การคัดเลือกและเพิ่มประสิทธิภาพของยีสต์ปฏิปักษ์ ในการควบคุมโรคราสีเขียว (*Penicillium digitatum*) บนผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง

Selection and Enhancement of Antagonistic Yeasts for Controlling Green Mold (*Penicillium digitatum*) of Citrus Fruit cv. Sai-Numphaung

สรวงสรรค์ เนียมแจ้ง[1] **และ สมศิริ แสงโชติ**[1]

Suangsan Niamjang [1] and Somsiri Sangchote [1]

abstract

Four yeasts isolates were evaluated for their antagonistic properties in controlling green mold on citrus fruit by applying both *Penicillium digitatum* and yeasts at difference times and incubated at 25 °C for 7 days. Application of yeast suspensions prior 12 and 24 hr to pathogen inoculation showed the lowest diseases incidence (0%) as compared with simultaneous application of yeasts and pathogen (20.51-46.15%) and application of yeasts after 12 hr to pathogen inoculation (41.02-61.53%). *Candida utilis* was the most effective in controlling *P.digitatum* (100%), it limited spore germination and germ tube elongation *P. digitatum* on citrus fruits.

When citrus fruits were treated with *C.utilis* in combination with 2% sodium bicabonate. The diseases was completely suppressed as compared with 2% sodium bicarbonate and antagonistic yeast alone.

Key words: yeasts, green mold, sodium bicarbonate

บทคัดย่อ

จากการทดสอบประสิทธิภาพของยีสต์ปฏิปักษ์ 4 ชนิด ในการควบคุมโรคราสีเขียวที่เกิดจากเชื้อรา *Penicillium ditgitatum* บนส้มสายน้ำผึ้ง ด้วยการปลูกเชื้อยีสต์ปฏิปักษ์ในเวลาที่แตกต่างกัน และบ่มที่ 25°C เป็นเวลา 7 วัน พบว่าการปลูกเชื้อด้วยยีสต์ปฏิปักษ์ก่อนเชื้อสาเหตุโรค 12 และ 24 ชั่วโมง สามารถควบคุมโรคราสีเขียวบนส้ม (เกิดโรค 0%) ได้ดีกว่าการปลูกเชื้อสาเหตุโรคและยีสต์ปฏิปักษ์พร้อมกัน (เกิดโรค 20.51-46.15%) และปลูกเชื้อด้วยยีสต์ที่หลัง (เกิดโรค 41.02-61.53%) โดยยีสต์ *Candida utilis* มีประสิทธิภาพสูงสุดในการควบคุมการเกิดโรคราสีเขียว โดยการฉีดพ่นเชื้อยีสต์ก่อน 12 ชั่วโมงสามารถควบดุมการเกิดโรคได้ 100% การงอกของสปอร์และการเจริญของเชื้อรา *Penicillium ditgitatum* ถูกยับยั้งบนผลส้มที่มีเชื้อยีสต์ *C. utilis*

เมื่อนำยีสต์ *C. utilis* มาใช้ร่วมกับ 2% โซเดียมไบคาร์บอเนต พบว่าการใช้ยีสต์ *C. utilis* มาใช้ร่วมกับ 2% โซเดียมไบคาร์บอเนต มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคราสีเขียวได้ดีกว่าการใช้ยีสต์ หรือ 2% โซเดียมไบคาร์บอเนตเพียงอย่างเดียว โดยไม่พบการเกิดโรคในวิธีการดังกล่าว

คำสำคัญ: ยีสต์, โรคเน่าราสีเขียว, โซเดียมไบคาร์บอเนต

คำนำ

ผลส้มเหล่านี้มีอัตราการเสื่อมสภาพเร็ว และเกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ในระหว่างขบวนการเก็บรักษาและการขนส่ง โรคของส้มที่สำคัญหลังการเก็บเกี่ยวและระหว่างกระบวนการขนส่งที่พบมากได้แก่ โรคราสีเขียวที่เกิดจากเชื้อ *Penicillium digitatum* (ศิริลักษณ์, 2545) ด้วยสาเหตุดังกล่าวจึงได้มีการหาวิธีควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยวที่มีความปลดภัยต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม การควบคุมโรคพืชโดยยีสต์จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง ที่มีการนำมาทดลองใช้ควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยว เพื่อลดปัญหาการใช้สารเคมี ซึ่งนอกจากจะสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราสาเหตุโรคแล้ว ยังสามารถมีชีวิตรอดและเพิ่มปริมาณได้มากเมื่อได้รับอาหารหรืออยู่ในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม การใช้ยีสต์ในการควบคุมเป็นสิ่งที่น่าสนใจ เนื่องจากยีสต์สามารถอาศัยอยู่บริเวณผิวผลไม้ตามธรรมชาติ และยีสต์เจริญเติบโตได้เร็วบนอาหารโดยใช้ธาตุคาร์บอนเป็นแหล่งอาหาร เช่น ใช้อาหารบริเวณแผลบนผิวผลไม้ ด้วยเหตุนี้จึงทำการศึกษาการควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยวของส้มโดยการใช้ยีสต์ปฏิปักษ์ เพื่อเป็นข้อมูลและแนวทางในการป้องกันโรคราสีเขียวของส้มต่อไป

[1] ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กทม. 10900

[1] Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkhen Campus, Bangkok 10900

วิธีการทดลอง

การทดลองที่1.การคัดเลือกและการทดสอบประสิทธิภาพของยีสต์ปฏิปักษ์ที่มีแนวโน้มในการควบคุมโรคราสีเขียวที่เกิดจากเชื้อรา *Penicillium digitatum* บนผลส้ม

1.1 การทดสอบเชื้อยีสต์ปฏิปักษ์ที่มีผลต่อการงอกของสปอร์ของเชื้อราร่า *P. digitatum* บนผลส้ม นำผลส้มมาทำความสะอาดด้วย 2% sodium hypochlorite ทำแผลบริเวณขั้วเบา ๆ โดยไม่ต้องทำใช้เข็ม หยดสปอร์แขวนลอยยีสต์ (*Candida tropicalis* , *Candida utilis* , *Pichia* sp.หรือ *Debaromyces hanenii*) 10^8 spore/ml ปริมาณ 20 µl ลงในรอยแผล หยดสปอร์แขนลอยของเชื้อรา *P. digitatum* 10^6conidia/ml ปริมาณ 20 µl ตามลงไปในบาดแผลเดิม เมื่อผลส้มแห้งบรรจุผลส้มลงภาชนะบรรจุที่มีความชื้น 90-95% ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ประมาณ 13 ชั่วโมง ตรวจวัดการงอกของconidia ที่ผลส้ม

1.2 การทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคราสีเขียวที่เกิดจากเชื้อรา *Penicillium digitatum* บนผลส้ม

ทำการปลูกเชื้อผลส้มด้วยสปอร์แขวนลอยยีสต์ 10^8 spore/ml ปริมาณ 20 µ ลงบนแผล และสปอร์แขนลอยของเชื้อรา *P. digitatum* 10^6conidia/ml ปริมาณ 20 ลงบนผล โดยทำการปลูกเชื้อด้วยยีสต์ก่อนและหลังเชื้อสาเหตุโรคเป็นเวลา 1, 6 12 และ 24 ชั่วโมง และปลูกเชื้อยีสต์และเชื้อสาเหตุโรคพร้อมกัน บรรจุผลส้มลงภาชนะบรรจุที่มีความชื้น 90-95% ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

การทดลองที่2 การทดสอบประสิทธิภาพของยีสต์ปฏิปักษ์เมื่อการใช้ร่วมกับ sodium bicarbonate

2.1 ศึกษาผลของยีสต์ร่วมกับ sodium bicarbonate ต่อเชื้อรา *P. digitatum* เตรียมตัวอย่างส้มและทำแผลเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 แล้วแบ่งส้มเป็น 4กลุ่มดังนี้ 1. หยด 2 % sodium bicarbonate 20 µl เพียงอย่างเดียว 2. หยดยีสต์ (ที่ได้ผลดีที่สุดจากการทดลองที่ 1) ร่วมกับ 2% sodium bicarbonate 20 µl 3. หยดยีสต์ อย่างเดียว 50 µl 4. หยดด้วยน้ำกลั่นนึ่ง จากนั้นนำทั้งหมดมาปลูกเชื้อด้วยเชื้อรา *P. digitatum* (10^6 conidia/ml) ปริมาณ 20 µl บ่มในตะกร้า คลุมด้วยถุงพลาสติก polyethylene เก็บไว้ที่ความชื้นสัมพัทธ์ 95 % อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน ตรวจวัดเปอร์เซ็นต์การยับยั้งโรค

2.2 ศึกษาการเพิ่มปริมาณของยีสต์เมื่อใช้ร่วมกับ sodium bicarbonate แบ่งผลส้มและทำเช่นเดียวกับข้อ 7.1 แต่ไม่ต้องปลูกเชื้อตามด้วยเชื้อรา *P.digitatum* ตัดเนื้อเยื่อของผลบริเวณแผลขนาด 1X1 เซนติเมตร วางลงในโกร่งที่มี 1ml ของ 0.05M phosphate buffer ที่ pH 7.0 และเจือจาง 10 เท่าด้วย 0.05M phosphate buffer ที่pH 7.0 นำมา 0.1 ml ของแต่ละ dilution มา spread บนอาหาร NYDA บ่มเชื้อไว้ที่ 25 องศาเซลเซียส ตรวจผลโดยการนับโคโลนีที่ 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง รายงานผลเป็นค่า $\log_{10}$

ผลและวิจารณ์

การทดลองที่ 1

เชื้อยีสต์จำนวน 4 ชนิด เมื่อนำไปคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้ง การเจริญของเชื้อรา *P. digitatum* บนผลส้ม พบว่าหลังจากปลูกเชื้อ 13 ชั่วโมง ยีสต์ทั้ง 4 ชนิด ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. digitatum* ได้ แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เชื้อยีสต์ *C. utilis* สามารถยับยั้งการเจริญและการงอกของสปอร์เชื้อราได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองควบคุมคือมีการงอกของสปอร์ 49 % และความยาวของ germ tube 57 µm รองลงมาด้วย *C. tropicalis, D. hansanii* และ *Pichia* sp. ตามลำดับ พบ การงอกของสปอร์ 54, 63.33 และ 65% ตามลำดับ และมีความยาวของ germ tube 66.45, 85.22 และ 93.66 µm ตามลำดับ (ตารางที่ 1) และพบว่าเชื้อยีสต์จะเจริญเกาะอยู่ตามสปอร์ และ germ tube ของเชื้อรา germ tube มีขนาดสั้นกว่าเชื้อราในการทดลองควบคุม การทดลอง แสดงให้เห็นว่ายีสต์สามารถเจริญได้รวดเร็ว และใช้อาหารได้ดีกว่า Droby et al. (1989,1992) พบว่ากลไกของยีสต์ในการควบคุมโรคส่วนใหญ่เป็นแบบเจริญรวดเร็ว แข่งขันทางด้านที่อยู่อาศัยและแหล่งอาหารกับเชื้อสาเหตุโรค จากการทดลองในปี 1992 ปลูกเชื้อยีสต์ *P. guilliermondii* และเชื้อรา *P.digitatum* บนผลเกร็ปฟรุต พบว่า ยีสต์สามารถเจริญได้เร็วกว่าในเวลา 24 ชั่งโมงเท่ากัน ในขณะที่สปอร์ของเชื้อรายังอยู่ในระยะการ germination เท่านั้น

ตารางที่ 1 การทดสอบเชื้อยีสต์ปฏิปักษ์ที่มีผลต่อการงอกของสปอร์ของเชื้อรา *P. digitatum* บนผลส้ม

วิธีการ	เปอร์เซนต์การงอกของสปอร์[1/]	ความยาวของgerm tube[1/]
การทดลองควบคุม	88[a]	134.2[a]
C.utilis	49[b]	57[b]
C.tropicalis	54[b]	66.45[b]
Pichia sp.	65[c]	93.67[c]
Debaromyces	63[c]	85.22[c]

[1/] Within columns means followed by same letter are not significantly different at $P = 0.01$

การทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคบนผลส้ม การทดลองที่ปลูกเชื้อยีสต์ปฏิปักษ์ ก่อนเชื้อสาเหตุโรคเป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคมากที่สุด โดยพบว่ายีสต์ *C. utilis* ควบคุมโรคได้ 100% เมื่อ ปลูกเชื้อบนผลส้มก่อนเชื้อรา *P.digitatum* 12 ชั่วโมง รองลงมาคือยีสต์ *C. tropicalis* ควบคุมโรคได้ 89.75% และ *D. hansanii* และ *Pichia* sp. ควบคุมโรคได้ 74 และ 84.61% ตามลำดับ เมื่อปลูกเชื้อยีสต์ก่อนเชื้อราสาเหตุโรค เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ยีสต์ *C. utilis*และ *C. tropicalis* ควบคุมโรคได้อย่างสมบูรณ์เมื่อเปรียบเทียบกับการปลูกเชื้อยีสต์และเชื้อสาเหตุโรคพร้อมกัน และปลูกเชื้อยีสต์หลังเชื้อสาเหตุโรค 12 และ 24 ชั่วโมง (ตารางที่ 2) สอดคล้อง Zhang et al. (2004) ที่ทดลองปลูกเชื้อบนลูกแพร์ด้วยยีสต์ *Cryptococcus laurentii* ก่อน *Botrytis cinerea* เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง สามารถควบคุมโรคได้อย่างสมบรูณ์ และพบว่าการปลูกเชื้อด้วยยีสต์หลังเชื้อสาเหตุโรค 24 ชั่วโมงควบคุมโรคได้น้อยที่สุด และการทดลองของสุมิตรา (2547) ซึ่งรายงานว่าการปลูกเชื้อยีสต์ *Endomycopces fibuligera* ก่อนเชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae* 24 ชั่วโมง ควบคุมโรคขั้วหวีเน่าได้และแสดงความรุนแรงของโรคเพียง 2.3% เมื่อเทียบกับการทดลองควบคุม

ตารางที่ 2 การทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคราสีเขียวที่เกิดจากเชื้อรา *P. digitatum* บนผลส้ม

กรรมวิธี	การยับยั้งโรค(%)[1/]			
	C. tropicals	*C.utilis*	*Pichia* sp.	*D. hansenii*
ปลูกเชื้อก่อน 1 ชั่วโมง	64.10[defg]	79.49ghij	58.97[cdef]	69.23[cdef]
ปลูกเชื้อก่อน 6 ชั่วโมง	79.41[ghi]j	89.74[ijk]	69.23[efgh]	74.36[fghi]
ปลูกเชื้อก่อน 12 ชั่วโมง	89.74[ijk]	100[k]	74.35[fghi]	84.61[hijk]
ปลูกเชื้อก่อน 24 ชั่วโมง	100[bk]	100[k]	92.30[jk]	94.87[jk]
ปลูกเชื้อพร้อมกัน	69.23[efgh]	79.49[ghij]	53.85[bcde]	69.23[cedf]
ปลูกเชื้อหลัง 1 ชั่วโมง	69.23[efgh]	79.49[ghij]	51.28[bcd]	53.87[bcde]
ปลูกเชื้อหลัง 6 ชั่วโมง	69.23[cdef]	69.23[efgh]	48.72[bcd]	48.72[cbd]
ปลูกเชื้อหลัง 12 ชั่วโมง	46.15[bcde]	58.97[cdef]	38.46[b]	48.72[cbd]
ปลูกเชื้อหลัง 24 ชั่วโมง	43.59[cb]	48.71[bcd]	38.46[b]	38.46[b]
การทดลองควบคุม	0[a]	0[a]	0[a]	0[a]

[1/] Within columns means followed by same letter are not significantly different at $P = 0.01$

การทดลองที่ 2

การนำยีสต์ *C. utilis* (ได้ผลจากการที่ 1) มาใช้รวมกับ 2% โซเดียมไบคาร์บอเนต เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งโรคที่เกิดจาก *P. digitatum* ได้ดีขึ้น โดยพบว่าการทดลองที่ใช้ ยีสต์ *C. Utilis* ร่วมกับ 2% โซเดียมไบคาร์บอเนตควบคุมโรคได้ 100% เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ยีสต์ หรือ 2% โซเดียมไบคาร์บอเนตเพียงอย่างเดียว ซึ่งควบคุมโรคได้ 90 และ 75% ตามลำดับ และให้ผลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองควบคุม (ตารางที่ 3) จากการทดลองของ Hongjie et al. (2004) ใช้ ยีสต์ *C. laurentii* และ*Trichosporon pululans* ร่วมกับ โซเดียมไบคาร์บอเนต ในการควบคุมโรคผลเน่าที่เกิดจาก *P. expansum* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองควบคุมและการใช้ยีสต์เพียงอย่างเดียว

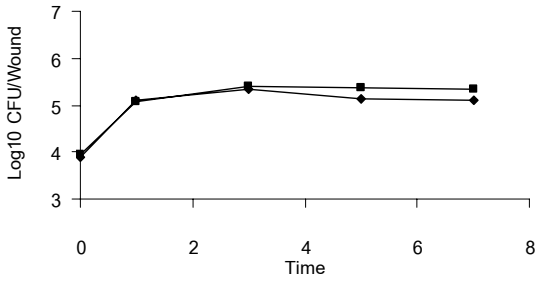
และยังมีการใช้ โซเดียมไบคาร์บอเนต เติมลงในผลิตภัณฑ์ Aspire *(Candida oliopiela)* เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุม *P.expansum* และ *B. cinere* บนแอปเปิ้ลและแพร์ (Droby et al., 2002)

ตารางที่ 3 การทดสอบประสิทธิภาพของยีสต์ปฏิปักษ์เมื่อการใช้ร่วมกับ โซเดียมไบคาร์บอเนต

กรรมวิธี	การยับยั้งโรค(%)
C.utilis	90[b]
C.utilis+NaHCO3	100[a]
NaHCO3	75[c]
control	0[c]

[1/] Within columns means followed by same letter are not significantly different at $P = 0.01$

การเติมโซเดียมไบคาร์บอเนตลงไปผสมกับยีสต์เป็นการเพิ่มการเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งโรคที่เกิดจาก *P. digitatum* น่าจะเป็นผลมาจากจำนวนประชากรของยีสต์ที่เพิ่มขึ้น จากการทดลองเมื่อนำส่วนของผลส้มบริเวณที่ปลูกเชื้อยีสต์ *C. utilis*ที่เติมและไม่เติม 2% โซเดียมไบคาร์บอเนต พบว่าหลังปลูกเชื้อ 48 ชั่วโมงยีสต์ที่เติม 2% โซเดียมไบคาร์บอเนต เพิ่มจำนวนประชาการได้มากและรวดเร็วกว่า ยีสต์บนแผลที่ปลูกเชื้อด้วยยีสต์อย่างเดียว Hongjie et al. (2004) รายงานว่าประชากรยีสต์บนลูกแพรที่ปลูกเชื้อ ยีสต์ *C. laurentii* และ*T. pululans* ร่วมกับ โซเดียมไบคารบอเนต เพิ่มขึ้นได้อย่างรวดเร็ว หลังจากปลูกเชื้อบนผลแล้ว 48-72 ชั่วโมง



ภาพที่1 การเพิ่มปริมาณของยีสต์เมื่อใช้ร่วมกับ sodium bicarbonate

สรุป

จากการทดสอบประสิทธิภาพของยีสต์ปฏิปักษ์ 4 ชนิด เพื่อควบคุมโรคราสีเขียวที่เกิดจากเชื้อรา *Penicillium ditgitatum* บนส้มสายน้ำผึ้ง ด้วยการปลูกเชื้อยีสต์ปฏิปักษ์ในเวลาก่อนและหลังเชื้อสาเหตุโรค 1, 6, 12, 24 ชั่วโมง และพร้อมกัน บ่มที่ 25° เป็นเวลา 7 วัน พบว่ายีสต์ *Candida utilis* มีประสิทธิภาพสูงสุดในการควบคุมการเกิดโรคราสีเขียว เมื่อปลูกเชื้อด้วยยีสต์ปฏิปักษ์ก่อนเชื้อสาเหตุโรค 12 และ 24 ชั่วโมง สามารถควบคุมโรค100% การงอกของสปอร์และการเจริญของเชื้อรา *Penicillium ditgitatum* บนผลส้มถูกยับยั้งที่มีเชื้อยีสต์ *C. utilis* เ มื่อนำยีสต์ *C. utilis* มาใช้ร่วมกับ 2% โซเดียมไบคาร์บอเนต พบว่าการใช้ยีสต์ *C. utilis* มาใช้ร่วมกับ 2% โซเดียมไบคาร์บอเนต มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคราสีเขียวได้ดี และจำนวนประชากรยีสต์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วหลังจากปลูกเชื้อแล้ว 48 ชั่วโมง

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ โครงการพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารอ้างอิง

Droby, S., E. Chalutz, C.L. Wilson and M.E. Winiewski. 1992. Biological control of postharvest disease : a promising alternative to the use of synthetic Fungicide. Phytoparasitica. 20: 1495-1535.

Droby, S., E. Chalutz, C.L. Wilson and M.E. Winiewski. 1989. Characterization of the Biocontrol activity of Debaryomices hansanii in the control of penicillium digitatum on grapefruit. Can.J.Microbiol. 35: 794-800.

Honglie, Y., T. Shiping and W. Yousheng. 2004. Sodium bicarbonate enhances biocontrol efficacy of yeasts on fungal spoilage of pears. International Journal of Food Microbiology 93: 297-304