Agricultural Sci. J. 50 : 3 (Suppl.) : 171-174 (2019) ว. วิทย. กษ. 50 : 3 (พิเศษ) : 171-174 (2562)

ความสัมพันธ์ของกิจกรรมเอนไซม์ Protease ที่สร้างจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. (Sacc) ต่อความรุนแรงในการเกิดโรคแอนแทรคโนสของมะม่วง

Interaction of Protease Enzyme Activity Which Induced by *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. (Sacc) and Aggressiveness of Mango Anthracnose Disease

สัณฐิติ บินคาเดอร์[1,2] รัติยา พงศ์พิสุทธา[1,2] และชัยณรงค์ รัตนกรีฑากุล[1,2]
Santiti Bincader, Ratiya Pongpisutta and Chainarong Rattanakreetakul

Abstract

Colletotrichum gloeosporioides Penz. (Sacc) is a one of the problems which effect to mango production on pre and post-harvest. The goal of this research was to study interaction between protease enzyme while produced by *C. gloeosporioides* 19 isolates causing mango anthracnose disease in 3 provinces as Chachoeng sao, Ratchaburi and Phichit to aggressiveness. Isolation of all pathogen on casein hydrolysis medium (CHM) contained with 10% skim milk. The finding indicated that all of isolates could be produce protease enzyme by based on their clear zone formations around the colonies and enzyme activity investigation of 19 isolates was estimated an average 1.6702 – 2.3448 mg/ml. Pathogenicity test by used fungal with the highly and leastways enzyme activity inoculated on mango fruit and the results showed fungi that have a lot of enzyme activity is a more severe disease than isolates with low enzyme activity. The research will be led to finding method to control and environmental management for maintain the quality of mango.

Keywords: Mango, Protease, *Colletotrichum gloeosporioides*

บทคัดย่อ

เชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. (Sacc) จัดเป็นปัญหาที่ส่งผลกระทบต่อกระบวนการผลิตมะม่วง ทั้งก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว งานวิจัยในครั้งนี้ มีเป้าหมายเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเอนไซม์ protease ที่สร้างจากเชื้อรา *C. gloeosporioides* จำนวน 19 ไอโซเลท ซึ่งแยกได้จากมะม่วงที่แสดงอาการโรคแอนแทรคโนสในพื้นที่ 3 จังหวัด คือ ฉะเชิงเทรา ราชบุรี และพิจิตร ต่อความรุนแรงในการเกิดโรค โดยทำการเลี้ยงเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ casein hydrolysis medium (CHM) ที่มีส่วนผสมของ 10 % skim milk ผลการทดลอง พบว่าเชื้อราทุกไอโซเลท มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ protease โดยสังเกตได้จากส่วนใส (clear zone) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ และเมื่อตรวจสอบกิจกรรมเอนไซม์ พบว่าเชื้อราทั้ง 19 ไอโซเลท มีค่าเฉลี่ยกิจกรรมเอนไซม์ระหว่าง 1.6702 - 2.3448 mg/ml ทำการทดสอบความรุนแรงในการเกิดโรค โดยนำเชื้อราไอโซเลทที่มีค่ากิจกรรมเอนไซม์มาก และน้อยที่สุดมาปลูกเชื้อลงบนผลมะม่วง พบว่าเชื้อราที่มีกิจกรรมเอนไซม์มากมีการเกิดโรคที่รุนแรงกว่าไอโซเลทที่มีกิจกรรมเอนไซม์น้อย ซึ่งการทดลองดังกล่าวจะนำไปสู่การหาวิธีการป้องกันควบคุม และจัดการสภาพแวดล้อม เพื่อรักษาผลผลิตของมะม่วงให้มีคุณภาพที่ดีต่อไป

คำสำคัญ: มะม่วง เอนไซม์โปรติเอส *Colletotrichum gloeosporioides*

คำนำ

การป้องกันและควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงทั้งก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพ จำเป็นต้องเข้าใจถึงกระบวนการการเข้าทำลาย รายงานของ Coates *et al*. (1993) พบว่าเชื้อรา *C. gloeosporioides* สร้างโครงสร้างสำหรับยึดเกาะผิวพืชที่จะเข้าทำลาย เรียกว่า appressorium จากนั้นสร้าง infection peg ใช้ในการแทงทะลุผ่านผนังเซลล์ของพืชเข้าสู่เนื้อเยื่อภายใน นอกจากนี้ยังสร้างเอนไซม์โปรติเอส เพื่อย่อยสลายพันธะเปปไทด์ซึ่งเป็นองค์ประกอบในเซลล์พืช เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ช่วยสนับสนุนการเข้าเข้าทำลายพืชอาศัยของเชื้อรานี้ (Yan *et al*., 2018)

[1] ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม 73140
[1] Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140
[2] ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10400
[2] Postharvest Technology Innovation Center, Commission on Higher Education Commission, Bangkok 10400

"เอนไซม์โปรติเอส" เป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่งที่มีความสามารถในการย่อยสลายโปรตีน จากโมเลกุลใหญ่ ให้กลายเป็นโมเลกุลขนาดเล็ก โดยจะทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) สลายพันธะเปปไทด์ (peptide bond; CO-NH) ให้เป็นเปปไทด์ที่มีขนาดเล็กลง (Rovensky *et al*., 2011) จากรายงานของ Trevan (1987) พบว่าสิ่งมีชีวิต เช่น แบคทีเรีย แอคติโนมัยซิส และเชื้อรา สามารถสร้างเอนไซม์ดังกล่าวได้ สำหรับในเชื้อราสกุล *Colletotrichum* มีรายงานว่าแต่ละชนิดหรือสปีชีส์ สร้างเอนไซม์โปรติเอสได้มากน้อยแตกต่างกัน สามารถนำมาใช้ในแยกความแตกต่างของเชื้อรา *C. acutatum* และ *C. gloeosporioides* ที่อาจเกิดขึ้นได้ในบางไอโซเลทที่มีลักษณะโคโลนีคล้ายกัน (Winyarat *et al*., 2013) ซึ่งอาจมีความสัมพันธ์กับความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรคกับพืชได้เช่นกัน งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของกิจกรรมเอนไซม์ protease ที่สร้างจากเชื้อรา *C. gloeosporioides* ต่อความรุนแรงในการเกิดโรคแอนแทรคโนสของมะม่วง เพื่อนำข้อมูลที่ได้มาประยุกต์ใช้ในการวินิจฉัย และนำไปสู่การจัดการโรคที่มีประสิทธิภาพต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การสร้าง clear zone บนอาหาร casein hydrolysis medium (CHM)

นำเชื้อรา *C. gloeosporioides* จำนวน 19 ไอโซเลทที่แยกจากมะม่วงในพื้นที่ 3 จังหวัด ได้แก่ ฉะเชิงเทรา ราชบุรี และพิจิตร ได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการวิทยา ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ มาเลี้ยงบนอาหาร CHM ที่มีส่วนผสมของ 10% skim milk จากนั้นนำไปบ่มใต้แสง near UV สลับมืด 12 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส บันทึกข้อมูลโดยวัดการเจริญของเส้นใย และ clear zone ทุกวัน จนครบ 3 วัน วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) แต่ละกรรมวิธีมี 5 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ ด้วยโปรแกรม R-stat X64 3.4.0

2. การตรวจวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส

เลี้ยงเชื้อราทั้ง 19 ไอโซเลท บนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) บ่มใต้แสง near UV สลับมืด 12 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 วัน จากนั้นแตะสปอร์ย้ายลงในสารละลาย phosphate buffer plus sugar (PBS) เพื่อเตรียมสปอร์แขวนลอยเข้มข้น (spore suspension) ให้ได้ปริมาณสปอร์ 10^4 สปอร์/มิลลิลิตร ทำการกระตุ้นการสร้างเอนไซม์โปรติเอส ด้วยการเติม 1% (w/v) skim milk จากนั้นนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่า ความเร็วรอบ 175 รอบต่อนาที ทำการเก็บสารละลายที่เลี้ยงเชื้อ เป็นช่วงเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง ปริมาตร 6 มิลลิลิตร นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อวินาที เป็นระยะเวลา 10 นาที เก็บสารละลายส่วนใส (supernatant) ซึ่งเป็น crude enzyme มาตรวจวิเคราะห์ บันทึกข้อมูลกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ตามวิธีการของ Cupp-Enyard (2008)

3. ความรุนแรงของเชื้อราในการก่อให้เกิดโรคกับมะม่วง

คัดเลือกเชื้อราที่มีกิจกรรมเอนไซม์มาก และน้อยที่สุด จากการทดลองที่ 2 มาเลี้ยงบนบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มใต้แสง near UV สลับมืด 12 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 วัน ใช้ cork borer ขนาด 0.6 มิลลิเมตร เจาะบริเวณขอบโคโลนี นำ mycelial disc ไปวางบนผลมะม่วง จากนั้นบ่มในกล่องบ่มเชื้อ ที่ความชื้น (moist chamber) บันทึกพัฒนาการของโรคทุกวัน จนครบ 7 วัน พร้อมบันทึกภาพ และหาพื้นที่การเกิดโรค (disease incidence) โดยใช้โปรแกรมประยุกต์ Scion image analysis

ผล

1. การสร้าง clear zone บนอาหาร casein hydrolysis medium (CHM)

หลังการบ่มเชื้อ 3 วัน พบว่าเชื้อรา *C. gloeosporioides* จำนวน 19 ไอโซเลท สร้างบริเวณใส (clear zone) รอบโคโลนี บนอาหารเลี้ยงเชื้อ CHM ที่มีส่วนผสมของ 10% skim milk มีความกว้างที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยไอโซเลท RB008 และ RB009 สร้าง clear zone กว้างที่สุด มีขนาดเท่ากับ 4.2667 และ 4.2333 เซนติเมตร อย่างไรก็ตามความกว้างของ clear zone ของทั้ง 2 ไอโซเลท ไม่มีความแตกต่างทางค่าสถิติ (LSD=0.3273) ส่วน PC009 มีขนาด clear zone น้อยที่สุดเท่ากับ 2.6500 เซนติเมตร (Table 1)

Table 1 Clear zone diameter and protease enzyme activity of *Colletotrichum gloeosporioides* on CHM which incubated at 25 °C under near UV with alternative darkness 12 hr for 3 days.

Isolate	Diameter of clear zone at d3 (cm)	Enzyme activity (mg/ml)[1/]			
		24 hr	48 hr	72 hr	Mean
CS001	3.4000cd	1.8755i	2.2165f	2.6180a	2.2367
CS002	3.1467cd	1.7160o	1.7655o	1.9140p	1.7985
CS003	3.2667h	1.5840p	1.6720p	1.7545q	1.6702
CS004	3.3667cd	1.8553j	2.0460i	2.0680m	1.9898
CS005	4.0333ab	2.0075f	2.1780g	2.3210g	2.1688
CS006	4.1167ab	2.0240e	2.2275e	2.3760d	2.2092
CS007	3.8500b	1.8810i	2.2275e	2.3045h	2.1377
CS008	3.8333b	1.5675q	1.8370n	1.9690n	1.7912
CS009	3.9833ab	1.9415h	2.2935c	2.3760d	2.2037
CS010	3.2500cde	1.7765m	1.9965k	2.0845l	1.9525
PC008	2.9167fg	1.9635g	2.2385d	2.2550i	2.1523
PC009	2.6500g	1.8260k	2.0625h	2.2550i	2.0478
PC010	2.9333efg	2.1450a	2.4255a	2.4805b	2.3503
RB002	3.1000def	2.1285b	2.3650b	2.4200c	2.3045
RB004	3.5000c	1.8260k	2.0130j	2.1670j	2.0020
RB008	4.2667a	1.7655n	1.9140l	2.1010k	1.9268
RB009	4.2333a	1.7930l	1.8480m	1.9525o	1.8645
RB013	2.7833fg	2.0680c	2.2440d	2.3503f	2.2208
RB015	2.8500fg	2.0515d	2.2110f	2.3650e	2.2092
F-value	***	***	***	***	-
CV	5.8105	0.2945	0.2627	0.2566	-
LSD	0.3273	0.0091	0.0091	0.0091	-

[1/] Column values followed by the same letter are not significantly different (P=0.05)

2. การตรวจวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส

พบว่าเชื้อราทุกไอโซเลทสามารถสร้างเอนไซม์ protease มาย่อยซับสเตรท (1% skim milk) ได้ โดยมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่แตกต่างกัน โดยที่ 24 และ 48 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 1.5840 – 2.1450 และ 1.6720 – 2.4255 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ และที่ 72 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 1.7545 – 2.618 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ไอโซเลทที่มีค่ากิจกรรมเอนไซม์มากที่สุดที่ 24 และ 48 ชั่วโมง คือ PC010 ส่วนที่เวลา 72 ชั่วโมง คือ CS001 จากค่าเฉลี่ยกิจกรรมเอนไซม์ทั้ง 3 ช่วงเวลา พบว่า PC010 มีค่ามากที่สุดเท่ากับ 2.3503 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ส่วน CS010 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2.2367 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สำหรับไอโซเลทที่มีค่ากิจกรรมเอนไซม์น้อยที่สุด ที่ช่วงเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง คือ CS003 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.6702 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (Table 1)

3. ความรุนแรงของเชื้อราในการก่อให้เกิดโรคกับมะม่วง

นำเชื้อรา *C. gloeosporioides* ไอโซเลท PC010 และ CS003 ซึ่งเป็นเชื้อราที่มีค่ากิจกรรมเอนไซม์มากและน้อยที่สุดจากการทดลองที่ 2 (Figure 1A – 1B) มาทดสอบความรุนแรงของโรคบนผลมะม่วงน้ำดอกไม้ พบว่าเชื้อรา PC010 มีการเข้าทำลายและก่อให้เกิดอาการของโรคแอนแทรคโนสที่รุนแรงกว่า โดยมีอาการแผลจุดยุบตัวสีน้ำตาล ขอบแผลขยายกว้าง มีพื้นที่การเกิดโรคหลังจากปลูกเชื้อเป็นระยะเวลา 7 วัน เท่ากับ 41.0589 เปอร์เซ็นต์ ส่วนไอโซเลท CS003 มีพื้นที่การเกิดโรคเท่ากับ 7.4706 เปอร์เซ็นต์ โดยแสดงอาการแผลยุบตัวสีน้ำตาล ถึงดำ ขอบแผลชัดเจน (Figure 1C – 1D)

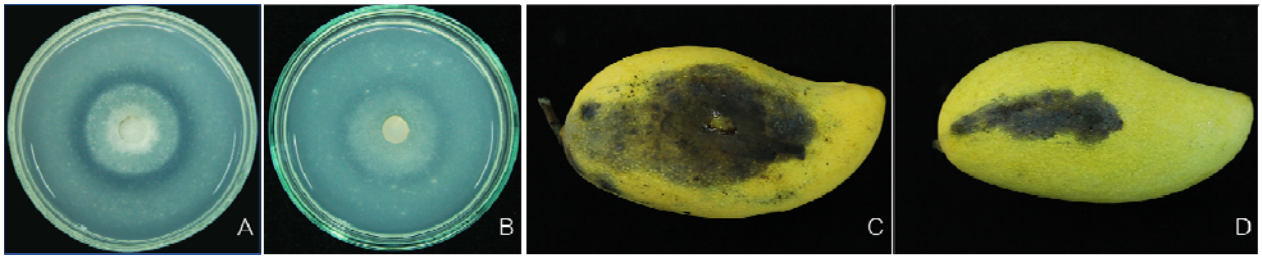

Figure 1 Clear zones of *Colletotrichum gloeosporioides* at 25 °C under near UV with alternative darkness 12 hr after 3 days of incubation (A) PC010 and (B) CS003, and aggressiveness investigation on mango fruits incubated at room temperature for 7days by (C) PC010 and (D) CS003.

วิจารณ์ผล

จากการตรวจวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ protease ที่ผลิตโดยเชื้อรา *C. gloeosporioides* พบว่าการสร้าง clear zone บนอาหาร CHM และปริมาณเอนไซม์ที่ผลิตได้นั้นไม่มีความสอดคล้องกัน แต่ค่ากิจกรรมเอนไซม์มากและน้อยต่างกันที่วิเคราะห์ได้นั้นมีความสัมพันธ์เป็นไปในทิศทางเดียวกัน (correlation) กับความรุนแรงของโรคที่เกิดกับผลมะม่วง จากรายงานของ Winyarat *et al*. (2013) พบว่าขนาดของ clear zone ไม่สัมพันธ์กับกิจกรรมเอนไซม์ที่เชื้อสร้าง แต่สามารถใช้ลักษณะดังกล่าวในการจำแนกเชื้อราในกลุ่ม *Colletotrichum* เบื้องต้นได้ สำหรับเอนไซม์ protease สามารถย่อยสลายสารโพลีเมอร์หลายชนิดซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์พืชให้เป็นเปปไทด์ที่สั้นลง เป็นปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงในการทำให้เกิดโรค (Redman and Rodriguez, 2002) กลุ่ม extracellular enzymes สร้างขึ้นภายในเซลล์จุลินทรีย์แล้วขับออกมาภายนอกเซลล์ทำหน้าที่ย่อยสลายองค์ประกอบที่เป็นสารอาหารให้มีโมเลกุลเล็กลง เพื่อดูดซึมเข้าสู่เซลล์ได้ มีการศึกษาในเชื้อรา *Colletotrichum* หลายสปีชีส์ โดยเน้นที่เอนไซม์ cutinase, pectinase และ cellulase (Yakoby *et al*., 2000) ส่วน protease ยังศึกษากันน้อย (Clark *et al*., 1997) เอนไซม์เหล่านี้มีบทบาทเป็นจุดเริ่มต้นต่อการเข้าทำลายพืช (Dickman and Patil, 1986) งานวิจัยนี้พบว่าเมื่อค่ากิจกรรมเอนไซม์ protease สูง ทำให้เกิดโรคได้รุนแรงเพิ่มขึ้นด้วย มีงานวิจัยที่ศึกษาเชื้อรา *Colletotrichum coccodes* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสมะเขือเทศ นำเชื้อมาทำให้กลายพันธุ์ด้วยแสง UV กลายเป็นสายพันธุ์ที่ไม่มีการสร้างเอนไซม์ protease และ cellulase เมื่อปลูกเชื้อบนผลมะเขือเทศ พบว่าไม่ทำให้เกิดโรค แต่อยู่ในสภาวะเป็น endophyte (Redman and Rodriguez, 2002)

สรุป

เชื้อรา *C. gloeosporioides* ทั้ง 19 ไอโซเลท ที่ก่อให้เกิดโรคแอนแทรคโนสในมะม่วงสามารถสร้างเอนไซม์ protease มาย่อยซับสเตรท (1% skim milk) ได้โดยสร้าง clear zone บนอาหารเลี้ยงเชื้อ CHM จากการตรวจสอบกิจกรรมเอนไซม์ พบว่าปริมาณของเอนไซม์มีความสัมพันธ์กับความรุนแรงในการก่อโรค การศึกษานี้จะนำไปสู่การเข้าใจถึงกระบวนการเข้าทำลาย และเป็นพื้นฐานสำหรับการจัดการโรคอย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กทม. และขอขอบคุณห้องปฏิบัติการราวิทยา ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน สำหรับการเอื้อเฟื้อสถานที่ และอุปกรณ์ในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

Clark, S.J., M.D. Templeton and P.A. Sullivan. 1997. A secreted aspartic proteinase from *Glomerella cingulata*: purification of the enzyme and molecular cloning of the cDNA. Microbiology 143: 1395-1403.

Coates, L.M., F. Muirhead, J.A.G. Irwin and H. Gowanlock. 1993. Initial infection processes by *Colletotrichum gloeosporioides* on avocado fruit. Mycological Research 97(11): 1363-1370.

Cupp-Enyard, C. 2008. Sigma's non-specific protease activity assay – casein as a substrate. Journal of Visualized Experiments 19: e899, doi: 10.3791/899

Dickman, M. B. and S.S. Patil. 1986. Cutinase deficient mutants of *Colletotrichum trifolii*. Current Genetics 14: 241–246.

Redman, R. S. and R.J. Rodriguez. 2002. Characterization and isolation of an extracellular serine protease from the tomato pathogen *Colletotrichum coccodes*, and it's role in pathogenicity. Mycological Research 106: 1427-1434.

Rovensky, J., M. Stancikova, K. Svik, K. Bauerova and J. Jurcovicova. 2011. The effects of Beta-glucan isolated from *Pleurotus ostreatus* on methotrexate treatment in rats with adjuvant arthritis. The Journal of Rheumatology 31(4): 507-511.

Trevan, M.D. 1987. Enzyme production. *p*.155-225. In: Biotechnology: The Biological Principles. (Indian ed.). Tata McGraw Hill Pub. Co., New Delhi, India.

Winyarat, W., R. Pongpisutta and C. Rattanakreetakul. 2013. Protease activity for identification of *Colletotrichum* species causing chilli anthracnose in Thailand. Acta Horticulturae 973: 173-180.

Yakoby, N., S. Freeman, A. Dinoor, N.T. Keen and D. Prusky. 2000. Expression of pectate lyase from *Colletotrichum gloeosporioides* in *C. magna* promotes pathogenicity. Molecular Plant-Microbe Interactions 13: 887-891.

Yan, Y., Q. Yuan, J. Tang, J. Huang, T. Hsiang, Y. Wei and L. Zheng. 2018. *Colletotrichum higginsianum* as a Model for Understanding Host–Pathogen Interactions: A Review. International Journal of Molecular Sciences 19(7): 1-18.