Agricultural Sci. J. 43 : 3 (Suppl.) : 576-579 (2012) ว. วิทย. กษ. 43 : 3 (พิเศษ) : 576-579 (2555)

ศักยภาพการใช้ยีสต์ควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของผลมะละกอ

Potential of Antagonistic Yeast to Control *Colletotrichum gloeosporioides* Causing Papaya Fruit Anthracnose

วาสนา ทองปิ่น[1, 2] รัติยา พงศ์พิสุทธา[1, 2] และ ชัยณรงค์ รัตนกรีฑากุล[1, 2]
Wassana Tongpin[1, 2], Ratiya Pongpisutta[1, 2] and Chainarong Rattanakreetakul[1, 2]

Abstract

Potential antagonistic yeasts to control *Colletotrichum gloeosporioides* a causal agent of papaya anthracnose were investigated. Three isolates of yeast were selected; *Pichia anomala* (PA) *Pichia guilliermondii* (PG) and *Torulaspora delbrueckii* (TD). Mycelial growth inhibition of *C. gloeosporioides* was tested in nutrient yeast dextrose broth (NYDB). Significant differences in mycelial inhibition were found among 3 yeasts with inhibition rates of 96.76, 81.42 and 59.65%, respectively. Spore germination inhibition of *C. gloeosporioides* was studied in potato dextrose broth (PDB). There were significant differences in spore germination inhibition of *C. gloeosporioides* after 6 hr incubation. PA showed the highest inhibition rate of 88.77% while inhibition rates of 67.13 and 62.74 were calculated for PG and TD, respectively. These results will be used to control anthracnose on papaya fruits.

Keywords: biological control, papaya, *Colletotrichum gloeosporioides*

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ทดสอบศักยภาพของยีสต์ในการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนส ด้วยวิธีการใช้ยีสต์ 3 ชนิด ได้แก่ *Pichia anomala* (PA) *Pichia guilliermondii* (PG) และ *Torulaspora delbrueckii* (TD) โดยทดสอบการควบคุมการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ร่วมกับยีสต์ในอาหารเหลว nutrient yeast dextrose broth (NYDB) พบว่าการยับยั้งการเจริญเส้นใยเชื้อของราโดยยีสต์ทั้ง 3 ชนิด มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยยีสต์ PA PG และ TD มีอัตราการยับยั้ง 96.76 81.42 และ 59.65 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากการทดสอบการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *C. gloeosporioides* ในอาหารเหลว potato dextrose broth (PDB) พบว่า การยับยั้งการงอกสปอร์ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยยีสต์ PA มีประสิทธิภาพในการยับยั้งดีที่สุดในอัตรา 88.7 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา ได้แก่ ยีสต์ PG และ TD คิดเป็นอัตรา 67.13 และ 62.74 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การทดลองครั้งนี้จะนำไปใช้ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสกับผลมะละกอหลังการเก็บเกี่ยวต่อไป

คำสำคัญ: การควบคุมโรคโดยชีววิธี มะละกอ *Colletotrichum gloeosporioides*

คำนำ

มะละกอ (*Carica papaya* L.) เป็นพืชชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย นิยมบริโภคกันอย่างแพร่หลายทั้งในรูปของผลดิบและผลสุก นอกจากจะใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารคาวหวานเพื่อบริโภคภายในประเทศแล้ว สามารถจำหน่ายต่างประเทศในรูปของมะละกอสด คิดเป็นมูลค่า 50.207 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2554) มะละกอมักพบปัญหาโรคและแมลง โดยเฉพาะโรคแอนแทรคโนสที่เกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ซึ่งพบบ่อยในมะละกอสุก โดยเชื้อจะเข้าทำลายแบบแฝงตัวตั้งแต่ในแปลงปลูกและแสดงอาการโรคเมื่อผลสุก (Dickman, 1983) ส่งผลให้คุณภาพของผลิตผลลดลง ปัจจุบันเกษตรกรนิยมใช้สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา เพื่อควบคุมโรคภายหลังการเก็บเกี่ยว ทำให้เชื้อจุลินทรีย์สาเหตุโรคเกิดการดื้อยา ประกอบกับผู้บริโภคมีความห่วงใยต่อสุขภาพของตัวเองและต้องการบริโภคผักและผลไม้ที่มีคุณภาพ ดังนั้นการควบคุมโรคโดยชีววิธีจึงเป็นวิธีที่ได้รับความสนใจเพิ่มมากขึ้น มีรายงานการใช้ยีสต์ในการควบคุม

[1] ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140
[1] Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture at KPS, Kasetsart University, Kamphaengsaen Campus, Nakhon Pathom 73140
[2] ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยวสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10400
[2] Postharvest Technology Innovation Center, Commission on Higher Education, Bangkok 10400

โรคที่เกิดจากเชื้อ *Penicillium expansum, P. italicum, Colletotrichum capsici, Lasiodiplodia theobromae* และ *C. sublineolum* ได้ผลดีเช่นกัน (Cao *et al*., 2011; Lahlali *et al*., 2011; Chanchaichaovivat *et al*., 2008; Hashem *et al*., 2009; Rosa *et al*., 2010) ดังนั้นการทดลองนี้จึงได้ศึกษาประสิทธิภาพการใช้ยีสต์ *Pichia anomala* (PA) *Pichia guilliermondii* (PG) และ *Torulaspora delbrueckii* (TD) เพื่อควบคุมเชื้อรา *C. gloeosporioides* เบื้องต้นในระดับห้องปฏิบัติการ และจะนำไปทดสอบจริงในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสบนผลมะละกอหลังการเก็บเกี่ยวต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การทดสอบการใช้ยีสต์ปฏิปักษ์ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ในอาหารเหลว

เลี้ยงเชื้อรา *C. gloeosporioides* บนอาหาร potato dextrose agar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้แสงสลับความมืดเป็นเวลา 12 ชั่วโมง เป็นระยะเวลา 5 วัน ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร ตัดบริเวณปลายเส้นใยนำชิ้นวุ้นเชื้อใส่ลงในขวดอาหาร nutrient yeast dextrose broth (NYDB) ปริมาตร 80 มิลลิลิตร จำนวน 3 ชิ้นวุ้นต่อขวด จากนั้นดูด cell suspension ของยีสต์ PA PG และ TD ที่มีความเข้มข้น 1 x 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดอาหาร NYDB นำไปเขย่าบนเครื่อง shaker ที่มีความเร็ว 160 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง การทดลองควบคุมทำโดยใช้น้ำนึ่งฆ่าเชื้อ จัดการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) การทดลองละ 3 ซ้ำ

ตรวจผลการทดลองหลังการเขย่าบนเครื่อง shaker เมื่อเวลาผ่านไป 24 48 และ 72 ชั่วโมง โดยดูลักษณะผิดปกติที่เกิดขึ้นของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เมื่อครบ 72 ชั่วโมง จึงกรองเส้นใยที่ได้ในแต่ละการทดลองมาทำให้แห้งโดยใช้เครื่อง freeze dryer แล้วจึงชั่งน้ำหนักแห้ง และคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* โดยใช้สูตร

$$\frac{\text{น้ำหนักแห้งเส้นใยของเชื้อราในการทดลองควบคุม} - \text{น้ำหนักแห้งเส้นใยของเชื้อราที่เลี้ยงร่วมกับยีสต์}}{\text{น้ำหนักแห้งเส้นใยของเชื้อราในการทดลองควบคุม}} \times 100$$

2. การทดสอบการใช้ยีสต์ปฏิปักษ์ยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*

นำ spore suspension ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ความเข้มข้น 3 x 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และ cell suspension ของยีสต์ PA PG และ TD ความเข้มข้น 1 x 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในขวดอาหาร potato dextrose broth (PDB) ปริมาตร 8 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเขย่าบนเครื่อง shaker ที่มีความเร็ว 160 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6 ชั่วโมง สำหรับการทดลองควบคุมทำโดยใส่ spore suspension ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* และน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 9 มิลลิลิตร

บันทึกผลการทดลองโดยนับจำนวนสปอร์ที่งอกและไม่งอกของเชื้อรา *C. gloeosporioides* โดยใช้ haemacytometer แล้วคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกของสปอร์โดยใช้สูตร

$$\text{จำนวนสปอร์ที่งอก/จำนวนสปอร์ทั้งหมด} \times 100$$

และวัดความยาวของ germ tube โดยใช้ ocular micrometer และสังเกตลักษณะสปอร์ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จัดการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) การทดลองละ 5 ซ้ำ

ผล

1. การทดสอบการใช้ยีสต์ปฏิปักษ์ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ในอาหารเหลว

จากการทดลอง พบว่าปริมาณของเส้นใยเชื้อราสาเหตุที่เลี้ยงในอาหารเหลวร่วมกับยีสต์ปฏิปักษ์นั้นลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองควบคุม โดยพบว่ายีสต์ปฏิปักษ์ PA ควบคุมการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้มากที่สุด คือ 96.76 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ PG และ TD โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 81.42 และ 59.56 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากการตรวจดูลักษณะของเส้นใยที่เวลา 24 28 และ 72 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่ามีเซลล์ยีสต์จำนวนมากเกาะอยู่บริเวณภายนอกของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* พบว่าเส้นใยของเชื้อรามีขนาดลีบเล็ก ผนังเซลล์ไม่เรียบ การย้อมติดสีของผนังเซลล์ไม่สม่ำเสมอ ผนังเซลล์มีลักษณะคล้ายเป็นรู และพบว่าเส้นใยสูญเสียของเหลวภายในเซลล์เมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองควบคุม (Table 1)

Table 1 Mycelial growth inhibition of *C. gloeosporioides* on NYDB with antagonistic yeasts after 3 d incubation at room temperature.

Treatment	Mycelial growth inhibition (%)[1/]
C. gloeosporioides + *P. anomala*	96.76 c
C. gloeosporioides + *P. guilliermondii*	81.42 b
C. gloeosporioides + *T. delbrueckii*	59.65 a

[1/]Means followed by different letters were significantly different using LSD test ($p<0.05$), C.V. = 0.072%

2. การทดสอบการใช้ยีสต์ปฏิปักษ์ยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*

จากผลการทดลองพบว่าสปอร์ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่เลี้ยงในอาหารเหลวร่วมกับเชื้อยีสต์ PA PG และ TD มีอัตราการงอกลดลงอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติเมื่อเปรียบกับการทดลองควบคุม โดยยีสต์ที่สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ดีที่สุด คือ PA โดยมีอัตรา 86.77 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ PG และ TD คิดเป็นอัตรา 67.13 และ 62.74 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อวัดความยาว germ tube ของสปอร์เชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่เลี้ยงร่วมกับยีสต์แต่ละชนิดพบว่า ยีสต์ PA PG และ TD สามารถควบคุมการงอกของ germ tube ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยพบว่าความยาว germ tube ของสปอร์เชื้อรา *C. gloeosporioides* มีค่าเฉลี่ย 6.88 10.55 และ 22.55 ไมโครเมตร ตามลำดับ (Table 2) ส่วนการทดลองควบคุม พบว่า germ tube มีความยาวเฉลี่ย 107.09 ไมโครเมตร จากการตรวจลักษณะของสปอร์เชื้อรา *C. gloeosporioides* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หลังการเขย่าและบ่มเชื้อ 6 ชั่วโมง พบเซลล์ยีสต์เกาะโดยรอบ germ tube ลักษณะเช่นเดียวกันกับการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเส้นใย

Table 2 Spore germination inhibition and germ tube length of *C. gloeosporioides* on PDB with antagonistic yeasts after 6 h incubation at room temperature

Treatment	Inhibition (%)[2/]	germ tube length(μm)[3/]
C. gloeosporioides (Control)	-	107.09 a
C. gloeosporioides + *P. anomala*	86.77 a[1/]	6.88 c
C. gloeosporioides + *P. guilliermondii*	67.13 b	10.55 c
C. gloeosporioides + *T. delbrueckii*	62.74 b	22.55 b

[1/]Means followed by different letters were significantly different using LSD test ($p<0.05$), [2/]C.V. = 5.73%, [3/]CV = 9.30%

วิจารณ์ผล

ในการควบคุมโรคพืชที่เกิดจากเชื้อราโดยใช้ยีสต์ปฏิปักษ์นั้น มีรายงานว่ายีสต์ปฏิปักษ์มีกลไกในการควบคุมโดยการแย่งอาหารและพื้นที่ในการเจริญเติบโตของเชื้อรา การสร้างสารพิษเพื่อฆ่าเชื้อรา การสร้าง hydrolytic enzyme เพื่อย่อยผนังเซลล์ การสัมผัสกันโดยตรง และการกระตุ้นให้พืชสร้างความต้านทาน (Janisiewicz *et al*., 2000) ซึ่งยีสต์ที่ผลิตในเชิงพาณิชย์โดยส่วนใหญ่พบว่าสามารถสร้างเอนไซม์ β-1,3-glucanase และ chitinase (Chan and Tian, 2005; Droby, 2006)

การทดลองนี้พบว่ายีสต์ทั้ง 3 ชนิด สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยและยับยั้งการงอก germ tube ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ โดยพบว่า PA มีประสิทธิภาพดีที่สุด มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 96.76 และ 86.77 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์ยีสต์ทั้ง 3 ชนิด เจริญบนเส้นใยและบริเวณสปอร์ด้วยเช่นกัน มีรายงานของ Chanchaichaovivat *et al*. (2008) พบว่ายีสต์ PG สายพันธุ์ R-13 สามารถควบคุมเชื้อรา *C. capsici* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสบนผลพริกหลังการเก็บเกี่ยวได้ดี โดยพบว่าเซลล์ยีสต์ปฏิปักษ์ไปเกาะบริเวณเส้นใยของเชื้อรา *C. capsici* สอดคล้องกับการทดลองครั้งนี้ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่ายีสต์ PA PG และ TD ไปแย่งอาหารจากเชื้อรา *C. gloeosporioides* นอกจากนี้ยังเคยมีรายงานว่ายีสต์ปฏิปักษ์หลายชนิดรวมทั้ง PG สามารถสร้าง hydrolytic enzyme เช่น β-1,3-glucanase และ chitinase ซึ่งเคยพบทั้งในอาหารเหลวและในอาหารแข็ง (Chanchaichaovivat *et al*., 2008) ในการทดลองนี้พบว่าเส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา *C. gloeosporioides*

มีลักษณะคล้ายกับสูญเสียองค์ประกอบภายในเซลล์เมื่อตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จึงอาจเป็นไปได้ว่าเกิดจากเอนไซม์ที่ยีสต์ทั้ง 3 ชนิดสร้างขึ้นมา

สรุป

จากการนำยีสต์ปฏิปักษ์ทั้ง 3 ชนิด มาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของผลมะละกอ พบว่า *P. anomala* มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยและการงอกของสปอร์เชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ดีที่สุด โดยคิดเป็น 96.76 และ 86.77 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่าเซลล์ของยีสต์ปฏิปักษ์ *P. anomala, P. guilliermondii* และ *T. delbrueckii* สามารถเจริญครอบคลุมบนเส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* และทำให้สูญเสียองค์ประกอบภายในเซลล์ จากผลการทดลองครั้งนี้จะนำไปใช้ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสหลังการเก็บเกี่ยวกับผลมะละกอต่อไป

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่สนับสนุนงบประมาณในการวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2554 (ติดต่อส่วนตัว)

Cao, S., Z. Yang, Z. Hu and Y. Zheng. 2011. The effects of the combination of *Pichia membranefaciens* and BTH on controlling of blue mould decay caused by *Penicillium expansum* in peach fruit. Food chemistry 124: 991-996.

Chan, Z. and S. Tian. 2005. Interaction of antagonistic yeasts against postharvest pathogens of apple fruit and possible mode of action. Postharvest Biology and Technology 36: 215-223.

Chanchaichaovivat, A., B. Panijpan and P. Ruenwongsa. 2008. Putative modes of action of *Pichia guilliermondii* strain R13 in controlling chilli anthracnose after harvest. Biological control 47: 207-215.

Dickman, M. B. and A. M. Alvarez. 1983. Latent infection of papaya caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. Plant Disease 67: 748-750.

Droby, S. 2006. Yeast *Metschnikowia fructicola* NRRL Y-30752 for inhibiting deleterious microorganisms on plants. US Patent 6994849.

Hashem, M. and S. Alamri. 2009. The biocontrol of postharvest disease (*Botryodiplodia theobromae*) of guava (*Psidium guajava* L.) by the application of yeast strains. Postharvest Biology and Technology 53: 123-130.

Janisiewicz, W. J., T. J. Tworkoski, C. Sharer. 2000. Characterizing the mechanism of biological control of postharvest disease on fruits with a simple method to study competition for nutrients. Phytopathology 90: 1196-1200.

Lahlali, R., Y. Hamadi, M. El. Guilli and M. H. Jijakli. 2011. Efficacy assessment of *Pichia guilliermondii* strain Z1, a new biocontrol agent, against citrus blue mould in Morocco under the influence of temperature and relative humidity. Biological control 56: 217-224.

Rosa, M. M., S. M Tauk-Tornisielo, P. E. Rampazzo and S. R. Ceccato-Antonini. 2010. Evaluation of the biological control by the yeast *Torulaspora globosa* against *Colletotrichum sublineolum* in sorghum. World Journal of Microbiology & Biotechnology 26: 1491-1502.