



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ชีวภัณฑ์ป้องกันโรคผลเน่าราเขียวเพนิซิลเลียม สำหรับเก็บรักษาผล
ส้มโชกุนหลังเก็บเกี่ยว

**Biological Control Agents for Postharvest Protection of Citrus Fruit
from Penicillium Rot Disease**

โดย

ผศ.ดร.วิจิตรา ลีละศุภกุล และคณะ

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

กรกฎาคม พ.ศ. 2557

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ชีวภัณฑ์ป้องกันโรคผลเน่าราเขียวเพนิซิลเลียม สำหรับเก็บรักษาผล
ส้มโชกุนหลังเก็บเกี่ยว

**Biological Control Agents for Postharvest Protection of Citrus
Fruit from Penicillium Rot Disease**

คณะผู้วิจัย

สังกัด

- | | |
|-----------------------------|--|
| 1. ผศ.ดร.วิจิตรา ลีละสุภกุล | ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา |
| 2. รศ.ดร.สมศิริ แสงโชติ | ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
บางเขน กรุงเทพมหานคร |
| 3. นางสาว สุมิตรา แสงวนิชย์ | สาขาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยอิสลามยะลา วิทยาเขตปัตตานี อ.ยะรัง
จ.ปัตตานี |

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.และมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

เชื้อรา *Penicillium digitatum* เป็นเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าราเขียวของผลส้ม พบหลังการเก็บเกี่ยวของผลส้มตั้งแต่ในสวนจนถึงโรงบรรจุ การวิจัยเพื่อใช้การควบคุมแบบชีววิธีร่วมกันระหว่างเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ยีสต์ และแบคทีเรีย และสารเคมีที่ใช้ในชีวิตประจำวันโซเดียมไบคาร์บอเนต หลังการคัดเลือกพบว่า *Bacillus subtilis* ABS-S14 และโซเดียมไบคาร์บอเนตที่ความเข้มข้น 1-2% (w/v) สามารถยับยั้งการเจริญเส้นใยและการออกสปอร์ของเชื้อรา *P. digitatum* ได้ 100% ขณะที่ *Pichia guilliermondii* BCC5389 ที่ 10^6 ถึง 10^8 เซลล์/มิลลิลิตร ยับยั้งได้ 93.89% และ 100% ตามลำดับสำหรับการทดลองบนผลส้ม เมื่อใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทั้งสองชนิดร่วมกันพบว่าสามารถยับยั้งโรคได้อย่างสมบูรณ์ จากการตรวจสอบการเจริญครอบคลุมพื้นที่ของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์บนบาดแผลระหว่างวันแรกจนกระทั่งวันที่ 6 พบว่า ปริมาณเชื้อยีสต์ *P. guilliermondii* เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ในขณะที่เชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* มีการเพิ่มขึ้นเล็กน้อยใน 3 วันหลังการทำบาดแผลและปริมาณเชื้อจะยังคงที่ในช่วงการบ่มเชื้อ การใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ร่วมกันไม่ส่งผลกระทบต่อคุณภาพของผลส้มเมื่อบ่มส้มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ผสมสามารถชักนำเอนไซม์ไคติเนสและเบต้า-1,3-กลูคาเนสบนผลส้มได้ที่ 24 ชั่วโมงแรก และ ระดับเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสในส่วนเนื้อเยื่อผิวส้มที่ปลูกเชื้อร่วมกันระหว่าง *P. guilliermondii* BCC 5389 และ *B. subtilis* ABS-S14, และ *P. digitatum* ให้ผลเช่นเดียวกันกับที่มี *P. digitatum* เพียงอย่างเดียว ซึ่งมีการสร้างเอนไซม์ไคติเนสสูงที่สุดที่ 12 ถึง 48 ชั่วโมง การแสดงออกของยีนด้วยการวัดปริมาณการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอของยีนไคติเนส (*CHI*) และเบต้า-1,3-กลูคาเนส (*GLU*) จากเปลือกผลส้ม การแสดงออกของยีน *GLU* ชักนำโดย *P. digitatum* หรือเชื้อยีสต์และแบคทีเรีย เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วที่ 3 ชั่วโมงหลังปลูกเชื้อราเช่นเดียวกับที่พบในระดับการสังเคราะห์ยีน *CHI* ในผิวส้ม

คำสำคัญ: *Penicillium digitatum*, *Bacillus subtilis*, จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ โซเดียมไบคาร์บอเนต ผลส้ม เอนไซม์ไคติเนส เบต้า-1,3-กลูคาเนส

Abstract

Penicillium digitatum, a postharvest pathogen of green mold rot of citrus fruit generally contaminates in orchard through packing house. This study aims to use mixtures of antagonistic yeast and bacteria in combination with baking soda (sodium bicarbonate) as a biological control product to control fruit rot pathogen in citrus during postharvest storage. After screening for the antifungal activity *P. guilliermondii* BCC5389 and *Bacillus subtilis* ABS-S14 showed strong antagonistic activity toward the fungus pathogen *in vitro* and *in vivo*. *B. subtilis* ABS-S14 and 1-2% NaHCO₃ (w/v) completely inhibited mycelial growth and spore germination of *P. digitatum*. At 10⁶ to 10⁸ cell/ml of *P. guilliermondii* BCC5389 inhibited fungal mycelium growth and spore germination of 93.89% and 100%, respectively. A sodium bicarbonate solution has no effect on growth of both antagonistic microorganisms. The potential of using *P. guilliermondii* BCC 5389 or *B. subtilis* ABS-S14 by themselves or in combination for the control *P. digitatum* in citrus, and their effects on postharvest quality of fruit were investigated. . Fruit efficacy test revealed that the percentage of disease incidence on fruits treated with the combined antagonists was remarkably reduced. Rapid colonization of *P. guilliermondii* was observed in the wounds during the first day to 6 days at 25°C, whereas *B. subtilis* increased marginally over 3 days. The populations then stabilized for the remaining incubation period. The combination did not impair any of the quality parameters of fruit after storage at 25°C for 7 days. The mixtures of antagonist were clearly induced activity of chitinase and β -1,3-glucanase enzymes in the citrus rind within 24 h. Interestingly, inoculation with *P. digitatum* alone also induced the elicitation of both enzyme activities in the citrus flavedo tissues during 12-48 h. In parallel, the expression of genes that coded for glucanases as well as chitinase, were enhanced by the antagonists in the citrus rind during the first 3 h following pathogen inoculation.

Keywords: *Penicillium digitatum*, *Bacillus subtilis*, Antagonistic microorganism, Sodium bicarbonate, chitinase, β -1,3-glucanase

Executive Summary

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ส้มจัดเป็นผลไม้เศรษฐกิจของประเทศไทยที่มีมูลค่าการส่งออกมากในรูปของผลไม้สดและแปรรูป คิดเป็นมูลค่าประมาณ 1,988.9 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2552) ผลส้มจะมีอัตราการเสื่อมสภาพเร็ว ซึ่งเกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ ในระหว่างกระบวนการเก็บรักษาและขนส่ง ดังนั้น โรคหลังการเก็บเกี่ยวของผลส้มจึงเป็นข้อจำกัดต่อระยะเวลาการเก็บรักษาในตลาด ซึ่งจำเป็นต้องควบคุมโรคโดยใช้สารเคมี โรคราสีเขียวเกิดจากเชื้อ *Penicillium digitatum* ซึ่งเป็นหนึ่งในโรคหลังการเก็บเกี่ยวของผลส้ม ที่เกิดในแหล่งปลูกและจำหน่าย ในระยะขนส่ง ซึ่งในการควบคุมและป้องกันโรคส่วนใหญ่เกษตรกรผู้ปลูกนิยมใช้สารเคมีกำจัดเชื้อราที่ใช้นั้นต้องมีการสั่งซื้อมาจากต่างประเทศ มีราคาแพงแล้วยังเกิดอันตรายต่อสุขภาพของเกษตรกรและผู้บริโภค และยังก่อให้เกิดเชื้อราดื้อยาด้วย การปนเปื้อนของสารเคมีต่อสภาพแวดล้อมและสุขภาพของผู้บริโภค การควบคุมและการป้องกันกำจัดโรคพืชภายหลังการเก็บเกี่ยวจะต้องกระทำต่อเนื่องกับการป้องกันในระยะก่อนเก็บเกี่ยว และถูกใช้เพื่อขัดขวางการค้ำหากผู้ประกอบการเคลือบผิวผลส้มด้วย wax และยาฆ่าเชื้อราชนิดต่างๆ แล้วก็ตาม นักวิจัยจึงได้พยายามหาวิธีการควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยวของส้มนี้โดยวิธีที่ปลอดภัย ซึ่งปัจจุบันการควบคุมโดยชีววิธีเป็นวิธีการที่ถูกนำมาใช้และมีการศึกษาหาจุลินทรีย์ปฏิกิริยามาเพื่อใช้ควบคุมโรคมากยิ่งขึ้น เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าวการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีซึ่งศึกษาอย่างแพร่หลายในพืชหลายชนิดและสามารถนำจุลินทรีย์เชื้อราและแบคทีเรียที่ไม่ก่อให้เกิดโรคต่อคนและสัตว์มาพัฒนาและใช้ประโยชน์ในการควบคุมโรคที่มีสาเหตุมาจากทั้งเชื้อราและแบคทีเรีย โดยเฉพาะอย่างยิ่งการประยุกต์ใช้กับการเก็บรักษาหรือควบคุมโรคระยะการเก็บเกี่ยวและหลังการเก็บเกี่ยว ช่วยลดค่าใช้จ่ายของเกษตรกรแล้วยังช่วยลดปัญหาทางสิ่งแวดล้อมเนื่องมาจากการใช้สารเคมี และลดการตกค้างในผลผลิต เพิ่มความปลอดภัยแก่ผู้บริโภค จุลินทรีย์ปฏิกิริยาที่นิยมใช้กันมากคือ *B. subtilis* และ yeast ควบคุมโรคพืชได้หลายชนิดในสิ่งแวดล้อมต่างกัน ปัจจุบันมีการพัฒนาอยู่ในรูปของผลิตภัณฑ์ทางการค้า เช่น Epic, Kodial, System3, รูปแบบของผลิตภัณฑ์มีหลากหลายแบบ เช่น เป็นผง หรือใช้เป็นสารเคลือบผิว แต่ละผลิตภัณฑ์สามารถใช้ควบคุมโรคได้แตกต่างกัน กลไกการต้านทานโรคโดยเร่งการเติบโตของพืช จึงจัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญของพืช Plant Growth Promoting Rhizosphere (PGPR) สร้างสารปฏิชีวนะ กระตุ้นให้พืชสร้างภูมิคุ้มกัน (systemic resistance) สร้างสารยับยั้งเชื้อก่อโรค การผลิตสารทั้งทางตรงและทางอ้อมล้วนส่งผลให้พืชเกิดกระบวนการต้านทานโรค โดยกระตุ้นให้เกิดการสร้าง Pathogenesis-related protein (PR-protein) เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเหนี่ยวนำการต้านทานโรคเช่น Peroxidase, Phenylalanine ammonia lyase, Chitinase, β -1,3-Glucanase นำมาใช้ในการควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยว

2. วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. คัดเลือกสายพันธุ์ yeast และ Bacillus ที่มีศักยภาพในการควบคุมโรคผลเน่าของส้มบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ
 2. ตรวจวัดศักยภาพการควบคุมโรคผลเน่าของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์บนผลส้ม
 3. ตรวจวัดคุณภาพผลส้มภายใต้สภาวะการเก็บในเชิงการค้าเมื่อใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ควบคุมโรคผลเน่า
 4. ศึกษาการเหนี่ยวนำความต้านทานของผลส้มในการตอบสนองต่อเชื้อโรค
 5. ศึกษาการกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองการป้องกันโรคในผลส้ม
 6. พัฒนาสูตรชีวภัณฑ์จากเอนโดสปอร์ของแบคทีเรีย *B. subtilis* และยีสต์
3. ระเบียบวิธีวิจัย
1. การเตรียมส้มโชกุน
 2. การเตรียมเชื้อรา ทำการแยกเชื้อรา *P. digitatum* จากผลส้มที่เป็นโรคเน่าเขียว เตรียมสปอร์เชื้อรา
 3. การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ 5 สายพันธุ์ *C. guilliermondii* BCC 5389 *C. humicola* BCC 7701 *C. utilis* *C. tropicalis* และ *P. membranaefaciens*. และเตรียมเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ ABS-S14 และ 155 คัดเลือกเชื้อยีสต์ปฏิปักษ์ควบคุมเชื้อรา *P. digitatum* โดยวิธี dual culture วัด%การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา
 4. ศึกษาเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อการงอกสปอร์ของเชื้อรา *P. digitatum* บนผลส้ม ทำแผล หยด 2 % sodium bicarbonate imazalil 500 ppm เชื้อยีสต์ *B. subtilis* และเชื้อผสม หยดสปอร์ *P. digitatum* ตรวจดูแผล
 5. ศึกษาปริมาณและการเพิ่มจำนวนของเชื้อยีสต์บริเวณบาดแผล
วัดประชากรเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ตั้งแต่วันแรกจนถึงวันที่ 6 โดยเจาะผลส้ม บด spread บนอาหาร NYDA เวลา 2 วัน นับจำนวนโคโลนี คำนวณความหนาแน่น $\log_{10}$ CFU/wound. วางแผนการทดลองแบบ RCBD ทำ 3 ซ้ำ
 6. ศึกษาผลของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีต่อคุณภาพของผลส้ม
ประเมินคุณภาพผลส้มหลังจากการเก็บรักษา หาน้ำหนักสูญเสีย วัดสี หา% ความนิ่มเนื้อ, TSS และ TA
ศึกษาแอคติวิตีของเอนไซม์ไคติเนสและเบต้า 1,3 กลูคาเนส บนผลส้มโดยวิธี colorimetry และโดยวิธี gel electrophoresis
 7. ศึกษาการแสดงออกของยีน PR protein สกัด RNA จากเปลือกผลส้มปริมาณ 2 กรัม หาความเข้มข้นของ total RNA ที่สกัดได้ แยกสารสกัด RNA โดย agarose-formaldehyde gels และทำ Northern blot hybridization
 9. . การเตรียมสูตรชีวภัณฑ์จากเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* และยีสต์ เตรียมเอนโดสปอร์ *B. subtilis* และยีสต์ แบบสารเคลือบ (Emulsion) จากเอนโดสปอร์ของแบคทีเรีย *B. subtilis* และยีสต์

ทดสอบประสิทธิภาพของสูตรชีวภัณฑ์ ต่อยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. digitatum* บนจานอาหาร
บนผลส้ม

4. แผนการดำเนินงานวิจัยตลอดโครงการในแต่ละช่วง 6 เดือน

กิจกรรมหรือขั้นตอนการ ดำเนินงาน	ปีที่ 1		ปีที่ 2		ปีที่ 3	
	เดือนที่ 1-6	เดือน ที่ 7-12	เดือนที่ 1-6	เดือนที่ 7-12.	เดือนที่ 1-6	เดือนที่ 7-12
1. คัดเลือกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา <i>P. digitatum</i> (Pd) บนจานอาหาร เลี้ยงเชื้อ	↔					
2. ทดสอบฤทธิ์ของเชื้อจุลินทรีย์ ปฏิปักษ์ต่อการงอกของสปอร์เชื้อรา Pd ในอาหารเหลว	↔					
3. ทดสอบฤทธิ์ของเชื้อจุลินทรีย์ ปฏิปักษ์ต่อการงอกของสปอร์เชื้อรา Pd บนผลส้ม		↔				
4. ติดตามปริมาณของเชื้อยีสต์ที่ใช้ หยดบริเวณบาดแผลบนผลส้ม		↔				
5. ตรวจอาการแสดงของโรคและหา เปอร์เซ็นต์ผลเน่า			↔			
6. ทดสอบคุณภาพผลส้ม			↔			
7. หาแอคติวิตีของเอนไซม์การ ตอบสนองของผลส้ม					↔	↔
8. ศึกษาการแสดงออกของยีน ตอบสนองของผลส้ม					↔	↔
9. เตรียมสูตรชีวภัณฑ์จากเอนโดสปอร์ ของแบคทีเรีย ทดสอบประสิทธิภาพ บนจานอาหารและผลส้ม				↔		
10. วิเคราะห์ประเมินผลสรุปและ เขียนรายงาน						↔

5. Output

ปีที่	ผลที่คาดว่าจะได้รับ
1	-การใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ยีสต์และแบคทีเรียเพื่อควบคุมโรคผลเน่าราเขียว (<i>Penicillium digitatum</i>) ของส้มเป็นผลงานที่สามารถนำเสนอในที่ประชุมระดับประเทศและตีพิมพ์
2	-คุณภาพและการต้านทานโรคของผลส้มหลังการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์เป็นผลงานที่สามารถนำเสนอในที่ประชุมระดับนานาชาติและตีพิมพ์วารสาร Postharvest Biology Technology (impact factor 2.0)
3	-กลไกการต้านทานโรคของผลส้มหลังการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์และสูตรชีวภัณฑ์จาก จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ยีสต์และแบคทีเรียเพื่อควบคุมโรคผลเน่าราเขียว (<i>Penicillium digitatum</i>) ของส้ม ผลงานที่สามารถนำเสนอในที่ประชุมระดับนานาชาติและตีพิมพ์วารสาร Postharvest Biology Technology (impact factor 2.0) และ/หรือ World Journal of Microbiology and Biotechnology

6. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

การศึกษาในครั้งนี้จะได้จุลินทรีย์ชีวภัณฑ์ที่ควบคุมคุณภาพของผลไม้และโรคผลเน่าราเขียว สามารถพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ชีวภาพที่มีศักยภาพควบคุมโรคเน่าของผลส้มในระยะหลังเก็บเกี่ยว ประยุกต์เทคโนโลยีที่ได้นี้ใช้เก็บรักษาผลไม้หลังการเก็บเกี่ยวที่มีคุณภาพสูง ถ่ายทอดความรู้และวิธีการแก่ผู้ผลิต ผู้บริโภค ผู้ประกอบการด้านอาหารและสิ่งแวดล้อมโดยสอดคล้องกับการจัดการธุรกิจ เกษตรด้านอาหารที่ทันสมัยตามมาตรฐานที่กำหนดในประเทศและสากล

เนื้อหางานวิจัย

การคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์และ แบคทีเรียที่มีศักยภาพในการควบคุมโรคผลเน่าของส้มบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อได้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ คือ *Pichia guilliermondii* BCC 5389 และที่ความเข้มข้น 10^8 cell/ml สามารถยับยั้งการงอกสปอร์ของเชื้อรา *P. digitatum* ได้อย่างสมบูรณ์ การทดสอบเชื้อ *P. guilliermondii* ต่อการยับยั้งการงอกสปอร์ของเชื้อรา *P. digitatum* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose broth เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเมื่อผสมกับเชื้อยีสต์ที่ความเข้มข้น 10^8 cell/ml ไม่พบการงอกสปอร์ของเชื้อรา *P. digitatum* ขณะที่เชื้อ *P. guilliermondii* ความเข้มข้น 10^6 และ 10^7 cell/ml มีอัตราการงอกสปอร์ของเชื้อราไม่แตกต่างกับชุดควบคุมที่มีอัตราการงอกสปอร์เป็น 100%

การทดสอบการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *B. subtilis* ABS-S14 *P. guilliermondii* BCC5389 โซเดียมไบคาร์บอเนต (0.5, 1.0, 1.5, 2.0% w/v) และการนำมาใช้ร่วมกันเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. digitatum* สาเหตุโรคผลเน่าราเขียวของผลส้ม พบว่า *B. subtilis* ABS-S14 และโซเดียมไบคาร์บอเนตที่ความเข้มข้น 1-2% (w/v) สามารถยับยั้งการเจริญเส้นใยและการงอกสปอร์ของเชื้อรา *P. digitatum* ได้ 100% ขณะที่ *P. guilliermondii* BCC5389 ยับยั้งได้ 93.89% และ 100% ตามลำดับ สารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนตที่ความเข้มข้น 1-2% (w/v) ไม่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทั้งสองชนิดนี้ ดังนั้นจึงสามารถใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทั้งสองร่วมกับโซเดียมไบคาร์บอเนตในการควบคุมโรคเน่าราเขียวของผลส้มต่อไป

ประสิทธิภาพการควบคุมโรคของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์บนผลส้มศึกษาโดยทำแผลบนผลส้ม หยอด 2 % sodium bicarbonate สารเคมี imazalil ความเข้มข้น 500 ppm *P. guilliermondii* *B. subtilis* และ *P. guilliermondii* ผสมกับเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ ABS-S14 และ 155 ที่ความเข้มข้น 10^8 spores/ml เมื่อแห้ง หยอดสปอร์ของเชื้อรา *P. digitatum* ลงบนแผลส้มเป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่า *P. guilliermondii* ผสมกับ *B. subtilis* มีระดับการควบคุมโรคผลเน่าได้มากที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 0% และขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางแผลเท่ากับ 0 ซม. เมื่อเทียบกับชุดการทดลองอื่นๆ และชุดควบคุมซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 92.93 % และขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางแผลเท่ากับ 5.57 ซม. เมื่อศึกษาปริมาณและการเพิ่มจำนวนของเชื้อยีสต์ *P. guilliermondii* BCC 5389 ในบริเวณบาดแผลพบว่า ปริมาณ *P. guilliermondii* ในช่วงวันแรกมีค่า $\log_{10}$ CFU wound⁻¹ 8.0 และพบว่ามีจำนวนเพิ่มจำนวนในช่วงวันที่ 3 ถึง 9

ประเมินคุณภาพผลส้มทั้งก่อนและหลังการเก็บรักษา หาน้ำหนักสูญเสีย วัดสี หา% ความชื้น เนื้อ, TSS และ TA พบว่าประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทั้งสองและ/ร่วมกับ 2 b% sodium bicarbonate พบว่าไม่มีผลต่อคุณภาพผลส้มในด้านการสูญเสีย น้ำหนัก ความแน่นเนื้อ total soluble solids และ titratable acidity โดยมีปริมาณลดลงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับชุดควบคุม

การแสดงออกของยีนไคติเนสและเบต้า-1,3-กลูคาเนสบนผลส้มเมื่อกระตุ้นด้วยจุลินทรีย์ปฏิบัติ โดยการเจาะทำแผล (ลึกและกว้าง 3 mm.) กลางผลส้ม หยดสารละลายตะกอนของ *P. guilliermondii*, *B. subtilis*, *P. guilliermondii* และ *B. subtilis* ที่ความเข้มข้น 1×10^8 spores/ml บริเวณแผล สองชั่วโมง หลังจากนั้น หยดสารละลายตะกอนของ *P. digitatum* (1×10^4 spores/ml) ในแต่ละบาดแผล นำไปบ่ม โดยให้อยู่ในสภาวะที่มีความชื้นสัมพัทธ์สูง อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส สัม 10 ผลแทนข้าว 5 ข้าวในแต่ละ ทริทเมนต์ มีทั้งหมด 8 ทริทเมนต์ ทำการสกัดโปรตีนโดยวิธีสกัดเป็นผงแห้งอาซีโตนวัดปริมาณโปรตีน ด้วยวิธี Bradford (1976) นำเนื้อเยื่อเปลือกส้มบดด้วยอาซีโตนปริมาณ 1 กรัมละลายในโซเดียมอะซิ เตท บัฟเฟอร์ pH 5.0 ที่ความเข้มข้น 50 mM ปริมาตร 0.5 ml นำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยง อุณหภูมิ 4 องศา ทั้งตะกอนไป นำสารละลายใสมาตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวที่ 70% อุณหภูมิ 4 องศา เซลเซียส นำตะกอนมาละลายกลับด้วยสารละลายโซเดียมอะซิเตท บัฟเฟอร์ที่ความเข้มข้น 100 mM pH 5.0 และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการตรวจหาแอกติวิตีของเอนไซม์ไคติเนส และเบต้า-1,3-กลูคาเนสบนผลส้ม

ตรวจหาแอกติวิตีของเอนไซม์ไคติเนสดัดแปลงจากวิธีของ Wirth and Wolf (1990) โดยใช้สับ เสตรทคือ ไคติน นำสาร สกัดเอนไซม์ที่ เตรียมไว้ ผสม กับโซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 100 mM pH 5.2 นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยการ เติมกรดไฮโดรคลอริก ทำให้เย็นด้วยน้ำแข็ง และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm นำมาวัดค่าการดูดกลืน แสงที่ 550 nm คำนวณหน่วยแอกติวิตีของเอนไซม์ไคติเนสต่อมิลลิกรัมโปรตีนจากกราฟไคติเนสของ *Streptomyces griseus* (Krainsky) ที่บริสุทธิ์ Waksman & Henrici (C6137, Sigma) โดยหนึ่งยูนิตคือ ปริมาณของเอนไซม์เปลี่ยนไป 1 nmol product per minute. พบว่าการชักนำเอนไซม์ไคติเนสในทุกท ริทเมนต์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าระดับเอนไซม์ไคติเนสในทริทเมนต์ควบคุมที่ใช้ น้ำกลั่นอย่างเดียว เพิ่มขึ้น เล็กน้อยภายหลัง ที่บ่ม 24 ชั่วโมง ขณะเดียวกันที่ 12 ชั่วโมง พบว่าเอนไซม์ไคติเนสมีระดับเพิ่มขึ้นใน ทริทเมนต์อื่นๆ โดยแอกติวิตีของเอนไซม์ไคติเนสเพิ่มสูงสุดที่ 24 ชั่วโมงซึ่งพบในทริทเมนต์ที่ใช้ *P. guilliermondii* BCC 5389 และปลูกเชื้อ *P. digitatum* และลดลงที่ 72 ชั่วโมง ในส้อมที่มีการปลูกเชื้อ *P. digitatum* เพียงอย่างเดียวซึ่งจะมีการสร้างเอนไซม์ไคติเนสสูงสุดที่ 48 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามทริทเมนต์ ของ *B. subtilis* ABS-S14 และปลูกเชื้อ *P. digitatum* หรือการใช้เชื้อร่วมกันระหว่าง *P. guilliermondii* BCC 5389 และ *B. subtilis* ABS-S14 และ ปลูกเชื้อ *P. digitatum* มีการชักนำการสร้างเอนไซม์ไคติเนส ที่แตกต่างกัน โดยทริทเมนต์ที่มี *B. subtilis* ABS-S14 และปลูกเชื้อ *P. digitatum* จะพบว่าการสร้าง เอนไซม์ไคติเนสสูงสุด ที่ 24 ชั่วโมง และลดลงที่ 48 ชั่วโมง แนวโน้มของเอนไซม์เพิ่มขึ้นอีกครั้งที่ 72 ชั่วโมง ในส่วนทริทเมนต์ การปลูกเชื้อร่วมกันระหว่าง *P. guilliermondii* BCC 5389 และ *B. subtilis* ABS-S14, และ *P. digitatum* ให้ผลเช่นเดียวกันกับทริทเมนต์ *P. digitatum* เพียงอย่างเดียว ซึ่งจะมีการ สร้างเอนไซม์ไคติเนสสูงสุด 2 ช่วงคือ ที่ 12 และ 48 ชั่วโมง จากนั้นจะลดลงที่ 72 ชั่วโมง

ตรวจหาแอกติวิตีของเอนไซม์ เบตา1,3-กลูคาเนสดัดแปลงจากวิธีของ Burner (1964) โดยนำ ตัวอย่างมาผสมกับ laminarin ใช้สับเสตรทคือ carboxymethyl chitosan-remazol brilliant violet

solution (CM-Chitosan-RBV) วัดแอกติวิตีของเอนไซม์โดยนำตัวอย่างสารสกัดผสมกับสับสเตรท บ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการต้มในน้ำเดือด หลังจากนั้นเติมสารละลาย dinitrosalicylic acid (DNS) 0.2 ml และ อะซิเตทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 M pH 5.0 ต้มในน้ำเดือด และทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมน้ำกลั่น นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm คำนวณตรวจหาแอกติวิตีของเอนไซม์จากกราฟมาตรฐานกลูโคส โดยหนึ่งหน่วยกิจกรรมเอนไซม์คือหนึ่งไมโครโมลของ reducing sugar ที่มาจากการย่อย laminarin ในหนึ่งนาทีพบว่า การชักนำการสร้างเอนไซม์ เบต้า-1,3-กลูคาเนสไม่มีความแตกต่างกันในทุกทริทเมนต์ การสร้างเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสพบในเนื้อเยื่อผิวสัมผัสในทริทเมนต์ที่ใช้ *P. guilliermondii* BCC 5389 S14 และ ปลูกเชื้อ *P. digitatum* มีปริมาณสูงกว่าทริทเมนต์อื่นๆ ที่ 12 ชั่วโมง และเพิ่มขึ้นที่ 24 และ 48 ชั่วโมง จึงลดปริมาณลง ขณะเดียวกัน ทริทเมนต์ที่ใช้ *B. subtilis* ABS-S14 S14 และ ปลูกเชื้อ *P. digitatum* เนื้อเยื่อผิวสัมผัสมีสร้างเอนไซม์ เบต้า-1,3-กลูคาเนสสูงสุด ที่เวลา 24 ชั่วโมง และสร้างได้อีก 2 ช่วง คือ และ 48 ชั่วโมง และ 72 ชั่วโมง ในส่วนของทริทเมนต์ที่ใช้ *P. guilliermondii* BCC 5389 ร่วมกับ *B. subtilis* ABS-S14 และปลูกเชื้อด้วย *P. digitatum* พบว่าไม่มีความแตกต่างจากทริทเมนต์ควบคุมที่ใช้ น้ำกลั่นอย่างเดียว ในส่วนของทริทเมนต์ควบคุมที่ใช้ *P. digitatum* เพียงอย่างเดียวพบว่าการสร้างเอนไซม์สูงสุดที่เวลา 48 ชั่วโมงแล้วจึงลดลง

สกัด total RNA และสังเคราะห์ cDNA โดยนำเปลือกผลส้มที่เก็บมาที่เวลา 0, 3, 6, 9, 12, 24 ชั่วโมง หลังจากทำการปลูกเชื้อด้วย *P. digitatum* สกัดแยก Total RNA จากส้ม 10 ผลแทนซ้ำ 5 ซ้ำในแต่ละทริทเมนต์ มีทั้งหมด 8 ทริทเมนต์ โดยใช้ RNeasy plant mini kit (Qiagen US) เติม DNase I (Bio Lab) ใน 1 µg RNA ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 10 min หยุดปฏิกิริยาโดยการเติม EDTA การทำ Reverse Transcriptase PCR ใช้ ImProm-II Reverse Transcription System (Promega Corp. Madison, USA.) โดยใช้ specific primer oligo dT ดังตารางข้างล่างและ GoTaq qPCR Master Mix (Qiagen, USA). ตรวจ PCR reactions ใน 96-well plates หาค่า transcript level โดยคำนวณได้จากกราฟมาตรฐานโดยใช้ยีน citrus elongation factor 1-alpha (EF 1) AY 498567 เป็นยีนควบคุมที่มีระดับการแสดงออกสม่ำเสมอในทุกเงื่อนไขของเซลล์เปลือกส้ม (internal control) ส่วน Negative controls ไม่เติม cDNA วิเคราะห์ค่าทางสถิติจากตัวอย่างห้าผลต่อทริทเมนต์ ซ้ำสองครั้ง ตรวจสอบระดับการสร้างยีนโดยคำนวณจากผลที่ได้ ของ Real-Time quantitative RT-PCR และหาลำดับเบสของ PCR product ของ DNA ที่ได้ การวิเคราะห์ทางสถิติผลการทดลองทั้งหมด โดยหาค่าเฉลี่ยความแตกต่างจะเปรียบเทียบด้วยวิธี Least Significant Difference Test (LSD)

Table 1 Gene sequences downloaded from GenBank with accession numbers. These sequences have been used for the designing of the primers adopted in quantitative real time PCR

Gene name	Primer	GenBank accession number
Chitinase (CHI 1)	Forward	AF090336
	5'-AATGTTGCTAGCATTGTGACTCC-3'	
	Reverse	
	5'-GCAGCATTTCAGAAACGCATCT-3'	
β -1,3-glucanase (GNSL)	Forward	AJ000081
	5'-TTCCGACGGATCGTTAAGTTACC-3'	
	Reverse	
	5'-CCACCCACTCTCTGATATCACG-3'	
Elongation factor 1-alpha (EF 1)	Forward	AY498567
	5'-GGTCAGACTCGTGAGCATGC -3'	
	Reverse	
	5'-CATCGTACCTAGCCTTTGAGTACTTG-3'	

การแสดงออกของยีนด้วยการวัดปริมาณการสังเคราะห์ยีนไคตินเนส (*CHI*) และเบต้า-1,3-กลูคาเนส (*GLU*) จากเปลือกผลส้ม พบความแตกต่างในการแสดงออกของยีนไคตินเนส โดยระดับการสังเคราะห์ยีนในส้มของทริทเมนต์ที่ปลูกเชื้อราและเชื้อยีสต์ร่วมกัน หรือ ปลูกเชื้อราเพียงอย่างเดียวพบว่ามีระดับการสังเคราะห์ที่เหมือนกันโดยการแสดงออกของยีน *CHI* เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วหลังจาก 6 ชั่วโมงและลดลงที่ 9 ชั่วโมง ขณะที่ระดับการสังเคราะห์ยีน *CHI* ในส้มที่ปลูกเชื้อด้วยแบคทีเรียเพิ่มสูงที่สุดที่ 3 ชั่วโมงแรก และค่อยๆลดลงที่ 9 ชั่วโมงหลังจากการปลูกเชื้อ อย่างไรก็ตามระดับการสังเคราะห์ยีนในทริทเมนต์ที่ปลูกเชื้อราและเชื้อยีสต์ร่วมกับแบคทีเรียพบว่าการสะสมของยีนที่ 3 ชั่วโมงภายหลังจากการปลูกเชื้อสูงมากซึ่งเป็นที่น่าสนใจว่าทริทเมนต์ดังกล่าวมีผลต่อการชักนำการแสดงออกของยีนไคตินเนสเมื่อเปรียบเทียบกับทริทเมนต์อื่นๆ การแสดงออกของยีน *GLU* ในทริทเมนต์ที่ปลูกเชื้อราและยีสต์เพียงอย่างเดียวเพิ่มขึ้นใน 6 ชั่วโมงแรกและระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้นที่ 9 ชั่วโมง ในขณะที่ทริทเมนต์ที่ปลูกเชื้อราและแบคทีเรียร่วมกัน ระดับของยีน *GLU* เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วที่ 6 ชั่วโมงแรก และลดลง ชั่วโมงที่ 9 ในขณะที่ทริทเมนต์ที่ปลูกเชื้อราเพียงอย่างเดียวหรือ ทริทเมนต์ที่ผสมกันระหว่างเชื้อยีสต์และแบคทีเรียมีระดับการสังเคราะห์ยีน *GLU* เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วที่ 3 ชั่วโมงแรกหลังจากทำการปลูกเชื้อ

คำชี้แจง

เนื่องจากการทดลองในส่วนการหาการแสดงออกของยีนในระดับ RNA transcript และ enzyme activity ของไคตินเนสและเบต้า-1,3-กลูคาเนสบนผลส้มเมื่อกระตุ้นด้วยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์และเชื้อราก่อโรคจำนวน 8 ทริทเมนต์ดังตารางที่ 2 ต้องใช้ผลส้มตัวอย่างในจำนวนซ้ำเป็นจำนวนมากให้ได้ปริมาณเนื้อเยื่อที่เพียงพอต่อการสกัด ประกอบกับมีปัญหาการขาดผลผลิต และราคาสูงมาก โดยเฉพาะส้มโชกุนที่ปลูกในภาคใต้ และการวิเคราะห์แอกติวิตีของเอนไซม์ทั้งสองนี้และ Real-Time quantitative RT-PCR ต้องใช้ทั้งสารเคมีที่มีราคาแพงมาก ค่าใช้เครื่องมือและคิวที่ต้องรอและจำนวนซ้ำของตัวอย่างที่มีมากเพื่อความแม่นยำ และการทดลองที่ซ้ำมากกว่า 2 รอบ จึงเป็นผลหรือข้อจำกัดทั้งในด้านปริมาณตัวอย่างและงบประมาณที่ได้รับเป็นเหตุให้ไม่สามารถทำการทดลองเตรียมสูตรชีวภัณฑ์จากเอนโดสปอร์ของแบคทีเรีย ทดสอบประสิทธิภาพ บนจานอาหารและผลส้มในโครงการนี้ได้

Table 2 Effect on antagonistic yeasts and bacterial on abundance of defense related transcripts and enzyme activity

Treatment	Treatment agents
T1	Sterile distilled water
T2	<i>P. digitatum</i>
T3	<i>B. subtilis</i> ABS-S14
T4	<i>P. guilliermondii</i> BCC 5389
T5	<i>B. subtilis</i> ABS-S14+ <i>P. digitatum</i>
T6	<i>P. guilliermondii</i> BCC 5389+ <i>P. digitatum</i>
T7	Mixture of <i>P. guilliermondii</i> BCC 5389 + <i>B. subtilis</i> ABS-S14
T8	Mixture of <i>P. guilliermondii</i> BCC 5389 + <i>B. subtilis</i> ABS-S14 + <i>P. digitatum</i>

Output

รายชื่อบทความที่ตีพิมพ์แล้ว

1. Reprint

Sangwanich, S., Sangchote, S. and Leelasuphakul, W. (2013) Biocontrol of Citrus green mould and postharvest quality parameters. International Food Research J. 20(6), 3381-3386. Scopus

2. Manuscript

Comparative roles of antagonism and induced systemic resistance to control the growth of green mold on citrus fruit by *Bacillus subtilis* ABS-S14 endospores, its cyclic lipopeptide antibiotics and chitosan (under revision after submission to the Postharvest Biology and Technology journal)

3 International Proceeding

Sangwanich, S., Sangchote, S. and Leelasuphakul, W. (2013). Effect of *Pichia guilliermondii* on *Penicillium digitatum* and green mold rot in mandarin cv.Shogun from Thailand. Acta Hort.973, ISHS, 77-80.

4 Reprint-National Journal

Sangwanich, S., Sangchote, S. and Leelasuphakul, W. (2010). An Application of Antagonistic Microorganisms and Sodium bicarbonate to Control Green Mold Rot Disease (*Penicillium digitatum*) of Citrus. Agricultural. Sci. J. 41 (2) (Suppl.): 57-60.

Date: Jun 23, 2014
To: "wichitra leelasuphakul" wichitra.l@psu.ac.th
From: Ian Ferguson ian.ferguson@plantandfood.co.nz
Subject: Your Submission

Ms. Ref. No.: POSTEC-D-14-00288

Title: Comparative roles of antagonism and induced systemic resistance to control the growth of green mold on citrus fruit by *Bacillus subtilis* ABS-S14 endospores, its cyclic lipopeptide antibiotics and chitosan
Postharvest Biology and Technology

Dear Wichitra,

The reviewers have commented on your above paper, indicating that the topic is appropriate for publication in Postharvest Biology and Technology, but the manuscript is not acceptable for publication in its present form.

Would you be able to provide me with a revised manuscript that address all the issues raised by the reviewers? If you choose to submit a revised manuscript, please also provide a point-by-point explanation of the changes made and your response to the reviewers' and my comments, which follow.

If you wish to forward a revised manuscript for further consideration, please submit the revision along with your explanatory comments within 8 weeks.

To submit your revision, please do the following:

1. Go to: <http://ees.elsevier.com/postec/>
2. Enter your login details:

Your username is: *****

If you need to retrieve password details, please go to:

http://ees.elsevier.com/postec/automail_query.asp

NOTE: Upon submitting your revised manuscript, please upload the source files for your article. For additional details regarding acceptable file formats, please refer to the Guide for Authors at: <http://www.elsevier.com/journals/postharvest-biology-and-technology/0925-5214/guide-for-authors>

When submitting your revised paper, we ask that you include the following items:

Manuscript and Figure Source Files (mandatory)

We cannot accommodate PDF manuscript files for production purposes. We also ask that when submitting your revision you follow the journal formatting guidelines. Figures and tables may be embedded within the source file for the submission as long as they are of sufficient resolution for Production. For any figure that cannot be embedded within the source file (such as *.PSD

Photoshop files), the original figure needs to be uploaded separately. Refer to the Guide for Authors for additional information.
<http://www.elsevier.com/journals/postharvest-biology-and-technology/0925-5214/guide-for-authors>

Highlights (mandatory)

Highlights consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See the following website for more information
<http://www.elsevier.com/highlights>

Graphical Abstract (optional)

Graphical Abstracts should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Refer to the following website for more information: <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts>

3. Click [Author Login]

This takes you to the Author Main Menu.

4. Click [Submissions Needing Revision]

Please note that this journal offers a new, free service called AudioSlides: brief, webcast-style presentations that are shown next to published articles on ScienceDirect (see also <http://www.elsevier.com/audioslides>). If your paper is accepted for publication, you will automatically receive an invitation to create an AudioSlides presentation.

I look forward to receiving your revised manuscript.

Yours sincerely,

Ian Ferguson
Receiving Editor
Postharvest Biology and Technology

Editor's comments:

Please note that the editorial process varies considerably from journal to journal. To view a sample editorial process, please click here:
http://ees.elsevier.com/eeshelp/sample_editorial_process.pdf

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

Manuscript Number:

Title: Comparative roles of antagonism and induced systemic resistance to control the growth of green mold on citrus fruit by *Bacillus subtilis* ABS-S14 endospores, its cyclic lipopeptide antibiotics and chitosan

Article Type: Research Paper

Keywords: *B. subtilis*; *P. digitatum*; Cyclic lipopeptides; Chitosan; Peroxidase, L-Phenylalanine ammonia-lyase

Corresponding Author: Dr. wichitra leelasuphakul, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: Prince of Songkla University

First Author: Waewruedee Waewthongrak, B.Sc.

Order of Authors: Waewruedee Waewthongrak, B.Sc.; Supachai Pisuchpen, Ph.D.; wichitra leelasuphakul, Ph.D.

Abstract: The suppression of green mold disease caused by *P. digitatum*, in mandarin fruit by the antagonistic action of *B. subtilis* ABS-S14, a crude extract from its culture medium, cyclic lipopeptide antibiotics (CLPs) and chitosan were tested together with their abilities to elicit the accumulations of the plant defense related enzymes, Peroxidase (POX) and L-Phenylalanine ammonia-lyase (PAL). Both *B. subtilis* ABS-S14 endospores and a crude extract from its growth medium showed strong antagonistic activities against *P. digitatum*. The HPLC profiles of the crude extract indicated that the antifungal compounds produced by this strain of *B. subtilis* consisted of three clusters of the iturin A, fengycin and surfactin families of CLPs. The in vitro and in vivo inhibitory effects of the partially purified iturins and fengycins on the retardation of the growth of *P. digitatum* were demonstrated, whereas the surfactins had no direct effect. Efficacy tests, using bacterial endospores, the crude extract and chitosan showed significant reduction of fruit decay compared to those found in the presence of individual CLPs, and it was clearly demonstrated that the *B. subtilis* ABS-S14, itself and its crude extract and chitosan each induced the activities of POX and PAL in the infected flavedo tissues of mandarin fruit. They also co-enhanced the protection of fruit from the green mold pathogen *P. digitatum*.

Suggested Reviewers: Wojciech J Janisiewicz Ph.D.

Research Plant Pathologist, Biological Approaches for Managing Diseases of Temperate Fruit Crops
CRIS Work U, USDA-ARS Appalachian Fruit Research Station

wojciech.janisiewicz@ars.usda.gov

His research interest and expertise in postharvest biology.

Joseph L Smilanick Ph.D.

Plant Pathologist, San Joaquin Valley Agricultural Sciences Center, USDA ARS 9611 South Riverbend
Avenue Parlier, California 93648-9757

joe.smilanick@ars.usda.gov

He has conducted a research on the biology and control of postharvest plant pathogens of citrus fruit, and has a deep understanding of many technical aspects of the production and handling of many tree crops.

Alejandro Pérez-García Ph.D.

Professor, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Campus Universitario de Teatinos s/n, E-29071 Málaga, Spain

aperez@uma.es

His research has been emphasized on the Iturin-like Lipopeptides in the biological control of *Bacillus subtilis* Against bacterial Diseases of Cucurbits.

Xiao Dong Zheng Ph.D.

Professor, Department of Food Science and Nutrition, Zhejiang University, Hangzhou 310029, People's Republic of China

xdzheng@zju.edu.cn

His group has been working on the synergistic effect of chitosan and *Cryptococcus laurentii* on inhibition of *Penicillium expansum* infections.

Shiping Tian Ph.D.

Professor, Key Laboratory of Photosynthesis and Environmental Molecular Physiology, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Nanxincun 20, Xiangshan, Beijing 100093

tsp@ibcas.ac.cn

His group has conducted a research on the effects of chitosan and oligochitosan on growth of two fungal pathogens and physiological properties in pear fruit.

Opposed Reviewers:

Department of Biochemistry,
Faculty of Science,
Prince of Songkla University
P.O. Box 3, Kho Hong
Hat Yai, Songkla 90112. Thailand

May 15, 2014

Dr. I.B. Ferguson
Hortresearch
120 Mt. Albert Road, Private Bag 92 169
Mt Albert, Auckland, New Zealand
Fax: +64 9 815 4202
E-mail: iferguson@hortresearch.co.nz

Dear Editor,

Please find attached the manuscript entitled “Comparative roles of antagonism and induced systemic resistance to control the growth of green mold on citrus fruit by *Bacillus subtilis* ABS-S14 endospores, its cyclic lipopeptide antibiotics and chitosan”.

All authors in this paper agree to submit this work to Postharvest Biology and Technology Journal and this work has not been published or submitted to another journal. The novelty and significant contribution of the submitted work are briefly described and the transfer of copyright from the author to the publisher would be made. Please let me know if some alterations will be made before it will be accepted.

I am grateful for your kind attention and looking forward to hearing from you soon.

Yours sincerely,

Wichitra Leelasuphakul
Email: wichitra.l@psu.ac.th

Highlights

- Families of iturin A, fengycin and surfactin are the major CLP antibiotics present in crude extracts of *B. subtilis* ABS-S14 culture medium.
- Fengycin and iturin A were responsible for the inhibitory activity of *B. subtilis* against *P. digitatum*.
- Antibiosis is the dominant mechanism mediating the reduction of *P. digitatum* induced fruit decay in mandarin fruits together with elicitation of induced systemic resistance, as detected via increases of POX and PAL activity, after treatment by the antagonistic bacteria, its crude antibiotics and chitosan.

1 **Comparative roles of antagonism and induced systemic resistance to control the**
2 **growth of green mold on citrus fruit by *Bacillus subtilis* ABS-S14 endospores, its**
3 **cyclic lipopeptide antibiotics and chitosan**

4 Waewruedee Waewthongrak ^a, Supachai Pisuchpen ^b and Wichitra Leelasuphakul ^{a*}

^a Department of Biochemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai,
Songkhla, Thailand, 90112

^b Department of Material Product Technology, Faculty of Agro-Industry, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, Thailand, 90112

9 Corresponding Author

10 **Name:** Wichitra Leelasuphakul

11 **Postal address:** Department of Biochemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla
12 University, Hat Yai, Songkhla, Thailand, 90112

13 **Tel:** +66 74 288284; **Fax** +66 74-446656

14 **E-mail address:** wichitra.l@psu.ac.th

15 Highlights

- Families of iturin A, fengycin and surfactin are the major CLP antibiotics present in crude extracts of *B. subtilis* ABS-S14 culture medium.
- Fengycin and iturin A were responsible for the inhibitory activity of *B. subtilis* against *P. digitatum*.
- Antibiosis is the dominant mechanism mediating the reduction of *P. digitatum* induced fruit decay in mandarin fruits together with elicitation of induced systemic

22 resistance, as detected via increases of POX and PAL activity, after treatment by the
23 antagonistic bacteria, its crude antibiotics and chitosan.

24

25 **Abstract**

26 The suppression of green mold disease caused by *P. digitatum*, in mandarin fruit by the
27 antagonistic action of *B. subtilis* ABS-S14, a crude extract from its culture medium,
28 cyclic lipopeptide antibiotics (CLPs) and chitosan were tested together with their abilities
29 to elicit the accumulations of the plant defense related enzymes, Peroxidase (POX) and
30 L-phenylalanine ammonia-lyase (PAL). Both *B. subtilis* ABS-S14 endospores and a
31 crude extract from its growth medium showed strong antagonistic activities against *P.*
32 *digitatum*. The HPLC profiles of the crude extract indicated that the antifungal
33 compounds produced by this strain of *B. subtilis* consisted of three clusters of the iturin
34 A, fengycin and surfactin families of CLPs. The *in vitro* and *in vivo* inhibitory effects of
35 the partially purified iturins and fengycins on the retardation of the growth of *P.*
36 *digitatum* were demonstrated, whereas the surfactins had no direct effect. Efficacy tests,
37 using bacterial endospores, the crude extract and chitosan showed significant reduction of
38 fruit decay compared to those found in the presence of individual CLPs, and it was
39 clearly demonstrated that the *B. subtilis* ABS-S14, itself and its crude extract and
40 chitosan each induced the activities of POX and PAL in the infected flavedo tissues of
41 mandarin fruit. They also co-enhanced the protection of fruit from the green mold
42 pathogen *P. digitatum*.

43 **Keywords:** *B. subtilis*; *P. digitatum*; Cyclic lipopeptides; Chitosan; Peroxidase, L-
44 Phenylalanine ammonia-lyase

45

46 **1. Introduction**

47 The use of biocontrol agents classified as GRAS (Generally Regarded as Safe) can
48 include antagonistic organisms like *B. subtilis*, their metabolites and chitosan to control
49 postharvest decay of citrus fruits caused by green and blue molds (*P. digitatum* and *P.*
50 *expansum*), respectively has been extensively studied (reviewed in Palou et al., 2008).
51 Numerous strains of *B. subtilis* have been grouped with the plant growth promoting
52 rhizobacteria each of which can increase the growth of host plants and also elicit plant
53 defense mechanisms (Haas and Défago, 2005). Some *B. subtilis* strains that can inhibit
54 fungal pathogens (antagonists) and/or elicit defense responses (elicitors) in plant tissues
55 have been considered to be promising biocontrol agents for postharvest diseases of fruits
56 and vegetables. The *in vitro* and *in vivo* inhibitory effects of *B. subtilis* against different
57 types of pathogenic fungi in fruits have been demonstrated for *P. digitatum*
58 (Leelasuphakul et al., 2008), *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (*Ggt*) (Liu et al.,
59 2009), *Fusarium verticillioides* (Cavaglieri et al., 2005), *Botrytis cinerea*, *Monilinia laxa*
60 and *M. fructicola* (Yáñez-Mendizábal et al., 2011). It is also well known that the
61 efficiency of *B. subtilis* to control pathogenic microorganisms in plants results from their
62 abilities to produce several kinds of extracellular enzymes, e.g. β -1,3-glucanase
63 (Leelasuphakul et al., 2006), cyclic lipopeptide antibiotics (CLPs) (reviewed in Ongena
64 and Jacques, 2008) and volatile organic compounds (Chaurasia et al., 2005, Arrobel et

65 al., 2010). Many of these compounds are commonly reported to have powerful
66 antimicrobial activity and/or act as signaling molecules to induce plant immune systems
67 that include several kinds of defense related enzymes (reviewed in Raaijmakers et al.,
68 2010). An alternative method to control postharvest disease is to use chitosan, a
69 derivative of chitin which is one of the most abundant biopolymer sources in nature.
70 Chitosan when applied to fruits or vegetables has been shown to have antimicrobial
71 activity and can also activate the induced systemic resistance (ISR) phenomenon in
72 various plants including citrus (Chien et al., 2006, reviewed in Zhang et al., 2011).

73 Plant defense related enzymes associated with ISR include peroxidase (POX) and L-
74 phenylalanine ammonia-lyase (PAL) both of which are involved in the production of key
75 components of plant disease resistance mechanism such as secondary metabolites of the
76 phenylpropanoid metabolic pathways including lignin, suberin and phytoalexins. All of
77 them play important roles in the defense mechanisms of plants during pathogen infections
78 (Arfuaoui et al., 2007). Changes in POX activity are generally used as markers for ISR and
79 it has been identified as a pathogenesis-related (PR) protein after pathogen infection or
80 induction by an elicitor (Reuveni et al., 1990, Xue et al., 1998). Thus, prior to developing
81 an antagonistic *B. subtilis* as an efficient biocontrol agent against postharvest green mold
82 disease of mandarin using chitosan as a wettable coating agent, the following objectives
83 of the present study were 1) to monitor the *in vitro* and *in vivo* inhibitory effects of *B.*
84 *subtilis*, its crude extract, and CLPs against green mold disease and 2) to compare this
85 with the ability of chitosan to suppress green mold disease caused by *P. digitatum*, and 3)

86 to monitor the elicitation of the accumulations of POX and PAL activities in wounded
87 flavedo tissues of mandarin after challenge with *P. digitatum*.

88

89 **2. Materials and Methods**

90 2.1. Microorganisms

91 Antagonistic *B. subtilis* ABS-S14 used in this investigation was isolated from soil
92 collected from citrus groves around the south of Thailand and its antifungal activity was
93 screened on potato dextrose agar (PDA) plates (Sangwanich et al., 2013). *B. subtilis* was
94 streaked on nutrient agar plate and incubated at 37°C for 18 h before starting
95 experiments.

96 *P. digitatum* was isolated from decayed mandarin fruit and identified. It was
97 maintained on PDA plates with periodic transfers through mandarin fruit to maintain its
98 pathogenicity (Leelasuphakul et al., 2008). Prior to conducting the experiment the fungus
99 was transferred to infect sterilized mandarin fruit to maintain its aggressiveness as a
100 pathogen and reisolated. A suspension of *P. digitatum* conidial was prepared from a 7
101 day-old culture. The spore concentration was determined with a hemocytometer using a
102 compound light microscope (40X), and adjusted to 10^4 spores mL⁻¹ by dilution with
103 sterile distilled water.

104

105 2.2. *In vitro* assay of antagonistic activity of *B. subtilis* endospores and its cell-free
106 culture supernatant

107 The ability of *B. subtilis* endospores and its sterilized cell-free culture supernatant to
108 inhibit the growth of *P. digitatum* was explored using the dual-culture and agar well
109 diffusion assays (Perez et al., 1990), respectively. The *B. subtilis* cells were harvested
110 from overnight bacterial cultures in Luria-Bertani broth (LB) by centrifugation at 8,000
111 rpm, and were streaked approximately 1 cm away from the growing edge of 2 day-old
112 fungal colony. Cell-free supernatant was collected by centrifugation of a 3 day-old
113 bacterial culture in LB, and sterilized by autoclaving at 121°C for 15 min. Two cavities
114 (0.5 cm diameter) were made at approximately 1 cm away from the edge of a 2 day-old
115 fungal colony. Aliquots of 45 µL of sterilized supernatant were added to the cavities, and
116 further incubated at 25°C. The percentage of mycelial growth inhibition was calculated
117 using the formula of Gamliel et al. (1989) after being incubated at 25°C for 5 days.

118

119 2.3. HPLC analysis of *B. subtilis* crude extract and CLP isolation

120 *B. subtilis* crude extract was prepared from a 3 day-shaken LB culture at 35°C. The
121 cell-free culture supernatant was collected and a crude extract was conducted following
122 Leelasuphakul et al. (2006). CLPs present in the crude extract were first separated using
123 preparative thin-layer chromatography (PTLC; Silica gel 60 F₂₅₄ 1 mm thickness, 20x20
124 cm, Merck, Germany) with the mobile phase of chloroform-methanol-water (v/v,
125 65:25:4). One mL of crude extract (30 mg mL⁻¹) was spotted onto the PTLC plate. The
126 CLPs bands were visualized by exposure to UV light and subsequently sprayed with
127 water. The R_f values of the compounds were compared to those of the pure lipopeptides,
128 surfactin, and iturin A obtained from *B. subtilis* (Sigma). Each 1 cm wide horizontal band

129 was removed from the TLC plate, and the compounds were extracted from silica gel
130 twice with five times 80% ethanol. The combined extracts were dried at 65°C, weighed
131 and re-dissolved in 80% ethanol. The CLP antibiotics obtained from *B. subtilis* crude
132 extract were separated and identified by reverse phase high performance liquid
133 chromatography (RP-HPLC) on a Chromolith® 100 RP-18e column (dimensions 4.6x100
134 mm, particle size 5 µm, Merck, Germany) using an Agilent 1200 HPLC system (Agilent,
135 California, USA) consisting of quaternary pumps and photodiode array detector. The
136 mobile phase consisted of 0.1% trifluoroacetic acid in MiliQ water and acetonitrile. The
137 gradient elution solvent system was programmed as follows: 35% acetonitrile at 0 min to
138 80% acetonitrile at 60 min at a flow rate of 1.0 mL min⁻¹. The peaks in the effluent were
139 detected at 210 nm.

140

141 2.4. *In vitro* antifungal activity of *B. subtilis* crude extract and CLPs

142 The antifungal activity of the *B. subtilis* crude extract and CLPs was tested using a
143 disc diffusion assay (Leelasuphakul et al., 2008). The 20 µL of the test antibiotics (1 and
144 5 mg mL⁻¹) was dropped onto paper disc (0.6 cm diameter), and placed approximately 1
145 cm away from the edge of a 2 day-old fungal colony growing on a PDA plate, and further
146 incubated at 25°C for 5 days.

147

148 2.5. Inhibitory effect of chitosan on growth of *P. digitatum*

149 2.5.1. *In vitro* test

150 The 2 g of chitosan (95% deacetylated, Food grade) was dissolved in 2% glacial
151 acetic acid, adjusted to pH 5.6 with 2 M NaOH, and sterilized by autoclaving at 121°C
152 for 15 min. Chitosan solutions (0, 0.1, 0.5, 1, 5 mg mL⁻¹) were mixed with the pre-
153 warmed PDA, and the mixtures were poured into the Petri dishes. Actively growing
154 mycelia plugs (0.1 cm diameter) were placed onto the center of each PDA plate
155 supplemented with chitosan and incubated at 25°C for 5 days.

156

157 2.5.2 *In vivo* test

158 Shogun mandarin oranges (*Citrus reticulata* Blanco cv. Shogun) of uniform maturity,
159 and size were selected, and washed with tap water, then immersed in 1% sodium
160 hypochlorite for 5 min, and finally rinsed with sterile distilled water. After air drying at
161 room temperature, the surfaces were cleaned with 70% ethanol, and then a 0.5 cm circle
162 of five wounds (3 mm depth) were made on the fruit equator by puncturing with a sterile
163 needle. Chitosan solutions of 1, 5 and 10 mg mL⁻¹ in sterile distilled water were prepared.
164 The fruits were coated by swirling in 1 mL solution of chitosan, and air-dried at room
165 temperature for 2 h prior to adding aliquots (20 µL) of *P. digitatum* conidial suspension
166 (10⁴ spores mL⁻¹) onto the wound. The individual treatments were placed and sealed in a
167 plastic box containing a cup of water to maintain a high humidity and all boxes were
168 incubated at 25°C. The fruit was checked for disease incidence on the visible signs of a
169 lesion with a diameter ≥0.5 cm at the inoculation point. The percent decay was calculated
170 by summing the number of fruits with an average lesion of ≥5.0 cm diameter
171 wound×100/total number of inoculated wounded fruit (Leelasuphakul et al., 2008). There

172 were three replicate trials of 5 fruits per treatment with complete randomization. All the
173 fruit experiments were performed twice.

174

175 2.6. Efficacy test for *B. subtilis*, its crude extract, purified CLPs and chitosan as
176 biocontrol agents against *P. digitatum*

177 Based on the *in vitro* antifungal activity, *B. subtilis* endospores, crude extract and
178 purified CLPs, and chitosan were further investigated with regard to their efficiencies to
179 control the growth of *P. digitatum* on mandarin fruit. The endospore suspension of *B.*
180 *subtilis* was prepared from a 3 day-old bacterial culture, and the vegetative cells were
181 heat-killed by incubation at 80°C for 30 min. The endospores were harvested by
182 centrifugation at 8,000 rpm for 30 min and washed 3 times with sterile distilled water.
183 The endospore suspension of *B. subtilis* was adjusted to 10^8 CFU mL⁻¹ by comparing
184 with the absorbance of a McFarland No 0.5 filter.

185 Efficacy tests were conducted as previously described. The 20 µL aliquots of the
186 solution was dropped into the artificial wound and allowed to dry for 2 h prior to adding
187 20 µL of the *P. digitatum* conidial suspension. The first experiment set (T1-T4) was the
188 co-application of *P. digitatum* with *B. subtilis* endospores (T2), crude extract (10 mg mL⁻¹) (T2),
189 fruits were coated with chitosan (10 mg mL⁻¹) (T3), and Imazalil, (500 ppm)
190 (T4). Sterilized water was used as a healthy control (T5), and only *P. digitatum* was
191 applied as a pathogen inoculated control (T6). The second experiment for the efficacy test
192 for the *B. subtilis* CLPs on *P. digitatum* co-inoculated fruits including addition of: 1 mg
193 mL⁻¹ of iturin A, fengycin, and surfactin solutions onto the wound followed by the

194 addition of *P. digitatum* conidial suspension. Healthy and pathogen inoculated control
195 treatments were included. Disease incidence and percent decay were measured as
196 previously described.

197

198 2.7. Enzyme activity assay

199 Following treatments from the fruit efficacy assay, flavedo tissues obtained from
200 circle 1 cm away for the site of inoculation of the mandarin peel were collected at 0, 24,
201 48 and 72 h of incubation time. Acetone powders (AP) were prepared (Ballester et al.,
202 2006) from flavedo tissues. The 5 g of flavedo tissues were ground to a fine powder
203 under liquid nitrogen, and then transferred to 50 mL of cold acetone. The homogenate
204 were filtered through a Whatman No.1 filter paper using vacuum suction pump and the
205 sample residues were washed once with cold acetone. The resulting AP was air-dried at
206 room temperature overnight and kept at -20°C.

207 AP (50 mg) was extracted with 1.5 mL of the supernatant (100 mM phosphate buffer,
208 pH 6.0). The plant supernatant was collected by centrifugation at 12,000 rpm at 4 °C for
209 15 min. Protein concentration in the supernatant was determined according to Bradford
210 (1976). For the peroxidase assay, a mixture of 200 µL of supernatant, 1,774 µL of
211 extraction buffer and 6 µL of 20 mM guaiacol (Merck, Germany) were used as a blank
212 for the spectrophotometer prior to adding 20 µL of H₂O₂. The absorbance at 470 nm was
213 recorded every 15 sec for 2 min. The maximum slope of the curve ($\Delta A_{470}/\Delta \text{Time}$) was
214 used to calculate units of enzyme activity, which was expressed in Units mg protein⁻¹.

215 PAL activity was determined by measuring the conversion rate of L-phenylalanine to
216 trans-cinnamic acid at 37°C. PAL protein was extracted from 50 mg of AP with 1.0 mL
217 of Tris-HCl buffer (100 mM, pH 8.5) containing 20 mM β -mercaptoethanol. The assay
218 mixture containing 20 μ L of enzyme extract and 500 μ L of 0.1 M L-phenylalanine
219 (Sigma-Aldrich[®], Missouri, USA) in a total volume of 2 mL was incubated at 37°C. After
220 1 h of incubation, the enzyme reaction was stopped by adding 100 μ L of 1 N HCl. The
221 absorbance of the reaction mixture was detected at 290 nm. PAL activities were
222 determined from a cinnamic acid standard curve (Silva et al., 2004). Units of enzyme
223 activity were expressed as nmole of trans- cinnamic acid h⁻¹ g AP⁻¹.

224

225 2.8. Statistics analytical

226 The statistical analysis of variance of percent infection data and differences among
227 treatments was carried out using Duncan's new multiple range test ($P= 0.05$).

228

229 3. Results and discussion

230 3.1. Antifungal activity of *B. subtilis* and its cell free culture supernatant on *P. digitatum*

231 Strong antagonistic activities were obtained by *B. subtilis* strain ABS-S14 and its cell-
232 free culture supernatants against the mycelial growth of *P. digitatum*. Growth of *P.*
233 *digitatum* on culture medium was reduced by 96.2 and 90.9 percent after exposure to *B.*
234 *subtilis* and cell-free culture supernatant, respectively. The growth of *P. digitatum*
235 mycelium was limited and it did not spread through the plate or grow across *B. subtilis*

colonies or the wells containing the bacterial cell-free culture supernatants. The findings of this study were consistent with those of various other strains of *B. subtilis* and their cell free culture supernatants that showed strong antifungal properties and completely inhibited growth of different types of plant pathogenic fungi including *P. digitatum* (Palou et al., 2008, reviewed in Droby et al., 2009). One possible explanation for this phenomenon is the ability of *B. subtilis* strain ABS-S14 to produce a broad spectrum of cyclic lipopeptide antibiotics and release them into the culture medium as shown by a number of other workers (Asaka and Shoda, 1996, Lee et al., 2012).

3.2. The antagonistic role of *B. subtilis* crude extract and CLP antibiotics in inhibiting *P. digitatum* growth on agar plate

The antifungal activity of the antibiotic compounds produced from a *B. subtilis* crude extract obtained from a cell-free supernatant during the lag phase growth of the bacteria at 72 h were confirmed. Upon RP-HPLC, it was evident that there were three main groups of peaks of the crude extract obtained from the *B. subtilis* ABS-S14 (displayed in Fig. 1). This confirmed the existence of the CLP families; iturin A (A), fengycin (B) and surfactin (C) at Retention time of 7.4 to 14.6 min, 23.2 to 39.1 min and 45.4 to 51.5 min, respectively. This finding of the RP-HPLC profile of CLPs corresponded to those derived from the methanolic extract of *B. subtilis* strains UMAF6614 and UMAF6639 (Romero et al., 2007a) and a butanolic extract from *B. subtilis* strains PCL1608 and PCL1612 (Cazorla et al., 2007). In addition, the high effectiveness of the crude extract from *B. subtilis* strain ABS-S14 at 5 and 10 mg mL⁻¹ to suppress *P. digitatum* growth with

258 inhibitions of 81.6% and 94.1%, respectively was demonstrated (Fig. 2). Furthermore,
259 both the hyphae and the conidia of *P. digitatum* exhibited abnormal structures during the
260 development of mycelia, including mycelium swelling and conidial germination after
261 exposure to the crude extract, while only normal structures of the mycelia, hyphae and
262 conidia were observed in the control treatment (data not shown). It has been reported that
263 the swelling and morphological damage of conidia was detected in the presence of
264 antibiotics such as iturin, fengycin and surfactin (Romero et al., 2007b, Ruangwong et al.,
265 2012). The strong antagonistic effect of the purified CLP was considered to be associated
266 with iturin A and fengycin. This work has shown that *P. digitatum*, a green mold was
267 most sensitive to the iturin A and fengycin from *B. subtilis* ABS-S14 at 1 mg mL⁻¹ 91.8
268 and 72.6 % fungal inhibition, respectively. In contrast, surfactin had no inhibitory effect
269 on the growth of *P. digitatum*. The presence of a major protective role for fengycin and
270 iturin A purified from *B. subtilis* ABS-S14 as demonstrated in this study confirmed the
271 results from previous work (Hu et al., 2007), whereas surfactin purified from *B. subtilis*
272 ABS-S14 showed no inhibitory effect against *P. digitatum*. This was a similar result to
273 the work reviewed by Ongena and Jacques (2008) although they reported that surfactin
274 did inhibit *Rhizoctonia solani* (Asaka and Makoto 1996). Hence, the antifungal activity of
275 the crude extract was attributed to the iturin A and fengycin families. The strong evidence
276 from observations with a light microscope indicated that fengycin and iturin A acted on
277 cell membranes as exhibited by the formation of pores in the fungal mycelia and their
278 disrupted walls. Fengycin action may be based on the transition state as proposed by
279 Deleu et al. (2008). Meanwhile, iturin A produced by *B. subtilis* ABS-S14 did pass

280 through the fungal cell wall and induced the formation of ion conducting pores as
281 reviewed by Ongena and Jacques (2008).

282

283 3.3. *In vivo* and *in vitro* inhibitory effects of chitosan on the growth of *P. digitatum*

284 A concentration dependent inhibition of the mycelial growth of *P. digitatum* by
285 chitosan was demonstrated. The chitosan 1 and 5 mg mL⁻¹ gave 100% fungal inhibition.
286 An approximately 96% and 31% fungal inhibition were demonstrated in plate containing
287 0.5 and 0.1 mg mL⁻¹ chitosan, respectively (Fig. 3). The diameter of the fungal colony of
288 the control plate was 20.5 mm, while its size was reduced to 4.8 mm with 0.5 mg mL⁻¹
289 chitosan, and 16.8 mm with 0.1 mg mL⁻¹ chitosan. *P. digitatum* did not grow at all on the
290 plate supplemented with either chitosan at 1.0 or 5.0 mg mL⁻¹. Such a result was
291 consistent with the observation of Rappussi et al. (2009), who found that 1% chitosan
292 completely inhibited the growth of *Guignardia citricarpa in vitro*. The strong evidence
293 provided in this experiment confirmed that chitosan can exert a strong inhibitory effect
294 on fungal growth by damaging the plasma membranes of the mycelia and spores (Liu et
295 al., 2007). This effect may be related to chitosan having polycationic charges that
296 enabling it to interact with negative charges in the fungal cell wall that cause a leakage of
297 cell components and subsequently lead to cell death (Bautista-Banos et al., 2006, Gracia-
298 Rincoñ et al., 2010). Further investigation of the development of disease in chitosan
299 coated mandarin fruits with respect to retardation of fungal growth on the inoculated
300 fruits revealed a significant reduction of decay after treatment with chitosan. However,
301 protection was not as complete as seen with fruits treated with imazalil. The symptoms of

302 green mold infection that appeared on the fruits treated with *P. digitatum* alone gradually
303 increased and showed 80% decay at day 6. An almost equal disease incidence (26%) and
304 percent decay (26 and 20%) was achieved in the treatments with coatings of 5 and 10 mg
305 mL⁻¹ chitosan, respectively. Meanwhile, disease symptoms were still detected on 46%
306 fruits coated with chitosan at lower concentration (1 mg mL⁻¹). This result indicated that
307 an effective inhibitory concentration of chitosan was 5-10 mg mL⁻¹ for a fruit coating that
308 would control green mold decay of postharvest mandarin fruit. However, a lower
309 concentration of chitosan such as 1 mg mL⁻¹ showed complete inhibition only on the *in*
310 *vitro* antifungal activity. The present findings seem to be consistent with other research
311 where 1% (w/v) chitosan was shown to control postharvest disease in many kinds of
312 crops, including *Botrytis cinerea* in table grapes (Romanazzi et al., 2002) and *Monilinia*
313 *fructicola* in peaches (Casals et al., 2012). The antifungal activity of chitosan on
314 mandarin fruit may be attributed to a layer of chitosan forming a surface film in this
315 experiment, since it was reported that a 3 µM thick layer of chitosan was used in apple to
316 act as a barrier between the crop surface and the pathogen, and subsequently decreased
317 the chance for the pathogen to penetrate (Du et al., 1998; Romanazzi et al., 2002).

318

319 3.4. Effect of *B. subtilis* and its crude extract on fruit decay compared to that by chitosan

320 An *in vivo* antifungal assay was performed to compare the abilities of *B. subtilis*
321 endospores, crude extracts, chitosan and a chemical fungicide (Imazalil 500 ppm) to
322 reduce the symptoms and development of green mold disease in fruits inoculated with *P.*
323 *digitatum*. One week following application the *B. subtilis* endospores (10⁸ CFU mL⁻¹) and

324 its crude extract (10 mg mL⁻¹) showed equal effectiveness in controlling disease by
325 approximately 70%. As shown in Fig. 4, the disease incidence and percent decay in the
326 chitosan (10 mg mL⁻¹) treatment was similar to that of the bacterial endospores. There
327 was no disease incidence or decay found in healthy control and infected fruit treated with
328 imazalil. Also the antifungal effects of the CLPs produced by the *B. subtilis* were
329 confirmed by this *in vivo* experiment. When fengycin and iturin A were applied
330 separately to the *P. digitatum* inoculated fruit with, the reduction in decay of the
331 mandarin fruits was 60 to 65% on day 5. On day 6, decay was detected in the fruits
332 treated with the *B. subtilis* endospores or crude extract. These experiments provided
333 additional evidence for the key roles of the two CLPs purified from the *B. subtilis* crude
334 extract as did previous previous findings that the antagonistic activity of *B. subtilis* and *B.*
335 *amyloliquefaciens* toward the fungal pathogens was associated with both the iturins and
336 fengycins (Romero et al., 2007b, Liu et al., 2011). It was also shown that on day 4, the
337 fungal inoculated mandarin fruit treated with surfactin developed decay symptoms as
338 quickly as those found in the *P. digitatum* inoculated mandarin fruits. Hence the
339 endospores from the antagonistic *B. subtilis* ABS-S14, and its crude extract were highly
340 effective in suppressing *P. digitatum* growth not only on the normal growth medium, but
341 also their ability to suppress disease symptoms in the inoculated fruit. The results
342 presented here indicate the potential to use *B. subtilis* endospores, crude extract and
343 chitosan for the biocontrol of postharvest disease caused by *P. digitatum* on mandarin
344 fruit.

345

346 3.5 Induced defense-related enzyme activity

347 To assess if the development of resistance was associated with the induction of the
348 disease resistance enzymes, PAL and POX enzyme assays were carried out after infection
349 by the pathogen. The roles of PAL and POX proteins in plant tissues associated with
350 disease resistance were verified in this experiment. Treatments of mandarin fruits with *B.*
351 *subtilis* ABS-S14, its crude extract and chitosan to enhance regulation of antifungal
352 compound production such as phenolic metabolic products (lignin), and phytoalexins
353 during infections by pathogens as previously mentioned (Cai et al., 2008) were carried
354 on. It was a surprise to find that the crude extract obtained from *B. subtilis* ABS-14 had
355 the most potent inducing effect on these key enzymes (POX and PAL) that are associated
356 with the ISR in flavedo tissues of mandarin after attack by *P. digitatum* (Fig. 5). It was
357 also of interest that the observed changes in the activities of the two enzymes with
358 different inducers were different. Among the various treatments not only was the highest
359 activity of PAL found in fruits treated with crude extract, but the increase began within
360 48 h and reached its highest level ($261.6 \text{ mmole h}^{-1}\text{g AP}^{-1}$) at 72 h. The greatest increase
361 in the POX activity was also observed ($389.9 \text{ Units mg protein}^{-1}$) at 72 h after treatment
362 with the crude extract. It was also remarkable that, the POX activity detected in the
363 flavedo tissues induced by the crude extract of *B. subtilis* was about 8.6 and 4.7 fold
364 higher than occurred in the treatments with its endospores and chitosan, respectively.
365 This was 9.1 fold higher than that found in the sterile water control treatment at 72 h.
366 Only a slight increase of POX activity was found in mandarin fruit treated with *P.*
367 *digitatum* alone after 48 h. Apart from the interesting finding on the enzyme induction by

the bacterial crude extract alone, POX activity increased markedly starting from 48 h in the fruits treated with the bacterial endospores and chitosan, then showed a rapid decline of enzyme activity at 72 h. POX activity in fruits treated with chitosan also reached a maximum at 48 h. PAL induction with chitosan was maximum at 48 h, then declined. Only a reasonable induction of PAL activity was observed in treatments with *B. subtilis* endospores, its crude extract and pathogen alone. The elicitation of PAL and POX activities in flavedo tissues by the antagonist *B. subtilis* ABS-14 and its metabolites obtained from this study was in agreement with several other studies. It has been shown that the activities of the defense related enzymes are enhanced in plants upon treatment with *B. subtilis* in a similar way to the POX and PAL in cucumber plants (Chen et al., 2010), hot pepper (Nakkeeran et al., 2006) rice (Jayaraj et al., 2005), and in tomato (Recently, Li et al., 2008). Nevertheless, results from this study have indicated that infection of *P. digitatum* was able to induce activity of POX and PAL in agreement with the report of Ballester et al. (2006). However, we have demonstrated that there was a higher activity of the POX and PAL in pathogen infected mandarin flavedo tissues induced by *B. subtilis* and its active antifungal product and this may be attributed to it being more resistant to *P. digitatum* development. Several studies have indicated that *B. subtilis* can act as an elicitor to trigger plant defense mechanism. It has been shown that induction of ISR by *B. cereus* in pigeon pea, produced defense related enzymes such as PAL, POX and polyphenol oxidase (Dutta et al., 2008).

In addition to its antifungal activity, chitosan is involved in activating the ISR immune system in plants as we have now shown that it can increase the activity of defense related

enzymes PAL and POX in flavedo tissues and also protect against *P. digitatum* infections, (Fig. 5). This finding is consistent with other research work i.e., a significant increase of PAL activity in table grapes was shown when treated with 1% chitosan (Romanazzi et al., 2002). Induction of POX activity in flavedo tissues by chitosan could help to control *P. digitatum* infections (Meng et al., 2010). Rappussi et al. (2009) have also demonstrated that CHI, GLU, POX and PPO activity was induced by chitosan in “Valencia” oranges that resulted in an increase of resistance against *Guignardia citricarpa*. The ability of both *B. subtilis* ABS-14 its antibiotics and chitosan to inhibit fungal growth and disease caused by *P. digitatum* indicates that both could be developed as agents to protect mandarins from postharvest green mold disease in a similar way to the use of *Cryptococcus laurentii* and chitosan to efficiently inhibit *P. expansum* in apple fruits (Yu et al., 2007).

402

403 **4. Conclusions**

Results of this study have indicated that not only did *B. subtilis* strain ABS-S14 and its antibiotics exhibit a strong antagonistic property to *P. digitatum* growth, but chitosan also greatly inhibited the growth of *P. digitatum* both *in vitro* and *in vivo*. Microscopic examination of the morphology of treated fungi showed that the bacterial crude extract caused severe damage to the cell walls of the mycelia and conidia. The efficiency of *B. subtilis* ABS-S14, and its crude extract produced a reasonable disease reduction and enhanced mandarin POX and PAL enzyme levels in response to pathogen attack have been intensively discussed. The antagonistic ability of bacteria *B. subtilis* ABS-S14 to

412 prevent fruit decay definitely related to its ability to produce CLPs and stimulating
413 defense mechanism in mandarin fruit. Finally, the results from this study have confirmed
414 that *B. subtilis* ABS-S14, its CLPs and chitosan can control green mold fruit decay of
415 mandarin fruit. Further investigation on *in vivo* antibiotic synthesis of *B. subtilis* ABS-
416 S14 after application on the pathogen inoculated fruit and the environmental conditions
417 for the antagonist microorganism to produce antibiotic CLPs and act as an elicitor of
418 defense related gene expression would offer further insights into the molecular events of
419 elicitation of plant disease resistance against pathogen attack.

420

421 **Acknowledgments**

422 This research was financially supported by grants no. DBG5380015 from the Thailand
423 Research Fund (TRF) and the National Research University Project of Thailand's Office
424 of Higher Education Commission (Grant no. SCI540530S). W. Waewthongrak would
425 like to thank a Royal Golden Jubilee Ph.D. student scholarship from the TRF, the
426 Excellent Scholarship in Biochemistry department, Prince of Songkla University (PSU),
427 the PSU Graduate Fund, and the Postharvest Technology Innovation Center. We also
428 thank Dr. Brian Hodgson, Dr. Greg McCollum and Katrina Maffey for their suggestions
429 and assistances with the English.

430

431 **References**

432 Arfaoui, A., El Hadrami, A., Mabrouk, Y., Sifi, B., Boudabous, A., El Hadrami, I.,
433 Daayf, F., Chérif, M., 2007. Treatment of chickpea with *Rhizobium* isolates enhances

434 the expression of phenylpropanoid defense-related genes in response to infection by
435 *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. Plant Physiol Biochem 45, 470–479.
436 doi:10.1016/j.plaphy.2007.04.004

437 Arrebola, E., Sivakumar, D., Korsten, L., 2010. Effect of volatile compounds produced
438 by *Bacillus* strains on postharvest decay in citrus. Biol Control 53, 122–128.
439 doi:10.1016/j.biocontrol.2009.11.010

440 Asaka, O., Shoda, M., 1996. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato
441 with *Bacillus subtilis* RB14. Appl Environ Microbiol 62, 4081–4085.

442 Ballester, A.R., Lafuente, M.T., González-Candelas, L., 2006. Spatial study of
443 antioxidant enzymes, peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase in the citrus fruit–
444 *Penicillium digitatum* interaction. Postharvest Biol Technol 39, 115–124.
445 doi:10.1016/j.postharvbio.2005.10.002

446 Bautista-Baños, S., Hernández-Lauzardo, A.N., Velázquez-del Valle, M.G., Hernández-
447 López, M., Ait Barka, E., Bosquez-Molina, E., Wilson, C.L., 2006. Chitosan as a
448 potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural
449 commodities. Crop Prot 25, 108–118. doi:10.1016/j.cropro.2005.03.010

450 Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram
451 quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72,
452 248–254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3

453 Cai, K., Gao, D., Luo, S., Zeng, R., Yang, J., Zhu, X., 2008. Physiological and
454 cytological mechanisms of silicon-induced resistance in rice against blast disease.
455 Physiol Plant 134, 324–333. doi:10.1111/j.1399-3054.2008.01140.x

456 Casals, C., Elmer, P.A.G., Viñas, I., Teixidó, N., Sisquella, M., Usall, J., 2012. The
 457 combination of curing with either chitosan or *Bacillus subtilis* CPA-8 to control
 458 brown rot infections caused by *Monilinia fructicola*. *Postharvest Biol Technol* 64,
 459 126–132. doi:10.1016/j.postharvbio.2011.06.004

460 Cavaglieri, L., Orlando, J., Rodríguez, M.I., Chulze, S., Etcheverry, M., 2005. Biocontrol
 461 of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides* in vitro and at the maize root
 462 level. *Res Microbiol* 156, 748–754. doi:10.1016/j.resmic.2005.03.001

463 Cazorla, F.M., Romero, D., Pérez-García, A., Lugtenberg, B.J.J., de Vicente, A.,
 464 Bloemberg, G., 2007. Isolation and characterization of antagonistic *Bacillus subtilis*
 465 strains from the avocado rhizoplane displaying biocontrol activity. *J Appl Microbiol*
 466 103, 1950–1959. doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03433.x

467 Chaurasia, B., Pandey, A., Palni, L.M.S., Trivedi, P., Kumar, B., Colvin, N., 2005.
 468 Diffusible and volatile compounds produced by an antagonistic *Bacillus subtilis* strain
 469 cause structural deformations in pathogenic fungi in vitro. *Microbiol Res* 160, 75–81.
 470 doi:10.1016/j.micres.2004.09.013

471 Chen, F., Wang, M., Zheng, Y., Luo, J., Yang, X., Wang, X., 2010. Quantitative changes
 472 of plant defense enzymes and phytohormone in biocontrol of cucumber *Fusarium* wilt
 473 by *Bacillus subtilis* B579. *World J Microbiol Biotechnol* 26, 675–684.
 474 doi:10.1007/s11274-009-0222-0

475 Chien, P., Chou, C., 2006. Antifungal activity of chitosan and its application to control
 476 post-harvest quality and fungal rotting of Tankan citrus fruit (*Citrus tankan Hayata*).
 477 *J Sci Food Agric* 86, 1964–1969. doi:10.1002/jsfa.2570

478 Deleu, M., Paquot, M., Nylander, T., 2008. Effect of fengycin, a lipopeptide produced by
479 *Bacillus subtilis*, on model biomembranes. *Biophys J* 94, 2667–2679.
480 doi:10.1529/biophysj.107.114090

481 Droby, S., Wisniewski, M., Macarisin, D., Wilson, C., 2009. Twenty years of postharvest
482 biocontrol research: Is it time for a new paradigm? *Postharvest Biol Technol* 52, 137–
483 145. doi:10.1016/j.postharvbio.2008.11.009

484 Du, J., Gemma, H., Iwahori, S., 1998. Effects of chitosan coating on the storability and
485 on the ultrastructural changes of “Jonagold” apple fruit in storage. *Food Preserv Sci*
486 *Science (Japan)*.

487 Dutta, S., Mishra, A.K., Kumar, B.S.D., 2008. Induction of systemic resistance
488 against fusarial wilt in pigeon pea through interaction of plant growth
489 promoting rhizobacteria and rhizobia. *Soil Biol Biochem* 40, 452–461.
490 doi:10.1016/j.soilbio.2007.09.009

491 Gamliel, A., Katan, J., Cohen, E., 1989. Toxicity of chloronitrobenzenes to *Fusarium*
492 *oxysporum* and *rhizoctonia solani* as related to their structure. *Phytoparasitica* 17,
493 101–106. doi:10.1007/BF02979517

494 García-Rincón, J., Vega-Pérez, J., Guerra-Sánchez, M.G., Hernández-Lauzardo, A.N.,
495 Peña-Díaz, A., Velázquez-Del Valle, M.G., 2010. Effect of chitosan on growth and
496 plasma membrane properties of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. *Pestic*
497 *Biochem Physiol* 97, 275–278. doi:10.1016/j.pestbp.2010.03.008

498 Haas, D., Défago, G., 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent
499 pseudomonads. *Nat Rev Microbiol* 3, 307–319. doi:10.1038/nrmicro1129

500 Hu, L.B., Shi, Z.Q., Zhang, T., Yang, Z.M., 2007. Fengycin antibiotics isolated from B-
501 FS01 culture inhibit the growth of *Fusarium moniliforme* Sheldon ATCC 38932.
502 FEMS Microbiol Lett 272, 91–98. doi:10.1111/j.1574-6968.2007.00743.x

503 Jayaraj, J., Radhakrishnan, N.V., Kannan, R., Sakthivel, K., Suganya, D., Venkatesan, S.,
504 Velazhahan, R., 2005. Development of new formulations of *Bacillus subtilis* for
505 management of tomato damping-off caused by *Pythium aphanidermatum*. Biocontrol
506 Sci Technol 15, 55–65. doi:10.1080/09583150400015920

507 Lee, G., Ko, J., Oh, B., Choi, J., Lee, K., Chae, J., Kamala-Kannan, S., 2012. Biological
508 control of postharvest diseases of apples, peaches, and nectarines by *Bacillus subtilis*
509 S16 isolated from halophytes rhizosphere. Biocontrol Sci Technol 22, 351–361.
510 doi:10.1080/09583157.2012.658553

511 Leelasuphakul, W., Hemmanee, P., Chuenchitt, S., 2008. Growth inhibitory properties of
512 *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen
513 (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit. Postharvest Biol Technol 48, 113–121.
514 doi:10.1016/j.postharvbio.2007.09.024

515 Leelasuphakul, W., Sivanunsakul, P., Phongpaichit, S., 2006. Purification,
516 characterization and synergistic activity of β -1,3-glucanase and antibiotic extract from
517 an antagonistic *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 against rice blast and sheath blight.
518 Enzyme Microb Technol 38, 990–997. doi:10.1016/j.enzmictec.2005.08.030

519 Li, S.M., Hua, G.G., Liu, H.X., Guo, J.H., 2008. Analysis of defence enzymes induced by
520 antagonistic bacterium *Bacillus subtilis* strain AR12 towards *Ralstonia solanacearum*
521 in tomato. Ann Microbiol 58, 573–578. doi:10.1007/BF03175560

522 Liu, B., Qiao, H., Huang, L., Buchenauer, H., Han, Q., Kang, Z., Gong, Y.,
523 2009. Biological control of take-all in wheat by endophytic *Bacillus subtilis*
524 E1R-j and potential mode of action. Biol Control 49, 277–285.
525 doi:10.1016/j.biocontrol.2009.02.007

526 Liu, J., Tian, S., Meng, X., Xu, Y., 2007. Effects of chitosan on control of postharvest
527 diseases and physiological responses of tomato fruit. Postharvest Biol Technol 44,
528 300–306. doi:10.1016/j.postharvbio.2006.12.019

529 Liu, J., Zhou, T., He, D., Li, X., Wu, H., Liu, W., Gao, X., 2011. Functions of
530 lipopeptides bacillomycin D and fengycin in antagonism of *Bacillus*
531 *amyloliquefaciens* C06 towards *Monilinia fructicola*. J Mol Microbiol Biotechnol 20,
532 43–52. doi:10.1159/000323501

533 Meng, X., Yang, L., Kennedy, J.F., Tian, S., 2010. Effects of chitosan and oligochitosan
534 on growth of two fungal pathogens and physiological properties in pear fruit.
535 Carbohydr Polym 81, 70–75. doi:10.1016/j.carbpol.2010.01.057

536 Nakkeeran, S., Kavitha, K., Chandrasekar, G., Renukadevi, P., Fernando, W.G.D., 2006.
537 Induction of plant defence compounds by *Pseudomonas chlororaphis* PA23 and
538 *Bacillus subtilis* BSCBE4 in controlling damping-off of hot pepper caused by
539 *Pythium aphanidermatum*. Biocontrol Sci Technol 16, 403–416.
540 doi:10.1080/09583150500532196

541 Ongena, M., Jacques, P., 2008. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease
542 biocontrol. Trends Microbiol 16, 115–125. doi:10.1016/j.tim.2007.12.009

543 Palou, L., Smilanick, J.L., Droby, S., 2008. Alternatives to conventional fungicides for
 544 the control of citrus postharvest green and blue moulds. *Stewart Postharvest Review*
 545 4, 1–16. doi:10.2212/spr.2008.2.2
 546 Perez, C., Paul, M., Bazerque, P., 1990. An antibiotic assay by the agar–well diffusion
 547 method. *Acta Biol. Med. Exp.*, 15, 113–115.
 548 Raaijmakers, J.M., De Bruijn, I., Nybroe, O., Ongena, M., 2010. Natural functions of
 549 lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics.
 550 *FEMS Microbiol Rev* 34, 1037–1062. doi:10.1111/j.1574-6976.2010.00221.x
 551 Rappussi, M.C.C., Pascholati, S.F., Benato, E.A., Cia, P., 2009. Chitosan reduces
 552 infection by *Guignardia citricarpa* in postharvest “Valencia” oranges. *Braz Arch Biol*
 553 *Technol* 52, 513–521. doi:10.1590/S1516-89132009000300001
 554 Reuveni, R., Shimoni, M., Karchi, Z., 1990. A rapid assay for monitoring peroxidase
 555 activity in melon as a marker for resistance to *Pseudoperonospora cubensis*. *J*
 556 *Phytopathol* 129, 333–338. doi:10.1111/j.1439-0434.1990.tb04310.x
 557 Romanazzi, G., Nigro, F., Ippolito, A., DiVenere, D., Salerno, M., 2002. Effects of pre-
 558 and postharvest chitosan treatments to control storage grey mold of table grapes. *J*
 559 *Food Sci* 67, 1862–1867. doi:10.1111/j.1365-2621.2002.tb08737.x
 560 Romero, D., de Vicente, A., Olmos, J. l., Dávila, J. c., Pérez-García, A., 2007a. Effect of
 561 lipopeptides of antagonistic strains of *Bacillus subtilis* on the morphology and
 562 ultrastructure of the cucurbit fungal pathogen *Podosphaera fusca*. *J. Appl. Microbiol.*
 563 103, 969–976. doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03323.x

564 Romero, D., de Vicente, A., Rakotoaly, R.H., Dufour, S.E., Veening, J.W., Arrebola, E.,
 565 Cazorla, F.M., Kuipers, O.P., Paquot, M., Pérez-García, A., 2007b. The iturin and
 566 fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis*
 567 toward *Podosphaera fusca*. Mol. Plant Microbe Interact 20, 430–440.
 568 doi:10.1094/MPMI-20-4-0430

569 Ruangwong, O., Liang, W., 2012. Effect of crude extract from *Bacillus subtilis* LB5
 570 cultivated broth on conidial germination of *Colletotrichum Gloeosporioides*. World
 571 Acad Sci Eng Technol 72, 567-571.

572 Sangwanich, S., Sangchote, S., Leelasuphakul, W. 2013. Biocontrol of citrus green
 573 mould and postharvest quality parameters. Int Food Res J 20(6): 3381-3386.

574 Silva, H.S.A., da Silva. R.R., Macagnan, D., de Almeida H.V. B., Pereira, M.C.B.,
 575 Mounteer, A., 2004. Rhizobacterial induction of systemic resistance in tomato plants:
 576 non-specific protection and increase in enzyme activities. Biol Control 29, 288–295.
 577 doi:10.1016/S1049-9644(03)00163-4

578 Xue, L., Charest, P.M., Jabaji-Hare, S.H., 1998. Systemic induction of peroxidases, 1,3-
 579 β -glucanases, chitinases, and resistance in bean plants by *Binucleate Rhizoctonia*
 580 species. Phytopathology 88, 359–365. doi:10.1094/PHYTO.1998.88.4.359

581 Yáñez-Mendizábal, V., Usall, J., Viñas, I., Casals, C., Marín, S., Solsona, C., Teixidó, N.,
 582 2011. Potential of a new strain of *Bacillus subtilis* CPA-8 to control the major
 583 postharvest diseases of fruit. Biocontrol Sci Technol 21, 409–426.
 584 doi:10.1080/09583157.2010.541554

585 Yu, T., Li, H.Y., Zheng, X.D., 2007. Synergistic effect of chitosan and *Cryptococcus*
586 *laurentii* on inhibition of *Penicillium expansum* infections. Int. J Food Microbiol.
587 114, 261–266. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.09.008
588 Zhang, H., Li, R., Liu, W., 2011. Effects of chitin and its derivative chitosan on
589 postharvest decay of fruits: A review. Int J Mol Sci 12, 917–934.
590 doi:10.3390/ijms12020917
591

592 **Figure caption**

593
594 **Fig. 1. HPLC chromatograms of crude extract obtained from cell-free supernatants**
595 **of *B. subtilis* ABS-S14.** The 20 µg of crude extract was injected to a LiChrospher® 100
596 RP-18e column. The elution was carried out with a stepwise gradient from 35%-90% of
597 acetonitrile and 0.1% TFA at a flow rate of 1.0 ml min⁻¹ and peaks were monitored at 210
598 nm. The type of CLP detected were identified based on their retention times (RT) and
599 corresponding peak areas comparing with commercial standards (Sigma-Aldrich).

600

601 **Fig. 2. Effect of a crude extract from *B. subtilis* on the growth of *P. digitatum* after 5**
602 **days incubation at 25°C.** A: 80% ethanol only; B: Aliquot of 10 mg/mL bacterial crude
603 extract from a 3 day old cell free supernatant from *B. subtilis* ABS-S14.

604

605 **Fig. 3. Effect of chitosan at various concentrations on growth of *P. digitatum* in vitro.**
606 In each treatment, vertical bars represent standard error from mean of three replications.

607

608 **Fig. 4. Effect of *B. subtilis* ABS-S14 and its crude extract on controlling green mold**
609 **rot disease.** Disease incidence (A) and percent decay (B) in mandarin fruit were
610 determined every day after incubated at 25°C at 95% RH for 7 day.

611

612 **Fig. 5. Induction of defense related enzymes in mandarin flavedo obtained from**
613 **various treatments.** POX (A) and PAL (B) activity in mandarin flavedo tissue at 0 to 72
614 h after inoculation with *P. digitatum*. In each treatment, vertical bars are the mean values
615 of three replications, vertical lines within bar = standard error

616

List of reviewers

1. Joseph L Smilanick

USDA-ARS [San Joaquin Valley Agricultural Sciences Center](#), 9611 South Riverbend
AvenueParlier, California 93648-9757

E-mail address: Joe.Smilanick@gmail.com, joe.smilanick@ars.usda.gov

2. Alejandro Pérez-García

Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Campus Universitario de Teatinos s/n, E-29071
Málaga, Spain

E-mail address: aperez@uma.es

3. Xiao Dong Zheng

Food microbiology and Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, People's Republic
of China

E-mail address: xdzheng@zju.edu.cn

4. Wojciech J Janisiewicz

USDA-ARS Appalachian Fruit Research Station 2217 Wiltshire Road Kearneysville, WV 25430

E-mail address: wojciech.janisiewicz@ars.usda.gov

5. Shiping Tian

Key Laboratory of Photosynthesis and Environmental Molecular Physiology, Institute of Botany,
Chinese Academy of Sciences, Nanxincun 20, Xiangshan, Beijing 100093, PR China

E-mail address: tsp@ibcas.ac.cn (S. Tian)

Figure 1
[Click here to download high resolution image](#)

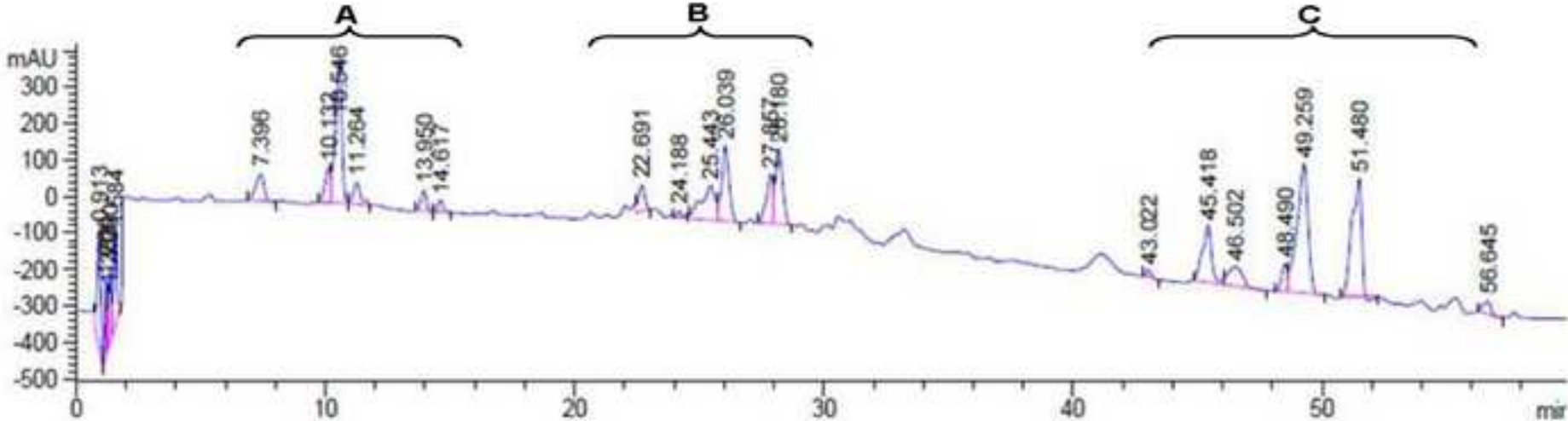


Figure 2
[Click here to download high resolution image](#)

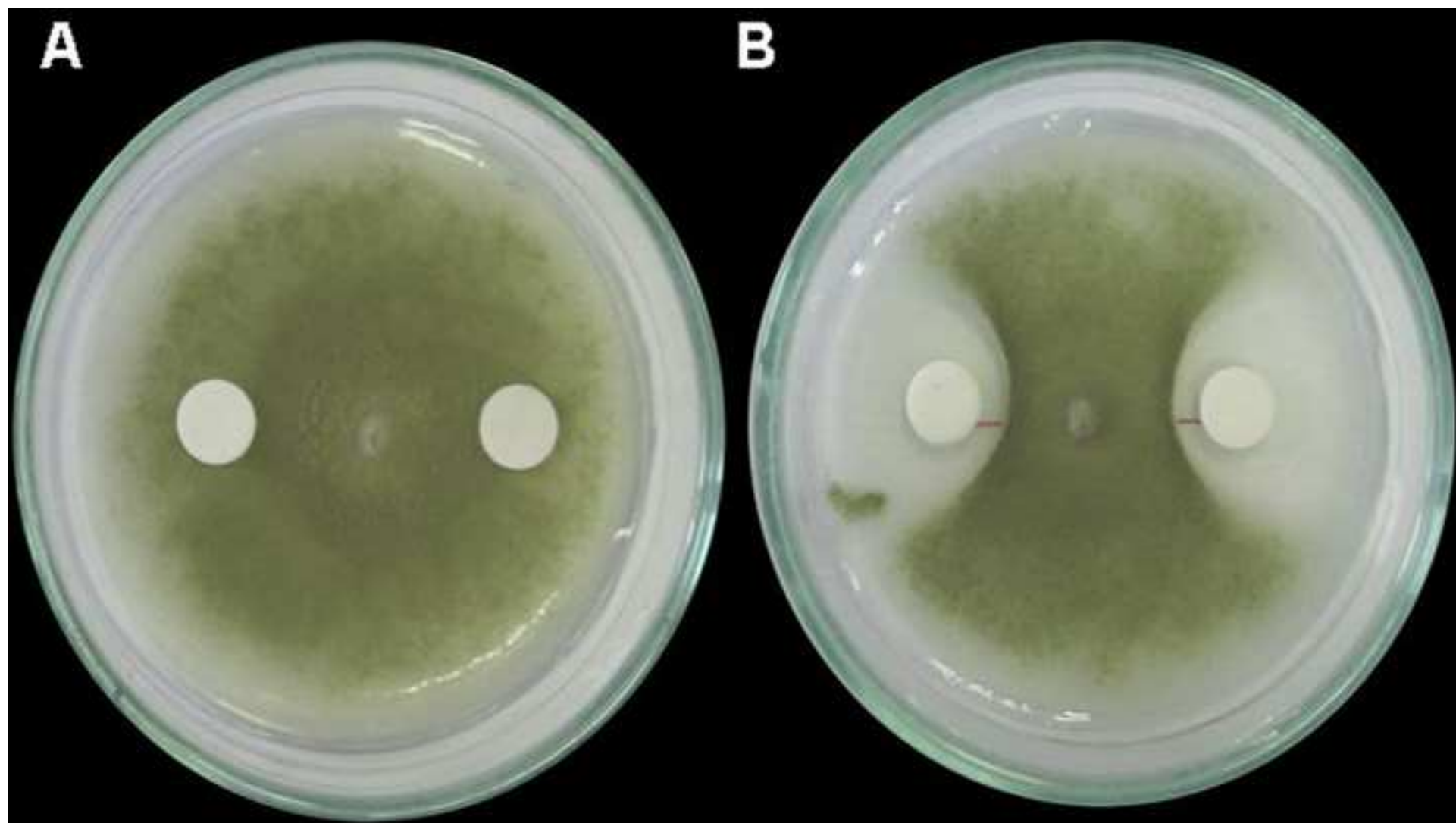


Figure 3
[Click here to download high resolution image](#)

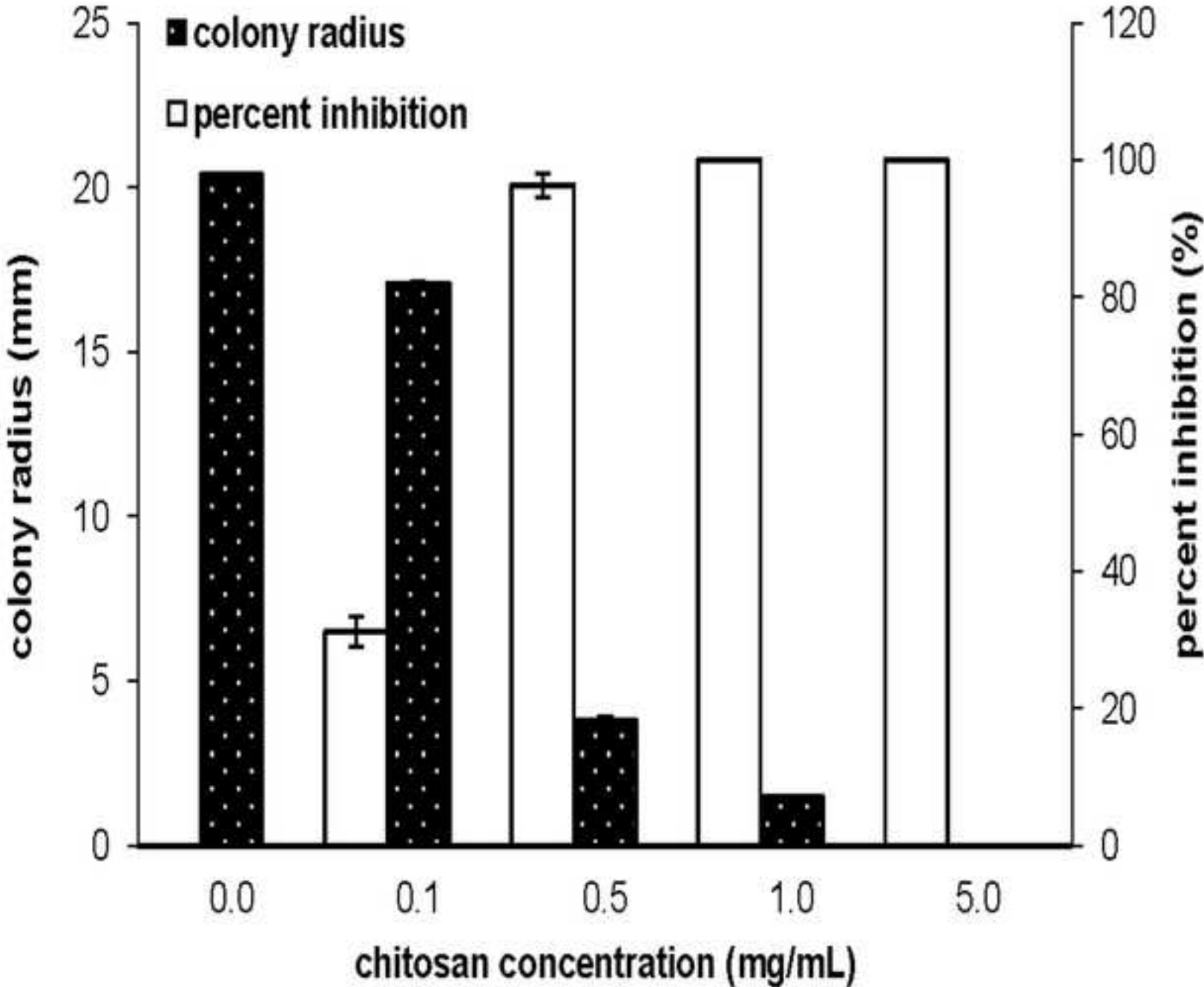


Figure 4
[Click here to download high resolution image](#)

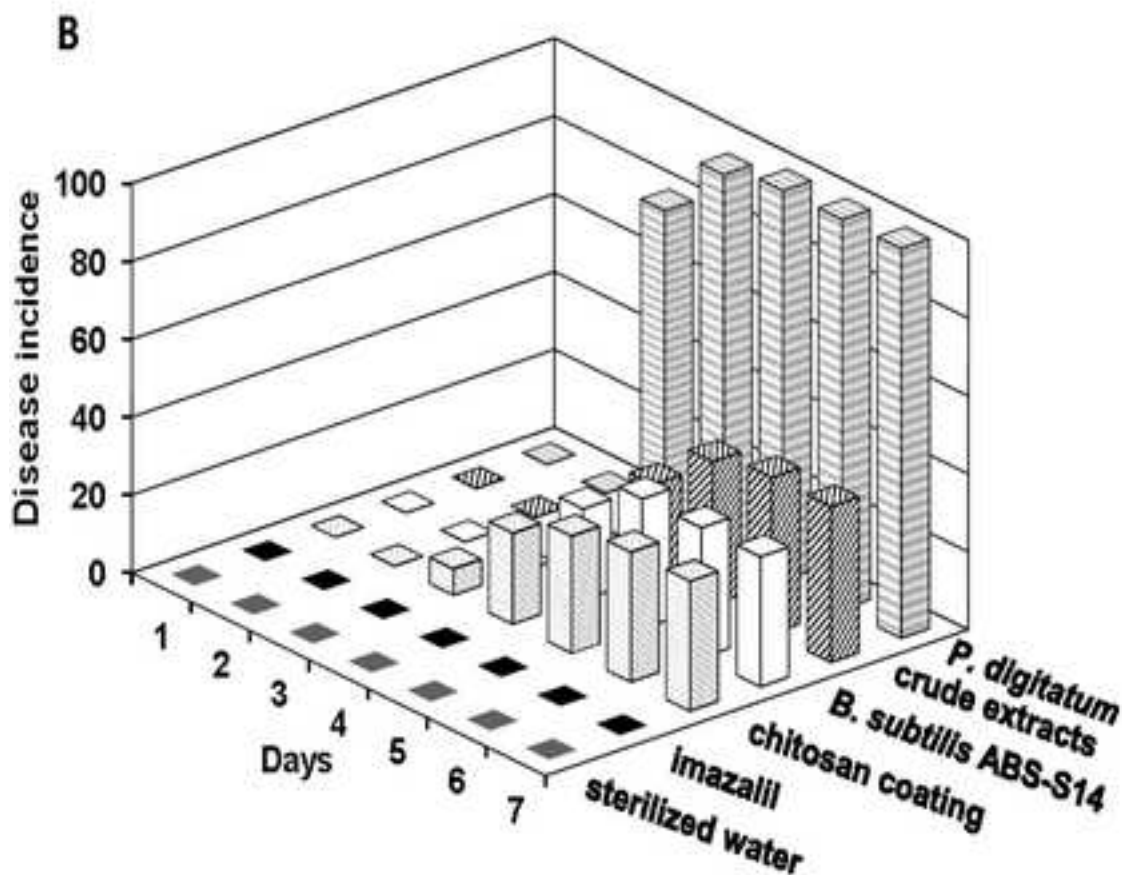
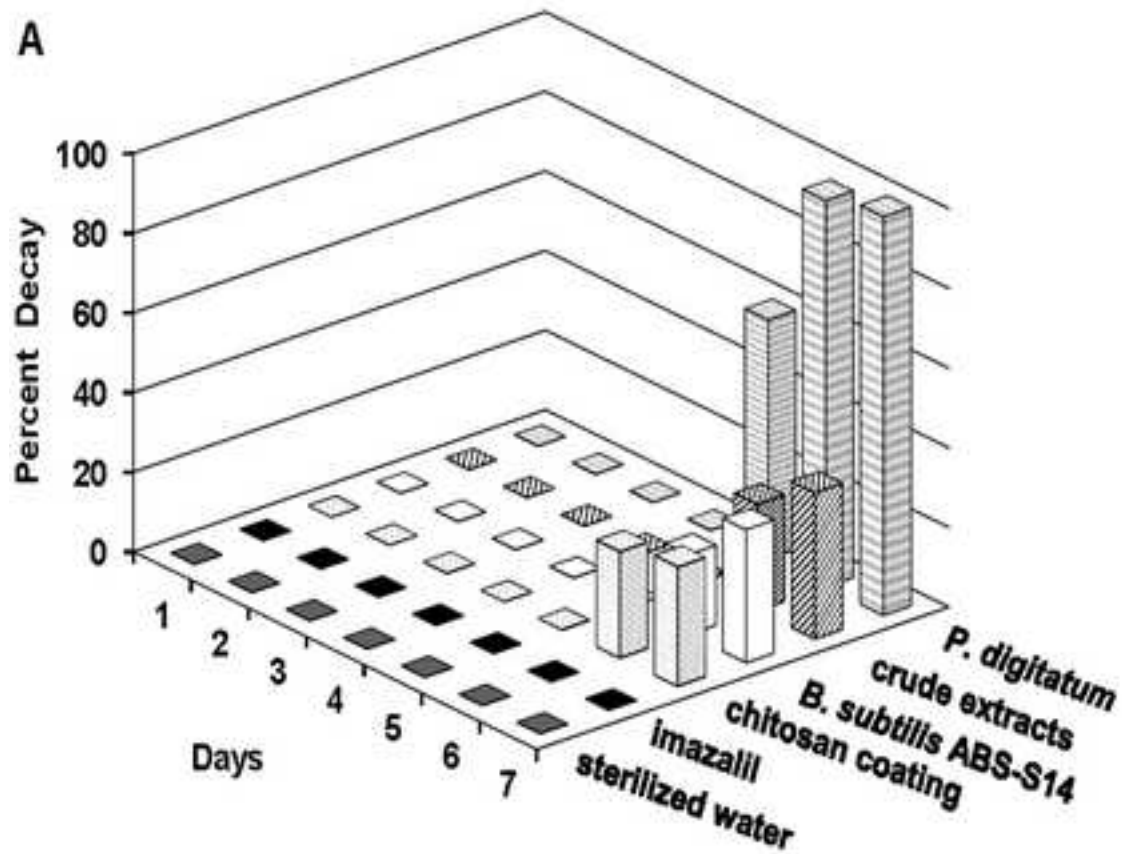


Figure 5
[Click here to download high resolution image](#)

