Agricultural Sci. J. 44 : 3 (Suppl.) : 351-354 (2013) ว. วิทย. กษ. 44 : 3 (พิเศษ) : 351-354 (2556)

การควบคุมโรคผลเน่าและแอนแทรคโนสมะละกอหลังการเก็บเกี่ยวด้วยยีสต์ปฏิปักษ์

Postharvest Control of Papaya Fruit Rot and Anthracnose Using Antagonistic Yeasts

รัติยา พงศ์พิสุทธา[1,2] ชัยณรงค์ รัตนกรีฑากุล[1,2] พัทยา จำปีเรือง[1,2] วาสนา ทองปิ่น[1,2] และ รณภพ บรรเจิดเชิดชู[1,2]

Ratiya Pongpisutta[1,2], Chainarong Rattanakreetakul[1,2], Pattaya Jumpeerueng[1,2], Wassana Tongpin[1,2] and Ronnapop Bunjoedcherdchoo[1,2]

Abstract

Fruit rot and anthracnose of papaya is really serious in fresh fruit market. Postharvest control was evaluated against *Lasiodiplodia theobromae* and *Colletotrichum gloeosporioides*. Artificial inoculated fruits using 5d old mycelial disc were tested: 1) dip into 250 ppm difenoconazole, for 5 min, 2) dip into 0.5% ammonium bicarbonate, for 5 min, 3) spray with cell suspension of yeast with $1x10^8$cell/cm^3, *Saccharomycopsis fibuligera* (test to *L. theobromae*) / *Pichia anomala* (test to *C. gloeosporioides*), 4) dip into 0.5% ammonium bicarbonate, for 5 min and then spray with cell suspension of yeast, and 5) dip into hot water at 47 °C, for 30 min. Treated fruits were storaged at 15 and 25°C. Result revealed that storage at 15°C was the most effective control to both pathogens. However, at 25°C storage, fruits inoculated with *L. theobromae* then dipped into difenoconazole, dipped into hot water and sprayed with cell suspension of *S. fibuligera* showed disease incidence by 28.90, 71.20 and 80.20 mm, respectively after 5 d incubation (LSD=34.60). Whilst fruits inoculated with *C. gloeosporioides*, then dipped into difenoconazole and sprayed with cell suspension *P. anomala*, illustrated disease incidence by 19.50 and 21.90 mm, respectively after 6 d incubation (LSD=8.91). Examination of the direct interaction between yeast and pathogen by scanning electron microscope (SEM) showed a persistent adherence between hyphae and conidia of pathogens and yeasts. Additionally, the hyphae and conidia of pathogen were penetrated and destroyed by the cells of the antagonistic yeasts. It strongly recommends the use of *S. fibuligera* and *P. anomala* as effective bio agents against fruit rot and anthracnose of papaya fruits.

Keywords: Postharvest disease control, papaya, yeast

บทคัดย่อ

โรคผลเน่าและโรคแอนแทรคโนสของผลมะละกอเป็นโรคที่สำคัญสร้างความเสียหายเป็นอย่างมากในตลาดผลไม้สด งานวิจัยนี้ได้ทดสอบวิธีควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยวที่เกิดจากเชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae* และ *Colletotrichum gloeosporioides* โดยนำผลมะละกอพันธุ์ปลักไม้ลายที่ปลูกเชื้อด้วยเส้นใยเชื้อสาเหตุอายุ 5 วัน จากนั้นนำมาทดสอบวิธีควบคุมโรค 5 วิธี ได้แก่ 1) การแช่ในสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา difenoconazole ความเข้มข้น 250 ppm นาน 5 นาที 2) แช่ในสารละลายเจือปนอาหาร 0.5% ammonium bicarbonate นาน 5 นาที 3) ฉีดพ่นสารละลายแขวนลอยเซลล์ยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* (ทดสอบกับเชื้อรา *L. theobromae*) / *Pichia anomala* (ทดสอบกับเชื้อรา *C. gloeosporioides*) จำนวน $1x10^8$เซลล์/มล. 4) แช่ในสารละลายเจือปนอาหาร 0.5% ammonium bicarbonate นาน 5 นาที แล้วฉีดพ่นด้วยสารละลายแขวนลอยเซลล์ยีสต์ และ 5) แช่ในน้ำร้อน 47 °C นาน 30 นาที จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 15 และ 25°C พบว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 15°C สามารถควบคุมเชื้อสาเหตุทั้งสองชนิดได้ดี อย่างไรก็ตามที่อุณหภูมิ 25°C ผลมะละกอที่ปลูกเชื้อ *L. theobromae* แล้วแช่ในสารเคมี difenoconazole แช่ในน้ำร้อน และฉีดพ่นสารละลายแขวนลอยเซลล์ยีสต์ *S. fibuligera* หลังการบ่ม 5 วัน พบขนาดแผลเท่ากับ 28.90, 71.20 และ 80.20 มิลลิเมตร ตามลำดับ (LSD=34.60) ส่วนผลมะละกอที่ปลูกเชื้อ *C. gloeosporioides* ที่แช่ในสารเคมี difenoconazole และฉีดพ่นสารละลายแขวนลอยเซลล์ยีสต์ *P. anomala* หลังการบ่ม 6 วัน พบขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางแผลเท่ากับ 1.95 และ 2.19 เซนติเมตร ตามลำดับ (LSD=8.91) จากการศึกษาปฏิกิริยาระหว่างยีสต์และเชื้อราสาเหตุใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด พบการยึดเกาะระหว่างเซลล์ของยีสต์และเส้นใยและสปอร์ของเชื้อราสาเหตุ นอกจากนี้พบการเจาะผนังเส้นใยหรือสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรค ซึ่งน่าจะนำมาใช้เป็น bioagent ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าและแอนแทรคโนสหลังการเก็บเกี่ยวในผลมะละกอได้

คำสำคัญ: การควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยว มะละกอ ยีสต์

---

[1] ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140

[1] Department of Plant pathology, Faculty of Agriculture at KPS, Kasetsart University, Kamphaengsaen Campus, Nakhon Pathom 73140

[2] ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กรุงเทพ 10400

[2] Postharvest Technology Innovation Center, Commission on Higher Education, Bangkok 10400

คำนำ

มะละกอเป็นไม้ผลที่ปลูกได้ทั่วประเทศ รับประทานทั้งผลดิบและผลสุก นอกจากนี้ยังมีวิตามินซีสูง ช่วยในการระบาย ในกรณีที่ทานผลสุก ปัญหาที่ตามมาคือโรคหลังการเก็บเกี่ยว โรคที่สำคัญคือโรคแอนแทรคโนส เกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* และโรคผลเน่าโดยเฉพาะโรคขั้วผลเน่า เกิดจากเชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae* งานวิจัยที่ผ่านมาของการควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยว มักใช้สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา และการใช้น้ำร้อน ปัจจุบันนี้มีการนำจุลินทรีย์มาควบคุมโรคพืชทั้งก่อนและหลังการเก็บเกี่ยวมากขึ้น ยีสต์เป็นเชื้อราชนิดหนึ่งและมีศักยภาพต่อการนำมาใช้ประโยชน์ในการควบคุมโรคพืชหลังการเก็บเกี่ยว โดยทั่วไปแล้วสปอร์ยีสต์ไม่สร้างสารที่ก่อให้เกิดภูมิแพ้ หรือสารพิษ (mycotoxin) เหมือนอย่างที่เชื้อราสร้าง หรือแม้แต่สารปฏิชีวนะซึ่งเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สร้างขึ้น งานวิจัยนี้ได้ศึกษายีสต์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสและโรคขั้วผลเน่า

อุปกรณ์และวิธีการ

ทดสอบประสิทธิภาพของยีสต์ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสและโรคเน่าบนผลมะละกอ

นำมะละกอพันธุ์ปลักไม้ลายระยะที่ปรากฏสีเหลืองหนึ่งในสี่ของผลมาล้างทำความสะอาดผึ่งให้แห้ง ปลูกเชื้อด้วยเชื้อราสาเหตุโรค *C. gloeosporioides* และ *L. theobromae* ที่เลี้ยงบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) อายุ 5 วัน โดยใช้ mycelia disc สำหรับ *C. gloeosporioides* ทำแผลบริเวณกึ่งกลางผล ด้วยเข็มที่มีความลึก 2 มม. ส่วน *L. theobromae* ปลูกเชื้อบริเวณขั้วผล บ่มทิ้งไว้ใน moist chamber นาน 8 และ 10 ชม. ตามลำดับ นำไปทดสอบการควบคุมด้วยกรรมวิธีต่างๆ 1). แช่สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา difenoconazole ความเข้มข้น 200 ppm นาน 5 นาที 2). แช่สารละลาย 0.2% ammonium bicarbonate (ABC) (สำหรับผลที่ปลูกเชื้อ *C. gloeosporioides*) และ 0.5%ABC (สำหรับผลที่ปลูกเชื้อ *L. theobromae*) นาน 5 นาที 3). แช่น้ำร้อน 47°ซ นาน 30 นาที จากนั้นนำไปแช่ในน้ำเย็น 10 นาที 4). ฉีดพ่นยีสต์ *Pichia anomala* (มะละกอที่ปลูกเชื้อ *C. gloeosporioides*) และ *Saccharomycopsis fibuligera* (สำหรับผลที่ปลูกเชื้อ *L. theobromae*) ซึ่งยีสต์มีความเข้มข้น $1x10^8$ เซลล์/มล. 5) แช่ใน 0.2%ABC จากนั้นฉีดพ่นยีสต์ *P. anomala* (สำหรับผลที่ปลูกเชื้อ *C. gloeosporioides*)/แช่ใน 0.5%ABC และฉีดพ่นยีสต์ *S. fibuligera* (สำหรับผลที่ปลูกเชื้อ *L. theobromae*) และ 6) แช่ในน้ำกลั่น (ชุดควบคุม) นำผลมะละกอที่ผ่านกรรมวิธีดังกล่าวบ่มที่อุณหภูมิ 15 และ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 14 วัน ใช้มะละกอจำนวน 5 ซ้ำ/การทดลอง บันทึกผลการทดลอง โดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางแผล นำมาหาค่าเฉลี่ย วางแผนการทดลองแบบ CRD

ศึกษากลไกในการเข้าทำลายของยีสต์ปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรค

ล้างทำความสะอาดที่ผิวผลมะละกอด้วย 70%ethyl alcohol จากนั้นปลูกเชื้อรา *C. gloeosporioides*/*L. theobromae* โดยทำแผลจำนวน 5 แผล/ผล ด้วยเข็มมีความลึก 2 มม. หยด spore suspension ความเข้มข้น 1 x 10^8 เซลล์/มล. ปริมาตร 50 ไมโครลิตร หยดลงบนแผล นำผลมะละกอใส่ใน moist chamber เก็บที่อุณหภูมิห้องนาน 12 ชม. จากนั้นหยด cell suspension ของยีสต์ปฏิปักษ์ *P. anomala*/ *S. fibuligera* ความเข้มข้น 1 x 10^8 เซลล์/มล. ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงบนแผลที่ปลูกเชื้อราสาเหตุไว้ นำผลมะละกอเก็บใน moist chamber ในสภาพเดิมอีกครั้งเป็นเวลา 24 ชม. และทดสอบความสามารถของยีสต์ในการครอบครองพื้นที่ก่อนการปลูกเชื้อราสาเหตุ โดยปฏิบัติเช่นเดียวกันด้วยการหยด cell suspension ของยีสต์ปฏิปักษ์ลงบนแผล นำผลมะละกอบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 24 ชม. จากนั้นหยด spore suspension ของเชื้อราสาเหตุโรค ลงบนแผลเดิม บ่มที่สภาพเดียวกัน 12 ชม. เมื่อครบกำหนดตัดตัวอย่างให้มีขนาด 5x5 มม. หนาไม่เกิน 3 มม. นำไปแช่ในสารละลาย 2.5% glutaraldehyde ใน 0.1 M phosphate buffer pH 7.2 นาน 24 ชม. และเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope, SEM) ขั้นตอนต่อไป

ผลและวิจารณ์ผล

การทดสอบประสิทธิภาพของยีสต์ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสและโรคผลเน่า บนผลมะละกอพันธุ์ปลักไม้ลาย

ผลมะละกอที่ปลูกเชื้อ *C. gloeosporioides* และการเก็บรักษาที่ 15°ซ นาน 6 วัน พบว่า ทุกกรรมวิธีการที่ใช้ควบคุมมีการพัฒนาของแผลไม่แตกต่างกันทางสถิติ การแช่ difenoconazole การฉีดพ่นด้วยยีสต์ *P. anomala* และ การแช่ 0.2%ABC ร่วมกับการฉีดพ่นด้วยยีสต์ มีขนาดแผลเฉลี่ย 1.10, 1.80 และ 1.80 มม. ตามลำดับ ส่วนการทดลองควบคุม มีขนาดแผล 7.60 มม. (LSD=3.96) เมื่อเก็บนานขึ้นนาน 14 วัน พบว่าผลที่แช่ difenoconazole และการฉีดพ่นยีสต์ ควบคุมโรคได้มีประสิทธิภาพ มีขนาดแผลเฉลี่ย 9.95 และ 19.85 มม. ตามลำดับ (LSD=7.34) สำหรับผลมะละกอที่เก็บรักษาที่

อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 6 วัน พบว่าผลที่แช่ difenoconazole และ การฉีดพ่นด้วยยีสต์ มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคได้ดี มีขนาดแผลเฉลี่ย 19.50 และ 21.90 มม. ตามลำดับ (LSD=8.91) (Table 1)

การควบคุมโรคขั้วผลเน่าที่อุณหภูมิ 15°ซ นาน 5 วัน พบว่าการแช่ difenoconazole การแช่ 0.5%ABC ร่วมกับการฉีดพ่นยีสต์ *S. fibuligera* และการแช่น้ำร้อน 47°ซ มีประสิทธิภาพดีที่สุด มะละกอที่ปลูกเชื้อไม่แสดงอาการของโรค รองลงมาได้แก่ การฉีดพ่นยีสต์ *S. fibuligera* แผลมีขนาดเฉลี่ย 2.60 มม. ส่วนการทดลองควบคุมมีขนาดแผลเฉลี่ย 19.10 มม. (LSD=0.89) เมื่อเก็บนาน 14 วัน พบว่ามะละกอที่แช่ difenoconazole ยังคงมีประสิทธิภาพดีที่สุด รองลงมาคือการฉีดพ่นยีสต์และการแช่น้ำร้อน 47°ซ. ขนาดแผลเฉลี่ย 26.60, 58.40 และ 62.70 มม. ตามลำดับ ส่วนการทดลองควบคุม มีขนาดแผลเฉลี่ย 154.50 มม. (LSD=4.66) ส่วนการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25°ซ นาน 5 วัน พบว่าการแช่ difenoconazole มีประสิทธิภาพดีที่สุด ขนาดแผลเฉลี่ย 28.90 มม. เปรียบเทียบกับการทดลองควบคุมมีขนาดแผลเฉลี่ย 111.00 มม. (LSD=3.46) (Table 2)

Table 1 Disease lesion on papaya fruits after inoculated with *Colletotrichum gloeosporioides*, treated by 6 different treatments and incubated at 15 and 25°C for 6 and 14 days

Treatment	Disease lesion at d6 (mm)		Disease lesion at d14 (mm)
	15°C	25°C	15°C
Control	7.60a[1/]	35.90a	34.10a
Dip into difenoconazole 250 ppm 5 min	1.10b	19.50c	9.95d
Dip ito hot water 47°C 30 min	2.50b	24.50bc	27.50ab
Dip into 0.2%ABC 5 min	2.25b	26.30bc	26.75bc
Dip into 0.2%ABC 5 min + sprayed with yeast *Pichia anomala* 1x10^8 cell/ml	1.80b	33.20ab	26.00bc
sprayed with yeast *Pichia anomala* 1x10^8 cell/ml	1.80b	21.90c	19.85c
CV	106.84	24.76	23.40
LSD	3.96	8.91	7.34

[1/]Means followed by different letters in the same column were significantly different using LSD test ($p<0.05$)

Table 2 Disease lesion on papaya fruits after inoculated with *Lasiodiplodia theobromae*, treated by 6 different treatments and incubated at 15 and 25°C for 5 and 14 days

Treatment	Disease lesion at d5 (mm)		Disease lesion at d14 (mm)
	15°C	25°C	15°C
Control	19.10a[1/]	111.00a	154.50a
Dip into difenoconazole 250 ppm 5 min	no lesion	28.90c	26.60d
Dip into hot water 47°C 30 min	no lesion	71.20b	62.70cd
Dip into 0.5%ABC 5 min	8.90bc	84.80ab	135.30ab
Dip into 0.5%ABC 5 min + sprayed with yeast *Saccharomycopsis fibuligera* 1x10^8 cell/ml	no lesion	101.90ab	98.10bc
sprayed with yeast *Saccharomycopsis fibuligera* 1x10^8 cell/ml	2.60b	80.2ab	58.40cd
cv	121.39	33.24	39.97
LSD	8.90	34.60	46.60

[1/]Means followed by different letters in the same column were significantly different using LSD test ($p<0.05$)

ทดสอบประสิทธิภาพของยีสต์ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสและโรคเน่าบนผลมะละกอ

พบว่าการปลูกเชื้อยีสต์ก่อนหรือหลังการปลูกเชื้อ *C. gloeosporioides* / *L. theobromae* นั้น เซลล์ของยีสต์ปฏิปักษ์เจริญครอบคลุมพื้นที่ผิวด้านบนและช่องเปิดที่เป็นแผล เพิ่มปริมาณโดยการแตกหน่อ (budding) ได้ และยึดเกาะและฝังตัวบริเวณสปอร์และผนังเส้นใยของเชื้อราสาเหตุ บริเวณสปอร์ของเชื้อราที่ถูกยึดเกาะด้วยยีสต์ มีลักษณะเหี่ยวและผนังเซลล์ไม่สมบูรณ์ ผนังฉีกขาดอย่างเห็นได้ชัด (Figure 1 and 2)

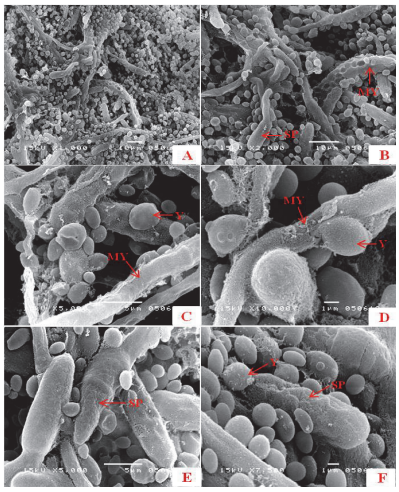

Figure 1 Scanning electron micrographs of antagonistic yeast cells of *Pichia anomala* TISTR5329 (A-B) heavy yeast colonized around the hyphae of *Colletotrichum gloeosporioides* (B-E) interacting with hyphae and conidia of the pathogen on papaya peel and in inoculated hole (F) pitting in the hyphal cell wall, after inoculation with fungal conidia suspension and 12h

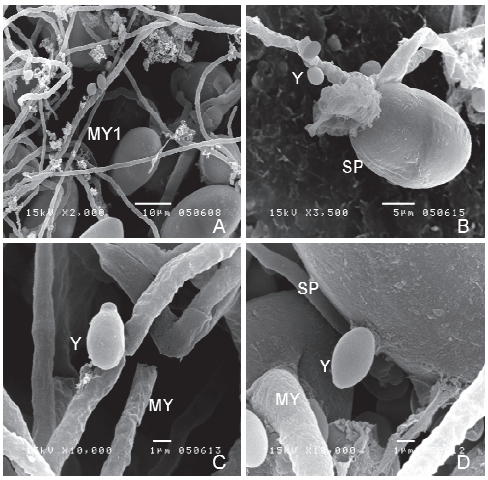

Figure 2 Scanning electron micrographs of antagonistic yeast cells of *Saccharomycopsis fibuligera* interacting hyphae and conidia of *Lasiodiplodia theobromae*. Fungal hyphae and conidia were totally penetrated by cell of the antagonistic yeast (A-D)

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การทดสอบการควบคุมโรคแอนแทรคโนสบนผลมะละกอและเก็บ 15°ซ นาน 6 วัน ทุกกรรมวิธีพบว่าขนาดของแผลไม่มีความแตกต่างทางสถิติ และเมื่อเก็บนาน 14 วัน พบว่าการแช่ difenoconazole ให้ผลดีที่สุด รองลงมาคือการฉีดพ่นยีสต์ *P. anomala* ส่วนมะละกอที่เก็บที่อุณหภูมิ 25°ซ นาน 6 วัน พบว่าการแช่ difenoconazole และการฉีดพ่นยีสต์ สามารถยับยั้งการเกิดโรคได้ดีที่สุด ส่วนยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* สามารถควบคุมโรคขั้วผลเน่าได้มีประสิทธิภาพเท่ากับการแช่ difenoconazole เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน ส่วนการศึกษาการเป็นปฏิปักษ์ของยีสต์กับเชื้อราสาเหตุด้วยกล้อง SEM พบว่ายีสต์สามารถเพิ่มปริมาณทั้งการปลูกเชื้อก่อนและหลังการปลูกเชื้อราสาเหตุโรค เซลล์ของยีสต์เกาะสัมผัสแน่นกับเส้นใยและสปอร์ของเชื้อราสาเหตุ Nantawanit *et al.* (2010) เคยรายงานว่า สปอร์และเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum capsici* ผิดรูปไปจากเดิม อาจเป็นไปได้ว่ายีสต์ *Pichia guilliermondii* สายพันธุ์ R13 สร้างสารที่สามารถยับยั้งเชื้อราได้ Richmond (1975) รายงานว่า สารประกอบเหล่านี้ได้แก่ เช่น phenylalanine ammonia-lyase (PAL), chitinase และ β-1,3-glucanase นอกจากนี้พบการสะสมของ casidiol ซึ่งเป็น phytoalexin อีกด้วย เป็นไปได้ว่าสารประกอบที่สร้างขึ้นมานี้ส่งผลทำให้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราผิดรูปไป มีรายงานว่า *P. anomala* สามารถควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชค่อนข้างกว้าง เนื่องจากมีการสร้างเอนไซม์ที่ย่อยสลายบริเวณผนังเซลล์ของเชื้อราหรือสร้างสารพิษที่มีผลต่อเชื้อราได้ (Freudlund *et al.*, 2002).

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่ให้การสนับสนุนงานวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

Freudlund, E., U. Druvefors, M.E. Boysen, K. Lingsten and J. Schnurer. 2002. Physiological characteristics of the biocontrol yeast *Pichia anomala* J121. FEMS Yeast Research 2: 395–402.

Nantawanit, N., A. Chanchaichaovivat, B. Panijpan and P. Ruenwongsa. 2010. Induction of defense response against *Colletotrichum capsici* in chili fruit bt the yeast *Pichia guilliermondii* strain R13. Biological Control 52:145-152.

Richmond, D.V. 1975. Effects of toxicants on the morphology and fine structure of fungi. Advances in Applied Microbiology 19: 289-319.