจะมีการตอบสนองโดยการสร้างเอนไซม์ peroxidase, chitinase และ β-1,3-glucanase เพื่อต้านทานหรือยับยั้งการรุกรานของเชื้อ อาจโดยการผลิตสารประกอบฟีนอลที่เป็นพิษต่อเชื้อจากการทำงานของเอนไซม์ peroxidase หรือผลิตเอนไซม์ chitinase และ β-1,3-glucanase ซึ่งสามารถย่อยสลายผนังเซลหรือองค์ประกอบของเซลเชื้อราได้ อย่างไรก็ตามการตอบสนองของมะม่วงในเชิงต่อต้านเชื้อรานั้นเกิดขึ้นเพียงระยะเวลาสั้นๆ คือ 12-36 ชั่วโมง หลังจากพืชถูกเชื้อเข้ารุกราน อนึ่ง การทดลองปลูกเชื้อราที่ผลมะม่วงโดยทำแผลก่อนปลูกเชื้อ พบว่าการทำแผลมีผลกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ peroxidase ที่เนื้อของมะม่วง 10-15 เท่า เอนไซม์ 1,3-glucanase ที่เปลือกมะม่วง 2-2.5 เท่า และเอนไซม์ chitinase ประมาณ 3 เท่าของมะม่วงที่ไม่ได้ทำแผล โดยพิจารณาจากการทดลองที่ 1 ในมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ที่ไม่ได้จุ่มเอทิฟอน กับกิจกรรมของเอนไซม์ในการทดลองที่ 3 ในมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ที่ทำแผลแต่ไม่ได้ปลูกเชื้อ (control) ทั้งนี้เป็นเพราะการทำแผลมีผลทำให้พืชเกิดความเครียดเกิดขึ้นเช่นเดียวกับการปลูกเชื้อ ดังนั้นพืชจึงพยายามป้องกันตนเองจากบาดแผลที่เกิดขึ้น ซึ่งจะกลายเป็นช่องเปิดให้เชื้อเข้าทำลายได้ง่ายขึ้น

เอกสารอ้างอิง

1. นิพนธ์ วิสารทานนท์ (2521). รวมเรื่องการสัมมนา 'แนวทางการผลิตมะม่วงเพื่อส่งต่างประเทศ' ชมรมผู้พัฒนามะม่วงแห่งประเทศไทย, กรุงเทพฯ, 152 หน้า.
2. บรรณ บูรณะชนบท (2543). โรค-แมลงศัตรูมะม่วง. พิมพ์ครั้งที่ 4, ศูนย์ผลิตตำราเกษตรเพื่อชนบท, นนทบุรี, หน้า 64.
3. Annis, S.L. and Goodwin, P.H. (1997). Recent advances in the molecular genetics of plant cell wall-degrading enzymes produced by plant pathogenic fungi. Eur. J. Plant Pathol. 103:1-14.
4. Avdiushko, S.A., Ye, X.S. and Kuc, J. (1993). Detection of several enzymatic activities in leaf prints cucumber plant. Physiol. Mol. Plant. Pathol. 42:441-454.
5. Bol T., Buchel, J.F., Knoester, A.S., Baladin, M.,Van Loon, L.C. and Linthorst, H.J.M. (1996). Regulation and expression of plant defence genes. Plant Growth Regul. 18:87–91.
6. Boller, T., Gehri A., Mauch, F. and Vogeli, U. (1983). Chitinase in bean leaves: Introduction by ethylene, purification, properties, and possible function. Planta 157:22-31.
7. Boller, T. (1985). Induction of hydrolase as a defence reaction against pathogens. *In*: Key, J.L., eds. Cellular and Molecular Biology of Plant Stress. New York, USA. 247-262p.
8. Camm, E.C. and Towers, G.H.N., 1973, Phenylalanine ammonia lyase: a review, Phytochemistry, vol. 12, pp. 961-973.
9. Chatterjee, A., Cui, Y., Dumenyo, C.K. and A.K. Chatterjee. 1995. Inactivation of *rsmA* leads to overproduction of extracellular pectinases, cellulases, and proteases in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* in absence of the starvation/cell density-sensing signal, N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone. Appl. Environ. Microbiol. 61 : 1959-1967.
10. Dixon A.R., Dey, P.M. and Lamb, C.J. (1983). Phytoalexins: enzymology and molecular biology. Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology 55:1-136.
11. Dixon A.R., Harrison, M.J. and Lamb, C.J. (1994). Early events in the activation of plant defence responses. Annual Review in Phytopathology 32:479-501.
12. Hahlbrock, K. and Scheel, D. (1989). Physiology and molecular biology if phenylpropanoid metabolism. Annual Review of Plant Molecular Biology 40:347-369.
13. Harrison, S.J., Curtis, M.D., Mcltyre, C.L., Maclean, D.J. and Manners, J.M. (1995). Differentail expression of peroxidase pathogens during the early stages of infection of tropical storage legume *Stylosanthes humilis* by *Colletotrichum gloeosporioides*. MPMI. 8:398-406.

14. Jitareerat, J., Korpradisakul, V., Kositratana, W. and Udomprasert, N. (1991). Some isozyme patterns of *Ustilago scitaminea* : a caused agent of sugarcane smut. In Proceeding of Cane and Sugarcane Research and Development Central. Central Laboratory and Greenhouse Complex. Kasetsert University. May 21, 1996.
15. Hwang, B.K., Sunwoo, J.Y., Kim Y.J. and Kim B.S. (1997). Accumulation of β-1,3-glucanase and chitinase isoforms and alicylic acid in the DL-β-amino-n-butyric acid induced resistance response of pepper stems to *Phytophtora capsici*. Physio. Mol. Plant Pathol., 51:325-336.
16. Keen, N.T. and Yoshikawa, M. (1983). β-1,3-glucanase from soybean releases elicitor-active carbohydrates from fungus cell walls. Plant Physiology 71: 460-465.
17. Kim, Y.J. and Hwang, B.K. (1994). Differential accumulation of β-1,3-glucanase and chitinase isoforms in pepper stems infected by compatible and incompatible isolates of *Phytophthora capsici*. Physiology and Molecular Plant Pathology 45: 195-209.
18. Kitajima, S. and Sato, F. (1999). Plant pathogenesis-related proteins: molecular mechanisms of gene expression and protein function. *J. Biochem.*125: 1–8. Abstract-BIOTECHNOBASE | Abstract-MEDLINE | Abstract-EMBASE
19. Linthorst, H.J.M. (1991). Pathogenesis-related proteins of plants. Crit. Rev. Plant Sci. 10: 123–150.
20. Mauch, F., Hadwiger, L.A. and Boller, T. (1988). Antifungal hydrolases in pea tissue. I. Purification and characterization of two chitinases and two β-1,3-glucanases differentially regulated during development and in response to fungal infection. Plant Physiol. 87:325–333.
21. Melchers L.S., Groot, M.A., Van der Knaap, J.A., Ponstein, A.S., Sela-Buurlage, M.B., Bol, J.F., Cornelissen, B.J.C., Van den Elzen, P.J.M. and Linthorst, H.J.M. (1994). A new class of tobacco chitinases homologous to bacterial exo-chitinase displays antifungal activity. The Plant Journal 5:469-480.
22. Prusky, D., Keen, N.T. and Eaks, I. (1993). Further evidence for the involvement of preformed antifungal compounds in the latency of *Colletotrichum gloeosporioides* on unripe avocado fruits. Physiological Plant Pathology 22:189-198.
23. Pursky, D., Kobiler, I. and Jacoby, B. (1988). Involvement of epicatechin in cultivar susceptibility of avocado fruits to *Colletotrichum gloeosporioides* after harvest. Journal of Phytopathology 123:140-146.

24. Ried, J.L. and Collmer, A. (1985). Activity straub for rapid characterization of pectic enzymes in isoelectric focusing and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. Appl. Environ. Microbiol. 50:615-622.
25. Sangchote, S. (1998). Effect of fruit bagging, fruit position, cultivar, and postharvest treatment on potharvest disease of mangoes. *In* : Coates, L.M., Holfman, P.J. and Johnson, G.I. ed., Disease control and storage life extension in fruit : Proceeding of an International Conference Held at Chiang Mai, Thailand, 22-23 May 1997. ACIAR Proceedings, No.81, pp.63-66.
26. Sarah, E. Perfect, H. Bleddyn Hughes, Richard J. O'Connell, and Jonathan R. Green, 1999, Colletotrichum:A Model Genus for Studies on Pathology and Fungal–Plant Interactions, Fungal Genetics and Biology 27, pp.186–198.
27. Wattad, C., Kobiler, D., Dinoor, A. and Prusky, D. (1997). Pectate lyase of *Collectrotrichum gloeosporioides* attacking avocado fruits : cDNA cloning and involvement in pathogenicity. Physiology and Molecular Plant Pathology 50:197-212.
28. Wei, Y.D., Byer, K.N. and Goodwin, P.H. (1997). Hemibiotrophic infection of round-leaved mallow by Colletotrichum gloeosporioides f.sp. malvae in relation to leaf senescence and reducing agents. Mocol, Res. 101:357-364.
29. Wijesundera, R. L. C., Bailey, J. A., and Byrde, R. J. W. 1984, Production of pectin lyase by Colletotrichum lindemuthianum in culture and infected bean (Phaseolus vulgaris) tissue. J. Gen. Microbiol. 130: pp. 285–290.
30. Wijesundera, R. L. C., Bailey, J. A., Byrde, R. J. W., and Fielding, A. H., 1989, Cell wall degrading enzymes of Colletotrichum lindemuthianum:Their role in the development of bean anthracnose., Physiol. Mol. Plant Pathol., 34: pp. 403–413.
31. Wubben, J.P., Lawrence, C.B. and De Wit PJGM. (1996). Differential induction of chitinase and β-1,3-glucanases gene expression in tomato by *Cladosporium fulvum* and its race specific elicitors. Physiological and Molecular Plant Pathology 48:105-116.