

การสร้างเอนไซม์ของเชื้อราสาเหตุโรคทางใบของไม้ประดับ

Enzymes Production by Plant Pathogenic Fungi Causing Foliar Disease on Ornamental plants

อังศัรวา ดาราพานิชย์¹ จุฬาลักษณ์ ตลับนาค¹ สุริยสิทธิ์ สมนึก^{1*} และถนิมนันต์ เจนอักษร¹
Angwara Darapanit¹, Chulalak Talubnak¹, Suriyasit Somnuek^{1*} and Tanimnun Jaenaksorn¹

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความสามารถของเชื้อราสาเหตุโรคทางใบของไม้ประดับในการสร้างเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์พืช (cellulase, pectinase) และเชื้อรา (chitinase) บนอาหารแข็ง ในสภาพห้องปฏิบัติการ โดยแยกเชื้อราจากใบพืชที่แสดงอาการโรคทั้งหมด 13 วงศ์พืช (32 ไอโซเลต) ภายในสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ และทำการทดสอบกิจกรรมการสร้างเอนไซม์ cellulase และ pectinase ประเมินโดย hydrolysis capacity (HC) value ซึ่งได้จากสัดส่วนของ hydrolysis zone และเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี ในขณะที่ chitinase ประเมินจากขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนสีม่วงบนอาหาร colloidal chitin จากผลการทดลอง พบว่าเชื้อราทดสอบทุกไอโซเลต (ยกเว้น Co 211-1) สามารถสร้าง cellulase ได้ในระดับต่ำ ซึ่งมีค่า HC value น้อยกว่า 1.00 สำหรับ pectinase พบการสร้างเอนไซม์ได้ในระดับต่ำ มีค่า HC value น้อยกว่า 1.00 ในทุกไอโซเลต ยกเว้น กลุ่มของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. 19 ไอโซเลต, *Bipolaris* sp. (Bi 21-2) และ *Nigrospora* sp. (Ni 12-4) ที่ไม่พบการสร้างเอนไซม์ดังกล่าว และการทดสอบ chitinase พบว่าเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ทุกไอโซเลต (ยกเว้น Co 211-1) และ *Alternaria* spp. จำนวน 2 ไอโซเลต สามารถสร้างเอนไซม์ได้ระดับปานกลาง ขณะที่เชื้อรา *Cuvularia* spp. จำนวน 4 ไอโซเลต และ *Bipolaris* sp. (Bi 21-2) พบกิจกรรมการสร้างเอนไซม์ในระดับต่ำ และไอโซเลตอื่นๆ ไม่พบกิจกรรมการสร้างเอนไซม์ chitinase จากนั้นทำการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคโดยวิธี detached-leaf test ผลการทดลองที่กล่าวมาข้างต้น พอสรุปได้ว่า เชื้อราทดสอบ (จากพืชอาศัยที่ต่างกัน) ภายในสกุลเดียวกันมีศักยภาพในการสร้างเอนไซม์ที่ย่อยสลายผนังเซลล์พืชไม่แตกต่างกัน

คำสำคัญ: การสร้างเอนไซม์ necrotrophic fungi ไม้ประดับ

Abstract

The research was carried out to investigate the ability of plant pathogenic fungi causing foliar diseases in producing cell wall degrading enzymes of plant (cellulase, pectinase) and Fungi (chitinase) on solid media. The tested pathogens (32 isolates) were isolated from diseased leaves of 13 Family of ornamental plants in the area of King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok. Activities of cellulase and pectinase enzymes were determined by hydrolysis capacity (HC) value which was the ratio of the hydrolysis zone and colony diameter. For chitinase, its activity was categorized based on relative increase in diameter as well as intensity of purple color on colloidal chitin medium. Results revealed that all tested fungal isolates (except Co 211-1) showed low potential to produce cellulase with HC value of less than 1.00. Regard to pectinase production, presence of activity with low HC value (<1.00) was detected in all tested fungal isolates except for all 19 isolates of *Colletotrichum* spp., *Bipolaris* sp. (Bi 21-2) and *Nigrospora* sp. (Ni 12-4). For chitinolytic enzyme, all tested isolates of *Colletotrichum* spp.

¹คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เขตลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร 10520

*Corresponding author, Email: suriyasitsom@gmail.com

(except Co 211-1) and all 2 tested *Alternaria* spp. presented moderate activity whereas all 4 tested *Curvularia* spp. and *Bipolaris* sp. (Bi 21-2) showed low activity and the rest showed absent activity. Furthermore, pathogenicity test was conducted *in vitro* using detached-leaf inoculation. Conclusively, fungal isolates (from different host plants) within the same genera revealed the same potential to produce cell wall degrading enzymes.

Keyword: enzymes production, necrotrophic fungi, ornamental plants

บทนำ

โรคของไม้ประดับ (Ornamental plant diseases) ที่มีสาเหตุมาจาก necrotrophic fungi เป็นปัญหาที่สำคัญในการเพาะปลูกไม้ประดับทั้งในเรือนเพาะชำ และพื้นที่ปลูก ส่งผลให้พืชดังกล่าวสูญเสียมูลค่าทางเศรษฐกิจ และไม่เป็นที่ต้องการของตลาด โดยเชื้อราสาเหตุโรคที่พบส่วนใหญ่ คือ เชื้อรา *Colletotrichum* spp. และ *Alternaria* spp. ซึ่งเชื้อราดังกล่าวมักจะเข้าทำลายใบของไม้ประดับ ทำให้เกิดอาการ necrosis เช่น โรคแอนแทรคโนส ใบไหม้ ใบจุด (Dicklow, 2013; Pegg *et al.*, 2016; Coates *et al.*, 2016) ในการเข้าทำลายของเชื้อราสาเหตุโรคพืชนั้น นอกจากจะสร้างโครงสร้างต่าง ๆ เพื่อแทงผ่านเนื้อเยื่อพืชแล้ว เชื้อรายังสร้างสารพิษและเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช (cell wall degrading enzymes) เพื่อให้เนื้อเยื่อพืชเกิดการเสื่อมสลาย และช่วยให้การเข้าทำลายพืชมีความรุนแรงมากขึ้น ซึ่งเอนไซม์มีอยู่หลายชนิด เช่น cellulase และ pectinase (Dean and Timberlake, 1989; Fernando *et al.*, 2001; Lorena *et al.*, 2007; Anand *et al.*, 2008; Hubballi *et al.*, 2011) อีกทั้งยังมีการรายงานว่า ในช่วงเวลาก่อโรคกับพืชอาศัย เชื้อราสาเหตุโรคพืชสายพันธุ์ที่รุนแรงจะมีการสร้างเอนไซม์ในปริมาณที่มากกว่าเป็นสองเท่าของเชื้อราสายพันธุ์ที่ก่อโรคไม่รุนแรง ดังนั้นปริมาณการสร้างเอนไซม์ดังกล่าวจึงพอที่จะบ่งบอกถึงความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรคกับพืชได้อีกเช่นกัน นอกจากนี้เอนไซม์ที่กล่าวมาทั้ง 2 ชนิดแล้ว chitinase ก็เป็นเอนไซม์อีกชนิดหนึ่งที่น่าสนใจ เนื่องจากเอนไซม์ดังกล่าวสามารถย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อราได้ ซึ่งโดยปกติแล้วเชื้อราที่สร้าง chitinase มักจะพบในกลุ่มเชื้อราปฏิปักษ์ (Agrawal and Kotasthane, 2012) และอาจจะสามารถพัฒนาเชื้อราที่สร้างเอนไซม์ดังกล่าว เป็นเชื้อราปฏิปักษ์ได้ ในการศึกษาการสร้างเอนไซม์ของเชื้อราสาเหตุโรคพืชในระดับห้องปฏิบัติการ มีหลายวิธีด้วยกัน เช่น การทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว และนำไปวิเคราะห์ปริมาณการสร้างเอนไซม์ อีกวิธีหนึ่งคือ การทดสอบการสร้างเอนไซม์บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก ที่ทำให้ทราบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ของเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ในเบื้องต้น จากที่กล่าวมาคณะผู้วิจัยจึงสนใจว่า ลักษณะอาการ necrosis ที่คล้ายกันที่เกิดขึ้นบนใบไม้ประดับต่างชนิดกันแต่อยู่ในพืชวงศ์เดียวกัน เชื้อราสาเหตุโรคดังกล่าวจะมีลักษณะการสร้างเอนไซม์แตกต่างกันหรือไม่ จึงทำการศึกษการสร้างเอนไซม์ของเชื้อราสาเหตุโรคในกลุ่ม necrotrophic fungi ที่แยกจากไม้ประดับในสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง และทดสอบความสามารถในการก่อโรคของเชื้อราที่แยกได้กับไม้ประดับวงศ์เดียวกันอีกด้วย

วิธีการศึกษา

เชื้อราสาเหตุโรคทางใบของไม้ประดับ

การแยกเชื้อราสาเหตุโรคและการศึกษาลักษณะพื้นฐานวิทยา โดยเก็บตัวอย่างใบของไม้ประดับ (Table 1) ที่แสดงอาการแผลตาย (necrosis) เช่น ใบจุด (leaf spot: S) และใบไหม้แอนแทรคโนส (anthracnose leaf blight: AB) ภายในบริเวณสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร มาทำการแยกเชื้อราสาเหตุโรคโดยใช้วิธี Tissue transplanting method จนได้เชื้อบริสุทธิ์ หลังจากนั้นทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ของเชื้อราที่แยกได้โดยสังเกตการเจริญสี ลักษณะของโคโลนีบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) และลักษณะ ขนาด รูปร่าง ของเส้นใย และ conidia ของเชื้อรา เพื่อทำการจัดจำแนกเชื้อรา

การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ของเชื้อราสาเหตุโรคทางใบ

กิจกรรมของเอนไซม์ *cellulase*: ทดสอบโดย Plate assay method บนอาหารเลี้ยงเชื้อ carboxy methyl cellulose medium (CMC medium) ซึ่งประกอบด้วย NaNO_3 2 กรัม, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 กรัม, K_2HPO_4 1 กรัม, KCl 0.5 กรัม, CMC 2 กรัม, peptone 0.2 กรัม และ agar 17 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร (Kasana *et al.*, 2008) เทอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ลงจานเพาะเชื้อ จากนั้นย้ายชิ้นวุ้นเชื้อราทดสอบที่เลี้ยงบนอาหาร PDA อายุ 5 วัน โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 ซม. เจาะที่ขอบของโคโลนีเชื้อรา และนำมาวางกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ดังกล่าวข้างต้น ชุดควบคุมใช้อาหารไม่ปลูกเชื้อเป็น negative control และใช้ standard enzyme เป็น positive control บ่มทิ้งไว้ที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นตรวจสอบการสร้างเอนไซม์ *cellulase* โดยวิธี Iodine plate assay (Kasana *et al.*, 2008) ด้วยการเทสารละลายไอโอดีน 10 มล. ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อทดสอบเป็นเวลา 5 นาที แล้วเทสารละลายไอโอดีนออก โดยสารละลายไอโอดีนจะแสดงสีบนอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะบริเวณที่ยังมี cellulose อยู่ ส่งผลให้เห็นเป็นโซนใส (clear zone) บริเวณที่ cellulose ถูกเชื้อย่อยสลายไปแล้ว บันทึกผลโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณโซนใส เพื่อคำนวณหา Hydrolysis capacity (HC) value (Taechapoempol *et al.*, 2011) และจัดระดับการสร้างเอนไซม์

$$\text{HC value} = \frac{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณโซนใส}}{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อรา}}$$

โดยให้ระดับดังนี้ –	คือ ค่า HC value เท่ากับ 0 ; ไม่พบการสร้างเอนไซม์
+	คือ ค่า HC value <1.00 ; พบการสร้างเอนไซม์น้อย
++	คือ ค่า HC value 1.01-2.00 ; พบการสร้างเอนไซม์ปานกลาง
+++	คือ ค่า HC value 2.01-3.00 ; พบการสร้างเอนไซม์มาก
++++	คือ ค่า HC value >3.01 ขึ้นไป ; พบการสร้างเอนไซม์มากที่สุด

กิจกรรมของเอนไซม์ *pectinase*: ทดสอบโดย Plate assay method บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Czapek agar ซึ่งประกอบด้วย NaNO_3 2 กรัม, K_2HPO_4 1 กรัม, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 กรัม, KCl 0.5 กรัม, 1% ZnSO_4 1 มล., 0.5% CuSO_4 1 มล., sucrose 30 กรัม, agar 20 กรัม และ pectin 10 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร (Priya and Sashi, 2014) โดยทำการทดลองและตรวจสอบกิจกรรมเอนไซม์ *pectinase* เช่นเดียวกับการทดสอบ กิจกรรมของเอนไซม์ *cellulase*

กิจกรรมของเอนไซม์ *chitinase*: ทดสอบโดย Plate assay method บนอาหารเลี้ยงเชื้อ colloidal chitin medium ซึ่งประกอบด้วย $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 กรัม, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3 กรัม, KH_2PO_4 2 กรัม, citric acid monohydrate 1 กรัม, agar 17 กรัม, tween 80 200 ไมโครลิตร, colloidal chitin 4.5 กรัม และ bromocresol purple 0.15 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร (Agrawal and Kotasthane, 2012) และปรับค่า pH เท่ากับ 4.7 ชุดควบคุมใช้การปลูกเชื้อรา *Trichoderma* sp. เป็น positive control เนื่องจากเชื้อราดังกล่าวได้รับรายงานว่าจะสามารถสร้างเอนไซม์ *chitinase* ได้เป็นอย่างดี (Agrawal and Kotasthane, 2012) ในการตรวจสอบการสร้างเอนไซม์นี้ประเมินโดยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนสีม่วง ซึ่งเกิดจากการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยอาหาร colloidal chitin medium ที่ผสม bromocresol purple เมื่อปลูกเชื้อราที่สร้างเอนไซม์ *chitinase* ลงไป เอนไซม์ดังกล่าวจะไปย่อย chitin ให้เป็น N-acetyl glucosamine

ซึ่งสารดังกล่าวนี้จะทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นต่าง มีผลทำให้สีของอาหารเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีม่วง (Agrawal and Kotasthane, 2012)

- โดยให้ระดับดังนี้
- คือ เส้นผ่านศูนย์กลางโซนสีม่วง 0 ซม.; ไม่เกิดการสร้างเอนไซม์
 - + คือ เส้นผ่านศูนย์กลางโซนสีม่วง 0.1-2 ซม.; มีการสร้างเอนไซม์น้อย
 - ++ คือ เส้นผ่านศูนย์กลางโซนสีม่วง 2.1-4 ซม.; มีการสร้างเอนไซม์ปานกลาง
 - +++ คือ เส้นผ่านศูนย์กลางโซนสีม่วง 4.1-6 ซม.; มีการสร้างเอนไซม์มาก
 - ++++ คือ เส้นผ่านศูนย์กลางโซนสีม่วง 6.1 ซม. ขึ้นไป; มีการสร้างเอนไซม์มากที่สุด

การทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรค (Pathogenicity test)

ทำการทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคของเชื้อแต่ละไอโซเลตด้วยวิธี Detached leaf test โดยกำหนดตัวแทนพืชทดสอบ 1 ชนิดต่อวงศ์ (Table 3) เริ่มต้นโดยเลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรคแต่ละไอโซเลตบนอาหาร PDA เป็นเวลา 5 วัน แล้วใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 ซม. เจาะบริเวณขอบของโคโลนี และย้ายชิ้นวุ้นเชื้อราสาเหตุโรค วางบนใบพืช จำนวน 3 ใบ (ข้า) ใบละ 4 จุด วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) สำหรับชุดควบคุมใช้อาหาร PDA จากนั้นนำไปพืชที่ปลูกเชื้อแล้ว (inoculated leaves) บ่มไว้ในสภาพชื้น (moist chamber) วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของแผลเป็นเวลา 7 วัน และประเมินระดับคะแนนดังนี้ 0 = ไม่เกิดโรค; 1 = แผลขนาด 0.1-0.4 ซม.; 2 = แผลขนาด 0.41-0.8 ซม.; 3 = แผลขนาด 0.81-1.2 ซม.; 4 = แผลขนาดมากกว่า 1.21 ซม. คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค (Disease incidence; DI) และคำนวณเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรค (Disease severity; DS) ตามสูตร

$$DI = \frac{\text{จำนวนใบที่แสดงอาการโรค}}{\text{จำนวนใบทั้งหมด}} \times 100$$

$$DS = \frac{\sum (\text{จำนวนใบที่แสดงอาการโรค} \times \text{ระดับอาการโรค})}{(\text{จำนวนใบทั้งหมด} \times \text{ระดับอาการสูงสุด})} \times 100$$

ผลการศึกษาและวิจารณ์

เชื้อราสาเหตุโรคทางใบของไม้ดอกไม้ประดับ

จากการเก็บตัวอย่างอาการโรคทางใบของไม้ประดับ จำนวน 31 ชนิดพืช จาก 13 วงศ์ มาทำการแยกเชื้อราสาเหตุและจัดจำแนก พบว่า เชื้อราที่แยกได้ทั้งหมดมีจำนวน 32 ไอโซเลต โดยได้จากลักษณะอาการใบไหม้ แอนแทรคโนส 21 ไอโซเลต และอาการใบจุด 11 ไอโซเลต สำหรับกลุ่มอาการใบไหม้แอนแทรคโนสแยกได้เชื้อรา *Colletotrichum* spp. 17 ไอโซเลต (จากพืชวงศ์ Agavaceae, Araceae, Arecaceae, Bromeliaceae, Combretaceae, Liliaceae, Olandraceae และ Palmae), เชื้อรา *Curvularia* spp. 2 ไอโซเลต (จากพืชวงศ์ Aspleniaceae และ Heliconiaceae), และเชื้อรา *Nigrospora* spp. 2 ไอโซเลต (จากพืชวงศ์ Araceae และ Palmae) ส่วนกลุ่มอาการใบจุด แยกได้เชื้อรา *Alternaria* spp. 2 ไอโซเลต (จากพืชวงศ์ Agavaceae และ Nymphaeaceae), เชื้อรา *Bipolaris* sp. 1 ไอโซเลต (จากพืชวงศ์ Cannaceae), เชื้อรา *Colletotrichum* spp. 2 ไอโซเลต

(จากพืชวงศ์ Araceae และ Orchidaceae), เชื้อรา *Curvularia* spp. 2 ไอโซเลท (จากพืชวงศ์ Arecaceae และ Costaceae), เชื้อรา *Helminthosporium* sp. 1 ไอโซเลท (จากพืชวงศ์ Palmae), เชื้อรา *Pestalotia* sp. 1 ไอโซเลท (จากพืชวงศ์ Aspleniaceae) และเชื้อรา Unknown 2 ไอโซเลท (จากพืชวงศ์ Agavaceae และ Palmae) (Table 1) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานหลายฉบับ (Dicklow, 2013; Pegg *et al.*, 2016; Coates *et al.*, 2016) ที่ระบุว่าเชื้อรา *Colletotrichum* spp. และ *Alternaria* spp. เป็นเชื้อราที่พบเข้าทำลายพืชไม้ดอกไม้ประดับมากที่สุด ทั้งในโรงเรือนเพาะชำและพื้นที่ปลูก โดยลักษณะอาการโรคที่พบส่วนใหญ่ คือ โรคใบไหม้แอนแทรคโนส และโรคใบจุดสีน้ำตาล นอกจากนี้ยังมีรายงานในประเทศไทยว่า เชื้อรา *Colletotrichum* spp. และ *Curvularia* spp. เป็นเชื้อราสาเหตุโรคของพืชตระกูลปาล์ม (Kittimorakul *et al.*, 2013; Sunpapao *et al.*, 2014)

การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ของเชื้อราสาเหตุโรคทางใบ

จากการทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ cellulase, pectinase และ chitinase ของเชื้อราที่แยกได้จำนวน 32 ไอโซเลท บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง เมื่อสิ้นสุดการทดลอง (5 วันหลังการปลูกเชื้อ) พบว่า การทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ cellulase เชื้อราที่ทดสอบทุกไอโซเลทสามารถสร้างเอนไซม์ดังกล่าวได้โดยไอโซเลท Co 211-1 สร้างได้ในระดับปานกลาง มี HC value มากกว่า 1.01 และไอโซเลทอื่น ๆ สร้างอยู่ในระดับต่ำ มีค่า HC value น้อยกว่า 1 สำหรับ standard enzyme (positive control) มีค่า HC value มากกว่า 3.00 (Table 2, Figure 1) สำหรับการทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ pectinase พบว่ามีเชื้อราเพียง 11 ไอโซเลทที่สร้างเอนไซม์นี้ โดย *Alternaria* spp., *Bipolaris* sp., *Curvularia* spp., *Helminthosporium* sp., *Nigrospora* sp. และ Unknown มีการสร้างเอนไซม์อยู่ในระดับต่ำ มีค่า HC value น้อยกว่า 1 ในขณะที่ standard enzyme (positive control) มีค่า HC value มากกว่า 3.00 (Table 2, Figure 1) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานหลายฉบับ (Fernando *et al.*, 2001; Lorena *et al.*, 2007; Anand *et al.*, 2008; Hubballi *et al.*, 2011) ที่ระบุว่า เชื้อราสาเหตุโรคพืช ได้แก่ *Alternaria* spp. (สาเหตุโรคใบจุดต้นยอ และพริก), *Colletotrichum* spp. (สาเหตุโรคแอนแทรคโนสกล้วยแขก, พริกและยางพารา) สามารถสร้างเอนไซม์ cellulase และ pectinase ได้ ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวจะทำให้การเข้าทำลายพืชมีความรุนแรงมากขึ้น โดยได้รายงานอีกว่าเชื้อราสาเหตุโรคพืชสายพันธุ์ที่ก่อโรครุนแรง (virulent strain) จะมีการสร้างเอนไซม์แตกต่างกับเชื้อราสายพันธุ์ที่ก่อโรคไม่รุนแรง (avirulent strain) กล่าวคือ ในช่วงเวลาที่เริ่มก่อโรค เชื้อราสาเหตุโรคพืชสายพันธุ์ที่ก่อโรครุนแรงจะมีการสร้างเอนไซม์เป็นปริมาณที่มากกว่าสองเท่าของเชื้อราสาเหตุโรคพืชสายพันธุ์ที่ไม่รุนแรงและจะลดลงเมื่อเวลาผ่านไป ในขณะที่เชื้อราสายพันธุ์ไม่รุนแรงจะยังคงสร้างเอนไซม์เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาของคณะผู้วิจัยครั้งนี้ไม่พบการสร้างเอนไซม์ pectinase ของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ทุกไอโซเลทที่เลี้ยงบนอาหารแข็งเป็นเวลา 5 วัน ซึ่งแตกต่างจากการรายงานอื่น ๆ ที่ระบุว่า เชื้อรา *Colletotrichum lindemuthianum* ที่เลี้ยงด้วยอาหารเหลว 92 %-esterified pectin (Lorena *et al.*, 2007) และ *C. capsici* ที่เลี้ยงด้วยอาหารเหลว Czapek-Dox ผสม 1 % pectin (Anand *et al.*, 2008) สามารถสร้าง pectinase ได้เป็นอย่างดี โดยพบปริมาณการสร้างเอนไซม์สูงที่สุดที่ระยะเวลา 10 วันหลังการปลูกเชื้อ ดังนั้นพอสรุปได้ว่า อายุของเชื้อราเป็นปัจจัยที่สำคัญในการตรวจสอบปริมาณการสร้างเอนไซม์ pectinase และเวลาที่เหมาะสมควรจะเป็น 10 วัน แต่การทดลองบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งนั้นก็มีข้อจำกัด เนื่องจากเชื้อราโดยทั่วไปมักจะเจริญเต็มจานเพาะเลี้ยงเชื้อภายในเวลาไม่เกิน 7 วัน จึงส่งผลให้ปริมาณการสร้างเอนไซม์ pectinase ยังไม่ชัดเจน ในเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ทุกไอโซเลทที่นำมาทดสอบ ซึ่งจากที่กล่าวมาพอที่จะเป็นวิธีการทดสอบเบื้องต้นของเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้

Table 1 Isolates of necrotrophic fungi on ornamental plants.

Family	Plant	Leaf symp- tom ^{1/}	Fungal identification (Isolate)	Family	Plant	Leaf symp- tom ^{1/}	Fungal identification (Isolate)
Agavaceae	<i>Dracaena reflexa</i>	S	<i>Alternaria</i> sp. (Al 21-1)	Aspleniaceae	<i>Asplenium nidus</i>	S	<i>Pestalotia</i> sp. (Pe 21-3)
	<i>Dracaena fragrans</i> (L.)	AB	<i>Colletotrichum</i> sp. (Co 11-4)			AB	<i>Curvularia</i> sp. (Cu 22-1)
	<i>Cordyline fruticosa</i>	AB	<i>Colletotrichum</i> sp. (Co 12-2)	Bromeliaceae	<i>Aechmea fasciata</i>	AB	<i>Colletotrichum</i> sp. (Co 113-1)
	<i>Dracaena dermensis</i>	S	Unknown (Un 21-1)	Cannaceae	<i>Canna indica</i> L.	S	<i>Bipolaris</i> sp. (Bi 21-1)
				Combretaceae	<i>Terminalia catappa</i>	AB	<i>Colletotrichum</i> sp. (Co 214-4)
Araceae	<i>Philodendron</i> spp.	AB	<i>Colletotrichum</i> sp. (Co 13-1)	Costaceae	<i>Costus speciosus</i>	S	<i>Curvularia</i> sp. (Cu 13-1)
	<i>Philodendron</i> spp. (Sunlight)	AB	<i>Colletotrichum</i> sp. (Co 14-1)	Heliconiaceae	<i>Heliconia</i> spp.	AB	<i>Curvularia</i> sp. (Cu 14-1)
	<i>Philodendron</i> spp. (Xanadu)	AB	<i>Colletotrichum</i> sp. (Co 15-1)	Liliaceae	<i>Chlorophytum comosum</i>	AB	<i>Colletotrichum</i> sp. (Co 115-1)
	<i>Aglonema modestum</i>	AB	<i>Colletotrichum</i> sp. (Co 16-1)	Nymphaeaceae	<i>Nymphaea</i> spp	S	<i>Alternaria</i> sp. (Al 12-1)
	<i>Dieffenbachia</i> spp.	AB	<i>Colletotrichum</i> sp. (Co 17-2)	Olandraceae	<i>Nephrolepis exaltata</i>	AB	<i>Colletotrichum</i> sp. (Co 117-2)
	<i>Dieffenbachia picta</i>	AB	<i>Colletotrichum</i> sp. (Co 28-2)	Orchidaceae	<i>Dendrobium</i> sp. 'sonia'	S	<i>Colletotrichum</i> sp. (Co 216-1)
	<i>Aglonema Modestum</i>	AB	<i>Colletotrichum</i> sp. (Co 19-1)		<i>Rhapis excelsa</i>	AB	<i>Colletotrichum</i> sp. (Co 118-1)
	<i>Scindapsus</i> sp.	S	<i>Colletotrichum</i> sp. (Co 210-1)		<i>Areca vestiana</i>	AB	<i>Colletotrichum</i> sp. (Co 119-3)
	<i>Anthurium andraeanum</i>	AB	<i>Colletotrichum</i> sp. (Co 211-1)	Palmae	<i>Dypsis lutescens</i>	S	<i>Helminthosporium</i> sp. (He 21-4)
	<i>Homalomena wallisii</i>	AB	<i>Nigrospora</i> sp. (Ni 11-1)		<i>Cyrtostachys renda</i>	AB	<i>Nigrospora</i> sp. (Ni 12-4)
Arecaceae	<i>Ravenea rivularis</i>	AB	<i>Colletotrichum</i> sp. (Co 112-3)		<i>Wodyetia bifurcate</i>	S	Unknown (Un 22-1)
	<i>Elaeis guineensis</i>	S	<i>Curvularia</i> sp. (Cu 21-1)				

^{1/}Leaf symptom S = leaf spot; AB = anthracnose leaf blight

สำหรับการทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ *chitinase* ซึ่งประเมินจากขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ (เป็นสีม่วง) พบว่า เชื้อรา *Trichoderma* sp. (positive control) มีขนาดของโซนสีม่วงเต็มจานเพาะเชื้อ ในขณะที่เชื้อราสาเหตุโรคพืชที่ทดสอบส่วนใหญ่พบการสร้างเอนไซม์ *chitinase* ได้ในระดับปานกลาง ได้แก่ เชื้อรา *Colletotrichum* spp. (ยกเว้น Co 221-1 ซึ่งสร้างได้ในระดับต่ำ) และเชื้อรา *Alternaria* spp. ทุกไอโซเลท มีขนาดของโซนสีม่วง 2.1-4 ซม. ส่วนที่เหลือจำนวน 4 ไอโซเลท ไม่พบการสร้างเอนไซม์ดังกล่าวเลย ได้แก่ *Helminthosporium* sp. (He 21-4), *Nigrospora* spp. (Ni 11-1 และ Ni 12-4), *Pestalotia* sp. (Pe 21-3) และ เชื้อรา Unknown (Table 2, Figure 1) จากการทดลองครั้งนี้ เป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่ง ที่พบว่าเชื้อราสาเหตุโรคพืช ได้แก่ *Colletotrichum* spp. และ *Alternaria* spp. สามารถสร้างเอนไซม์ *chitinase* ได้ ทั้ง ๆ ที่การสร้างเอนไซม์ดังกล่าวมักจะพบเฉพาะในกลุ่มของเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. (Agrawal and Kotasthane, 2012) และกลุ่มของเชื้อราที่ไม่เป็นสาเหตุของโรค เช่น non-pathogenic *Pythium* spp. (Talubnak *et al.*, 2015) อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาเอนไซม์ดังกล่าวข้างต้น พอที่จะสามารถนำเชื้อราไอโซเลทนั้น ๆ ไปศึกษาในการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์ได้

จากการศึกษาเกี่ยวกับการสร้างเอนไซม์ในครั้งนี้ทำให้ทราบประเด็นเพิ่มเติม คือ เชื้อราสกุล (genus) เดียวกันถึงแม้จะแยกได้มาจากไม้ประดับต่างชนิดกัน (ต่างไอโซเลท) ก็ยังคงมีลักษณะการสร้างเอนไซม์ (cellulase, pectinase และ chitinase) ที่เหมือนกัน

Table 2 Production of cellulase, pectinase and chitinase by necrotrophic fungi on solid media.

Strain		Cellulase ^{1/}	Pectinase ^{1/}	Chitinase ^{2/}
Control	negative	-	-	-
	positive	++++	++++	++++
<i>Alternaria</i> spp.	Al 21-1	+	+	++
	Al 12-1	+	+	++
<i>Bipolaris</i> sp.	Bi 21-1	+	-	+
<i>Colletotrichum</i> spp.	Co 11-4	+	-	++
	Co 12-2	+	-	++
	Co 13-1	+	-	++
	Co 14-1	+	-	++
	Co 15-1	+	-	++
	Co 16-1	+	-	++
	Co 17-2	+	-	++
	Co 28-2	+	-	++
	Co 19-1	+	-	++
	Co 210-1	+	-	++
	Co 211-1	++	-	+
	Co 112-3	+	-	++
	Co 113-1	+	-	++
	Co 214-4	+	-	++
	Co 115-1	+	-	++
	Co 216-1	+	-	++
	Co 117-2	+	-	++
	Co 118-1	+	-	++
	Co 119-3	+	-	++
	Cu 21-1	+	+	+
	Cu 22-1	+	+	+
	Cu 13-1	+	+	+
	Cu 14-1	+	+	+
<i>Helminthosporium</i> sp.	He 21-4	+	+	-
<i>Nigrospora</i> spp.	Ni 11-1	+	+	-
	Ni 12-4	+	-	-
<i>Pestalotia</i> sp.	Pe 21-3	+	+	-
Unknown	Un 21-1	+	+	+
	Un 22-1	+	+	+

^{1/} -, +, ++, +++, +++++ represent enzyme production from absence to high regarding HC value.

^{2/} -, +, ++, +++, +++++ represent enzyme production from absence to high categorized based on relative increase in diameter as well as intensity of purple color on colloidal chitin medium.

Isolate	Cellulase	Pectinase	Chitinase	Isolate	Cellulase	Pectinase	Chitinase
negative				Co 113-1			
positive				Co 214-4			
Al 21-1				Co 115-1			
Al 12-1				Co 216-1			
Bi 21-2				Co 117-2			
Co 11-4				Co 118-1			
Co 12-2				Co 119-3			
Co 13-1				Cu 21-1			
Co 14-1				Cu 22-1			
Co 15-1				Cu 13-1			
Co 16-1				Cu 14-1			
Co 17-2				He 21-4			
Co 28-2				Ni 11-1			
Co 19-1				Ni 12-4			
Co 210-1				Pe 21-3			
Co 211-1				Un 21-1			
Co 112-3				Un 22-1			

Figure 1 The hydrolyzed zone of cellulolytic, pectinolytic as well as purple color zone of chitinolytic enzymes by necrotrophic fungi on medium supplemented with CMC, pectin and colloidal chitin, respectively.

การทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรค (Pathogenicity test)

จากการทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคของเชื้อราที่แยกได้ จำนวน 32 ไอโซเลท โดยวิธี Detached leaf test พบว่า ในภาพรวม เชื้อราทดสอบทุกไอโซเลท ยกเว้น Co 11-4 และ Un 21-1 สามารถก่อให้เกิดโรคได้อย่างชัดเจน โดยกลุ่มแรกเป็นเชื้อราที่ทดสอบกับพืชอาศัยเดิม (original host) จำนวน 7 วงศ์พืช (เนื่องจากในพืชวงศ์นั้น แยกเชื้อราสาเหตุโรคได้ เพียง 1 ไอโซเลท) ได้แก่ เชื้อรา *Colletotrichum* spp. 6 ไอโซเลท (Co 113-1, Co 115-1, Co 117-2, Co 214-4 และ Co216-1), *Curvularia* sp. (Cu 14-1) และ *Alternaria* sp. (Al 12-1) แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค (DI) ได้สูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ และมีความรุนแรงของโรคอยู่ในช่วง 13.8-50.2 เปอร์เซ็นต์ แต่มีเพียงไอโซเลทเดียว คือ Co214-4 ที่แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 66 เปอร์เซ็นต์ และมีความรุนแรงของโรค 13 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะเห็นได้ว่าเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สามารถก่อให้เกิดโรคกับไม้ประดับที่ทดสอบได้หลายชนิด (Table 3) และใกล้เคียงกับการรายงานของ Dicklow (2013) ที่กล่าวว่า เชื้อรา *Colletotrichum* spp. และ *Alternaria* spp. เป็นเชื้อราสาเหตุโรคที่สำคัญของไม้ดอกไม้ประดับ เนื่องจากเชื้อราดังกล่าวมีพืชอาศัยกว้าง จึงสามารถเข้าทำลายไม้ดอกไม้ประดับได้หลายชนิด สำหรับกลุ่มที่สอง เป็นเชื้อราที่แยกได้มาจากไม้ประดับหลายชนิดแต่อยู่ในวงศ์พืชเดียวกัน เวลาทดสอบจึงต้องมีการกำหนดพืชตัวแทนในแต่ละวงศ์พืช เพื่อใช้เป็นพืชทดสอบ พบว่า ในภาพรวม เชื้อราทุกไอโซเลทที่ทดสอบในแต่ละวงศ์พืช สามารถก่อให้เกิดโรคกับพืชตัวแทน (given host) ได้รุนแรง โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค (DI) สูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ตัวอย่างเช่น วงศ์พืช Araceae ที่มีคทาเงิน (*Ag. modestum*) เป็นพืชทดสอบ พบว่า เชื้อรา *Colletotrichum* spp. 9 ไอโซเลท (Co19-1, Co13-1, Co14-1, Co 15-1, Co 16-1, Co 17-2, Co 28-2, Co 210-1 และ Co 211-1) และ *Nigrospora* sp. (Ni 11-1) สามารถก่อให้เกิดโรคได้สูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ (DI) และมีความรุนแรงโรคอยู่ในช่วง 16-45 เปอร์เซ็นต์ มีเพียง Co211-1 เท่านั้น ที่ก่อให้เกิดโรค (DI) 50 เปอร์เซ็นต์ สำหรับในพืชวงศ์อื่นๆ ผลการทดลองเป็นไปในทิศทางเดียวกัน มีเพียงในวงศ์ Palmae ที่มีหมากแดง (*Cy. renda*) เป็นพืชทดสอบ เท่านั้นที่เชื้อราทดสอบทุกไอโซเลท ได้แก่ *Colletotrichum* spp. (Co 118-1 และ Co 119-3), *Nigrospora* sp. (Ni 12-4) และ *Helminthosporium* sp. (He 21-4) ก่อให้เกิดโรคได้เพียง 66 เปอร์เซ็นต์ และมีความรุนแรงของโรค 13.19-32.81 เปอร์เซ็นต์ (Table 3) จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าเชื้อราที่แยกมาจากไม้ประดับต่างชนิดกันแต่อยู่ในวงศ์พืชเดียวกันมีแนวโน้มที่จะเข้าทำลายไม้ประดับชนิดอื่นในวงศ์เดียวกันที่ไม่ได้เป็นพืชอาศัยที่แท้จริง (original host) ได้ ดังจะเห็นได้จากเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่สามารถก่อให้เกิดโรคได้สูงและมีความรุนแรงของโรคไม่แตกต่างกัน ซึ่งใกล้เคียงกับการรายงานของ Kumara and Rawal (2004) ที่ได้ระบุว่า เชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่แยกได้จากมะละกอ สามารถก่อโรคกับพืชอาศัยอื่น ๆ ได้หลายชนิด เช่น กลั้ว มะม่วง องุ่น และทับทิมได้ ในขณะที่ Phoulivong et al. (2012) รายงานว่า เชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่แยกจากพริก มะละกอ ส้ม ชมพู และมะม่วง สามารถก่อโรคข้ามพืชอาศัยได้เช่นกัน

Table 3 Pathogenicity test of necrotrophic fungi causing foliar disease on ornamental plants.

Tested plant (Family)	Isolate of necrotrophic fungi	DI ^{1/} (%)	DS ^{2/} (%)	Tested plant (Family)	Isolate of necrotrophic fungi	DI (%)	DS (%)
Group I: tested on original host				Group II: tested on given host			
<i>Ae. fasciata</i> (Bromeliaceae)	Control Co 113-1	0b ^{3/} 100a	0b 50.21a	<i>Co. fruticosa</i> (Agavaceae)	Control Co 12-2	0c 100a	0c 32.81a
<i>Te. catappa</i> (Combretaceae)	Control Co 214-4	0b 66.67a	0b 13.85a		AI 21-1 Co 11-4	66.67b 0c	16.56b 0c
<i>Heliconia</i> spp. (Heliconiaceae)	Control Cu 14-1	0b 100a	0b 77.08a		Un 21-1	0c	0c
<i>Ch. comosum</i> (Liliaceae)	Control Co 115-1	0b 100a	0b 37.6a	<i>El. guineensis</i> (Arecaceae)	Control Cu 21-1 Co 112-3	0b 100a 100a	0b 42.81a 44.69a
<i>Nymphaea</i> spp (Nymphaeaceae)	Control AI 12-1	0b 100a	0b 100a	<i>Ag. modestum</i> (Araceae)	Control Co 19-1	0c 100a	0d 24.48bc
<i>Dendrobium</i> sp. (Orchidaceae)	Control Co 216-1	0b 100a	0b 47.5a		Co 13-1 Co 14-1	100a 100a	45.1a 23.65bc
<i>Ne. exaltata</i> (Olandraceae)	Control Co 117-2	0b 100a	0b 17.81a		Co 15-1 Co 16-1 Co 17-2 Co 28-2 Co 210-1 Co 211-1 Ni 11-1	100a 100a 100a 100a 100a 50b 100a	24.48bc 22.5bc 18.23bc 21.56bc 29.27b 7.5d 16.25bc
				<i>As. nidus</i> (Aspleniaceae)	Control Cu 22-1 Pe 21-3	0b 100a 100a	0c 20b 31.15a
				<i>Co. speciosus</i> (Costaceae)	Control Cu 13-1 Bi 21-2	0b 100a 100a	0c 52.19a 38.13b
				<i>Cy. renda</i> (Plamae)	Control Ni 12-4 Co 118-1 Co 119-3 He 21-4 Un 22-1	0b 66.67b 66.67b 66.67b 0b	0b 21.88a 32.81a 13.85ab 32.19a 0b

^{1/}DI = Disease incidence, ^{2/}DS = Disease severity^{3/}Values are means of five replicates. Values in each column with in each plant family followed by the same letter are not significantly different according to Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ($P > 0.05$).

สรุปผลการศึกษา

จากการแยกและจัดจำแนกเชื้อราสาเหตุโรคที่มีลักษณะอาการโรคคล้ายกันจากไม้ประดับ 31 ชนิด (13 วงศ์พืช) พบเชื้อราทั้งหมด 32 ไอโซเลท โดยลักษณะอาการใบไหม้แอนแทรคโนสแยกได้จำนวน 21 ไอโซเลท ได้แก่ เชื้อรา *Colletotrichum* spp. 17 ไอโซเลท, เชื้อรา *Curvularia* spp. 2 ไอโซเลท, และเชื้อรา *Nigrospora* spp. 2 ไอโซเลท ส่วนกลุ่มอาการใบจุดแยกได้เชื้อรา *Alternaria* spp. 2 ไอโซเลท, เชื้อรา *Bipolaris* sp. 1 ไอโซเลท, เชื้อรา *Colletotrichum* spp. 2 ไอโซเลท, เชื้อรา *Curvularia* spp. 2 ไอโซเลท, เชื้อรา *Helminthosporium* sp. 1 ไอโซเลท, เชื้อรา *Pestalotia* sp. 1 ไอโซเลท และเชื้อรา Unknown 2 ไอโซเลท จากนั้นทดสอบการสร้างเอนไซม์ cellulase, pectinase และ chitinase ของเชื้อราที่แยกได้ บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง พบว่า เชื้อราทุกไอโซเลทสามารถสร้างเอนไซม์ cellulase ได้ในระดับต่ำ (HC value น้อยกว่า 1) ในขณะที่การทดสอบการสร้างเอนไซม์ pectinase พบเชื้อรา 11 ไอโซเลท ที่สร้างเอนไซม์ดังกล่าวได้ คือ *Alternaria* spp. (AI 21-1 และ AI 12-1), *Curvularia* spp. (Cu 21-1, Cu 22-1, Cu 13-1 และ Cu 14-1), *Helminthosporium* sp. (He 21-4), *Nigrospora* sp. (Ni 12-4), *Pestalotia* sp. (Pe 21-3) และ Unknown (Un 21-1 และ Un 22-1) แต่ไม่พบการสร้างเอนไซม์ pectinase ในเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ทุกไอโซเลท ส่วนการสร้างเอนไซม์ chitinase พบว่าเชื้อรา *Colletotrichum* spp. และ *Alternaria* spp. ทุกไอโซเลท สามารถสร้างเอนไซม์ดังกล่าวได้ เมื่อนำไปทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคของเชื้อราที่แยกได้กับพืชในวงศ์เดียวกันนั้น พบว่าเชื้อราที่ทดสอบส่วนใหญ่สามารถก่อโรคได้ (เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 66-100 เปอร์เซ็นต์) และมีความรุนแรงของโรค อยู่ในช่วง 16-100 เปอร์เซ็นต์ ยิ่งไปกว่านั้นแล้วยังพบอีกว่า เชื้อรา *Colletotrichum* spp. ทุกไอโซเลท สามารถก่อให้เกิดโรคกับพืชตัวแทนที่กำหนดได้ และมีความรุนแรงไม่แตกต่างกัน ซึ่งน่าจะเป็นข้อที่ควรระวัง ไม่ควรปลูกไม้ประดับวงศ์เดียวกันในพื้นที่นั้น ๆ เนื่องจากเชื้อราดังกล่าวสามารถเข้าทำลายไม้ประดับในวงศ์เดียวกันได้ จากที่กล่าวมาข้างต้น พอสรุปได้ว่า เชื้อราสกุลเดียวที่แสดงอาการโรคคล้ายกันจากพืชต่างชนิดกันนั้น มีลักษณะการสร้างเอนไซม์ได้เหมือนกัน แต่อย่างไรก็ตาม ในการทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งนั้นไม่มีข้อจำกัด จึงควรทำการทดสอบในอาหารเหลว เพื่อให้ผลของการสร้างเอนไซม์แสดงได้ชัดเจนยิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

- Agrawal, T. and A.S. Kotasthane. 2012. Chitinolytic assay of indigenous *Trichoderma* isolates collected from different geographical locations of Chhattisgarh in Central India. *Springer Plus* 1(73): 1-10.
- Anand, T., R. Bhaskaran, T. Raguchander, G. Karthikeyan, M. Rajesh and G. Senthilraja. 2008. Production of cell wall degrading enzymes and toxins by *Colletotrichum capsici* and *Alternaria alternata* causing fruit rot of chillies. *Journal of Plant Protection Research* 48(4): 437-451.
- Coates, L., T. Cooke and L. Forsberg. 2016. The biology and management of *Colletotrichum* diseases in production nurseries. Available: https://www.ngia.com.au/Attachment?Action=Download&Attachment_id=1829. Accessed Dec. 23, 2017.
- Dean, R.A. and E. Timberlake. 1989. Production of cell wall-degrading enzymes by *Aspergillus nidulans*: a model system for fungal pathogenesis of plants. *American Society of Plant Physiologists* 1:265-273.
- Dicklow, M.B. 2013. *Leaf spot diseases of floricultural crops*. Available: <https://ag.umass.edu/greenhouse-floriculture/fact-sheets/leaf-spot-diseases-of-floricultural-crops>. Accessed Dec. 23, 2017.
- Fernando, T.H.P.S., C.K Jayasinghe and R.L. Wijesundera.C. 2001. Cell wall degrading enzyme secretion by *Colletotrichum acutatum*, the causative fungus of secondary leaf fall of *Hevea brasiliensis*. *Mycological Research* 2: 195-201.
- Hubballi, M., A. Sornakili, S. Nakkeeran, T. Anand, and T. Raguchader. 2011. Virulence of *Alternaria alternata* infecting noni associated with production of cell wall degrading enzymes. *Journal of Plant Protection Research* 51(1): 87-92.

- Kasana, R.C., R. Salwan, H. Dhar, S. Dutt and A. Gulati. 2008. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using gram's iodine. *Current Microbiology* 57: 503-507.
- Kittimorakul, J., C. Pomsuriya, A. Sunpapao and V. Petcharat. 2013. Survey and incidence of leaf blight and leaf spot diseases of oil palm seedling in southern Thailand. *Plant Pathology Journal* 12(3): 149-153.
- Kumara, K.L.W. and R.D. Rawal. 2004. Cross infectivity and survivability of *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from papaya. In *Proceedings of The Second Academic sessions* : 27-32.
- Lorena, H., P. Carlos, C. Horacio, M.Z. Guadalupe, A. Ismael and L. Everardo. 2007. Comparison of fungal growth and production of extracellular pectin lyase activity by pathogenic and non-pathogenic races of *Colletotrichum lindemuthianum* cultivated under different conditions. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 70: 88-95.
- Pegg, K., J. Duff and A. Manners. 2016. *Alternaria* diseases in production nurseries. Available: https://www.ngia.com.au/Attachment?Action=Download&Attachment_id=1838. Accessed Dec. 23, 2017.
- Phoulivong, S., E.H.C. McKenzie and K.D. Hyde. 2012. Cross infection of *Colletotrichum* species; a case study with tropical fruits. *Current Research in Environmental & Applied Mycology* 2(2): 99-111.
- Priya, V. and V Sashi. 2014. Pectinase enzyme producing microorganisms. *International Journal of Scientific and Research Publications* 4(3): 1-4.
- Sunpapao, A., J. Kittimorakul and C. Pomsuriya. 2014. Disease note: identification of *Curvularia oryzae* as cause of leaf spot disease on oil palm seedling in nurseries of Thailand. *Phytoparasitica* 42(4): 529-533.
- Taechapoempol, K., T. Sreethawong, P. Rangsunvigit, W. Namprohm, B. Thamprajamchit, S. Rengpipat and S. Chavadej. 2011. Cellulase-producing bacteria from Thai higher termites, *Microcerotermes* sp.: enzymatic activities and ionic liquid tolerance. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 164: 204-219.
- Talubnak, C., Parinthawong, N. and T. Jeanaksorn. 2015. *In Vitro* Production of Cell Wall Degrading Enzymes by *Pythium* Species Isolated from Asymptomatic and Symptomatic Lettuce Root. 165-167. In: *Proceeding 2nd International symposium on Agricultural Technology (ISAT)*. July 1-3, 2015. Pattaya Thailand.

วันรับบทความ (Received date) : 28 ธ.ค. 60

วันแก้ไขบทความ (Revised date) : 25 ต.ค. 61

วันตอบรับบทความ (Accepted date) : 13 พ.ย. 61