Agricultural Sci. J. 39 : 3 (Suppl.) : 35-38 (2008) ว. วิทย. กษ. 39 : 3 (พิเศษ) : 35-38 (2551)

# การคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสที่เกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum musae* (Berk & Curtis) บนกล้วยหอมทอง

# Screening antagonistic yeasts for controlling anthracnose disease of banana cv. Hom Thong, caused by *Colletotrichum musae* (Berk & Curtis)

**วีระณีย์ ทองศรี[1] และสมศิริ แสงโชติ[1]**
Veeranee Tongsri[1] and Somsiri Sangchote[1]

**Abstract**

Ten yeasts including *Candida utilis*, *C. tropicalis, Pichia membranaefaciens, Cryptococcus humicola* BCC 7701, *C. guilliermondii* BCC 5389, *C. sake* TISTR 5143, *Debaryomyces hansenii* TISTR 5155, *Aureobasidium pullulans* TISTR 3389, *Saccharomycopsis fibuligera* TISTR 5033, and *Rhodotorula glutinis* TISTR 5159 were used in this study. Dual culture tests between the pathogen, *Colletotrichum musae* and each yeast were determined its antagonistic effect on PDA plate for 6 days at room temperature. The results showed that *A. pullulans* TISTR 3389 gave the highest inhibition of mycelial growth at 40.6%, and then, following by 32.1% of *C. utilis*. These yeasts were further evaluated for their suppression of anthracnose lesions on wounded fruits and incubated at 25 °C for 6 days. The results revealed that three yeasts including *D. hansenii* TISTR 5155, C. sake TISTR 5143 and *C. utilis* gave a good suppression of anthracnose lesion on banana fruits, the disease was reduced by 38-54%.

**Keywords**: mycelial growth inhibition, dual culture, lesion size

**บทคัดย่อ**

จากการนำเชื้อยีสต์ 10 ชนิด ประกอบด้วย *Candida utilis*, *C. tropicalis, Pichia membranaefaciens, Cryptococcus humicola* BCC 7701, *C. guilliermondii* BCC 5389, *C. sake* TISTR 5143, *Debaryomyces hansenii* TISTR 5155, *Aureobasidium pullulans* TISTR 3389 *Saccharomycopsis fibuligera* TISTR 5033 และ *Rhodotorula glutinis* TISTR 5159 มาทดสอบการเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Colletotrichum musae* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของกล้วยหอมทองบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ด้วยวิธี duel culture เป็นระยะเวลา 6 วันที่อุณหภูมิห้อง พบว่าเชื้อยีสต์ *A. pullulans* TISTR 3389 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. musae* ได้มากที่สุดถึง 40.6 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือเชื้อยีสต์ *C. utilis* ซึ่งสามารถยับยั้งได้ 32.1% ในขณะที่เมื่อนำเชื้อยีสต์มาทดสอบการยับยั้งการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนผลกล้วยหอมทองที่อุณหภูมิ 25°ซ พบว่าเชื้อยีสต์สามชนิด คือ *D. hansenii* TISTR 5155, C. sake TISTR 5143 และ *C. utilis* สามารถยับยั้งการเกิดโรคได้ดี โดยลดการเกิดโรคได้ถึง 38-54 เปอร์เซ็นต์

**คำสำคัญ**: การยับยั้งการเจริญเติบโต การเลี้ยงเชื้อร่วม ขนาดแผล

## คำนำ

เชื้อรา *Colletotrichum musae* (Berk. & Curt) เป็นสาเหตุของโรคแอนแทรคโนสของกล้วย พบมีการแพร่กระจายในบริเวณที่มีการปลูกกล้วยทั่วๆ ไป จึงมักก่อให้เกิดความเสียหายทั้งทางด้านปริมาณและคุณภาพต่อการผลิตและการส่งออกกล้วยเป็นประจำ ดังนั้นผู้ประกอบการจึงหาวิธีที่จะช่วยลดความเสียหายเหล่านี้ให้น้อยลง ซึ่งการจัดการโรคแอนแทรคโนสรวมทั้งโรคหลังการเก็บเกี่ยวอื่นๆ ของกล้วยนั้น แต่เดิมนิยมใช้สารเคมีกำจัดเชื้อราเพียงอย่างเดียว ดังเช่นในกลุ่มประเทศแคริบเบียนที่อนุญาตให้ใช้สารเคมีกำจัดเชื้อรา 7 ชนิดในอุตสาหกรรมการผลิตกล้วย แต่มีเพียง thiabendazole และ imazalil เท่านั้นที่อนุญาตให้ใช้ภายหลังการเก็บเกี่ยวได้ (Krauss and Johanson, 2000) แต่เมื่อตระหนักถึงความปลอดภัยของผู้บริโภคและสภาพแวดล้อม รวมถึงข้อกำหนดระดับสารตกค้างในผลิตผลของประเทศคู่ค้า ผู้ผลิตจึงหาทางลดการใช้สารเคมีลงโดยใช้ร่วมกับวิธีการอื่นๆ เช่น ใช้สาร antioxidants ร่วมกับ thiabendazole และ imazalil (Khan *et al*., 2001) หรือใช้วิธีจุ่มผลกล้วยในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 52-55 °ซ ร่วมกับการใช้ benzimidazole เพื่อลดความรุนแรงของโรคแอนแทรคโนส

[1]ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร/ ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900
[1]Department of Plant pathology, Faculty of Agriculture / Postharvest Technology Innovation Center, Kasetsart University, Bangkok 10900

(Pongsuwan, 1993) อย่างไรก็ตามถึงแม้วิธีการข้างต้นสามารถช่วยลดความรุนแรงของโรคได้ แต่มักมีปัญหาของสารเคมีตกค้างในผลิตผล ซึ่งส่งผลเสียโดยตรงต่อสุขภาพของผู้บริโภค รวมถึงเชื้อสาเหตุโรคพืชเกิดการดื้อต่อสารเคมี (Krauss and Johanson, 2000) ดังนั้นในปัจจุบันผู้ผลิตจึงพยายามหาวิธีการอื่นๆ เพื่อทดแทนการใช้สารเคมี ทางเลือกหนึ่งนั่นก็คือการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี ซึ่งยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่ถูกนำมาใช้ในผลิตผลหลังการเก็บเกี่ยวเป็นลำดับต้นๆ เช่น การนำเชื้อยีสต์ *Cryptococcus* spp. *Debaromyces* spp. *Filobasidium* spp. *Metschnikowia pulcherrima* และ *Rhodotorula glutinis* มาใช้ควบคุมโรคผลเน่าของแอบเปิ้ลที่เกิดจากเชื้อรา *Penicillium expansum Botrytis cinerea* และ *Glomerella cingulata* (Blum *et al.,* 2005; Castoria *et al.,* 2005) รวมถึงการใช้ยีสต์ *Candida famata* ควบคุมโรคผลเน่าของส้มที่เกิดจากเชื้อรา *P. digitatum* ซึ่งพบว่าเชื้อยีสต์สามารถชักนำให้พืชสร้าง phytoalexin คือ scoparone ได้ด้วย (Arras, 1996) อย่างไรก็ตามถึงแม้จะมีรายงานการใช้ยีสต์ในผลิตผลหลังการเก็บเกี่ยวค่อนข้างแพร่หลาย แต่ที่ประสบผลสำเร็จจนพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ทางการค้าคือ Aspire (ได้จากยีสต์ *Candida oliophola*) และ Yield Plus (ได้จากยีสต์ *Cryptococcus albidus*) เท่านั้น (Zhou *et al.,* 2001; Droby *et al.,* 2002) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อยีสต์ที่ใช้ทางด้านอาหารต่อการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคแอนแทรคโนสของกล้วยหอมทอง เพื่อเป็นแนวทางในการป้องกันกำจัดโรคหลังการเก็บเกี่ยวของพืชชนิดอื่นๆ รวมถึงเข้าใจกลไกในการควบคุมโรคพืชของเชื้อยีสต์ต่อไป

## อุปกรณ์และวิธีการ

### การทดสอบเชื้อยีสต์ต่อการเจริญโตของเชื้อรา *colletotrichum musae* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

เชื้อยีสต์ 10 ชนิดที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ *Candida utilis*, *C. tropicalis* และ *Pichia membranaefaciens* ได้มาจากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ *Cryptococcus humicola* BCC 7701 และ *Candida guilliermondii* BCC 5389 ได้มาจากสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (National Science and Technology Development Agency; NSTDA) *Candida sake* TISTR 5143, *Debaryomyces hansenii* TISTR 5155, *Aureobasidium pullulans* TISTR 3389, *Saccharomycopsis fibuligera* TISTR 5033 และ *Rhodotorula glutinis* TISTR 5159 ได้มาจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (Thailand Institute of Scientific and Technological Research; TISTR) โดยนำเชื้อยีสต์มาทดสอบการเจริญเติบโตร่วมกับเชื้อรา *C. musae* บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุณหภูมิห้อง (25-28°ซ) ย้ายชิ้นส่วนของเชื้อราที่ได้จากการใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มม. ตัดส่วนรอบนอกโคโลนี มาวางให้ห่างจากขอบจานอาหาร 1.5 ซม. และใช้ loop ย้ายเชื้อยีสต์มาขีดเป็นเส้นตรงในด้านตรงข้ามของจานอาหาร บ่มเชื้อไว้เป็นเวลา 6 วัน วัดรัศมีการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา ทำการทดลอง 3 ซ้ำ คำนวณเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเติบโตโดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

### การทดสอบเชื้อยีสต์ต่อการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนผลกล้วยหอมทอง

นำหวีกล้วยหอมทองซึ่งอยู่ในระยะผลแก่ 70 เปอร์เซ็นต์มาตัดให้เป็นผลเดี่ยว ล้างผิวรอบนอกและยางให้สะอาด ผึ่งให้แห้ง จัดเรียงผลกล้วยในตะกร้าพลาสติก ใช้เข็มทำแผลบนผลกล้วยผลละ 3 จุด จากนั้นนำเชื้อยีสต์ที่ผ่านการเลี้ยงในอาหารเหลว nutrient yeast dextrose broth (NYDB) บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน มาหยดลงบนแผลปริมาตร 20 ไมโครลิตรต่อแผล บ่มผลกล้วยในถุงพลาสติกที่มีความชื้นสูงเป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณภูมิที่ 25°ซ จากนั้นจึงหยด spore suspension ของเชื้อรา *C. musae* ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อบนผลกล้วย โดยปรับความเข้มข้นของ inoculum ให้มีความเข้มข้น $10^5$ สปอร์ต่อมิลลิลิตรและหยดในปริมาตร 20 ไมโครลิตรต่อแผลเช่นเดียวกัน ในยีสต์แต่ละชนิดทำการทดลอง 3 ซ้ำๆ ละ 10 ผล บ่มผลกล้วยต่ออีก 24 ชั่วโมง จึงเปิดถุงออกและวัดขนาดแผลที่เกิดขึ้นภายใน 1 สัปดาห์เปรียบเทียบกับชุดควบคุม

## ผล

### การทดสอบเชื้อยีสต์ต่อการเจริญโตของเชื้อรา *colletotrichum musae* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากการเลี้ยงเชื้อยีสต์ทั้ง 10 ชนิดร่วมกับเชื้อรา *C. musae* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 6 วัน พบว่าเชื้อยีสต์ *A. pullulans* TISTR 3389 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *C. musae* ดีที่สุด โดยสามารถยับยั้งได้ถึง 40.6 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือเชื้อยีสต์ *C. utilis* สามารถยับยั้งได้ 32.1 เปอร์เซ็นต์ สำหรับเชื้อยีสต์ *C. guilliermondii* BCC 5389 และ *R. glutinis* TISTR 5159 พบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราน้อยที่สุดเพียง 1.4 และ 6.6 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (Table 1)

Table 1 Inhibition of radial growth (%) of *C. musae* by 10 yeasts which were tested in dual culture on PDA plate after 6 days of incubation.

| Yeasts | Percentage of inhibition of radial growth (PIRG)* |
|---|---|
| *Candida utilis* | 32.1 |
| *Candida tropicalis* | 30.7 |
| *Pichia membranaefaciens* | 27.4 |
| *Candida guilliermondii* BCC 5389 | 1.4 |
| *Cryptococcus humicala* BCC 7701 | 30.7 |
| *Candida sake* TISTR 5143 | 27.4 |
| *Rhodotorula glutinis* TISTR 5159 | 6.6 |
| *Debaryomyces hansenii* TISTR 5155 | 21.7 |
| *Aureobasidium pullulans* TISTR 3389 | 40.6 |
| *Saccharomycopsis fibuligera* TISTR 5033 | 30.7 |

*PIRG = $\frac{R1-R2}{R1} \times 100$ R1 = average of radial growth of pathogen in control plate
R2 = average of radial growth of pathogen in dual culture plate

**การทดสอบเชื้อยีสต์ต่อการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนผลกล้วยหอมทอง**

จากการปลูกเชื้อยีสต์ทั้ง 10 ชนิดบนผลกล้วยที่ผ่านการทำแผลแล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงปลูกเชื้อ *C. musae* และบ่มเชื้อต่ออีก 24 ชั่วโมง สังเกตการเกิดโรคที่ระยะเวลา 6 วัน พบว่า เชื้อยีสต์ *D. hansenii* TISTR 5155 ควบคุมการเกิดโรคได้ดีที่สุด โดยแผลมีขนาดเพียง 7 มม. ซึ่งไม่แตกต่างจากการควบคุมด้วยยีสต์ 2 ชนิด คือ *C. sake* TISTR 5143 และ *C. utilis* ที่ทำให้เกิดขนาดของแผล 8.6 และ 9.5 มม. ตามลำดับ ส่วนยีสต์ที่ให้ผลดีในการควบคุมโรครองลงมาคือ *A. pullulans* TISTR 3389 และ *C. tropicalis* ซึ่งมีขนาดแผล 10.5 และ 11.3 มม. (Table 2) และเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งมีขนาดแผล 15.3 มม. พบว่า เชื้อยีสต์ที่ให้ผลดีที่สุดทั้งสามชนิดสามารถลดการเกิดโรคได้ 54.4 43.7 และ 38.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Table 2 Lesion size on banana fruits at 6 days after inoculation with yeasts prior challenge with *C. musae* for 24 h.

| Yeasts | Lesion size on banana fruits (mm) |
|---|---|
| *Candida utilis* | 9.5 ab |
| *Candida tropicalis* | 11.3 bcd |
| *Pichia membranaefaciens* | 14.2 de |
| *Candida guilliermondii* BCC 5389 | 14.6 e |
| *Cryptococcus humicala* BCC 7701 | 14.2 de |
| *Candida sake* TISTR 5143 | 8.6 ab |
| *Rhodotorula glutinis* TISTR 5159 | 12.8 cde |
| *Debaryomyces hansenii* TISTR 5155 | 7.0 a |
| *Aureobasidium pullulans* TISTR 3389 | 10.5 bc |
| *Saccharomycopsis fibuligera* TISTR 5033 | 15.9 e |
| *Colletotrichum musae* alone | 15.3 e |

Value with the same letter are not significantly different at $P < 0.05$, according to Duncan's multiple range test

## วิจารณ์ผล

จากการทดลองที่พบว่าเชื้อยีสต์ *A. pullulans* TISTR 3389 สามารถควบคุมการเจริญของเชื้อรา *C. musae* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ได้ดีที่สุด รวมถึงสามารถควบคุมการเกิดโรคบนผลกล้วยหอมทองได้ดีเป็นอันดับรองลงมา ทั้งนี้อาจมีสาเหตุเนื่องจากเชื้อยีสต์ดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการเจริญครอบครองพื้นที่และแข่งขันการใช้สารอาหาร PDA ดีกว่าเชื้อยีสต์ชนิดอื่นๆ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Prashanthi and Kulkarani (2005) ที่ทดลองเลี้ยงเชื้อยีสต์ *A. pullulans* บนอาหาร selective และ non selective ทั้ง 9 ชนิด พบว่าอาหารที่ทำให้เชื้อยีสต์เจริญเติบโตดีที่สุดคือ PDA สำหรับเชื้อยีสต์ *D. hansenii* TISTR 5155 ซึ่งถึงแม้มีเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *C. musae* บนอาหาร PDA เพียง 21.7 เปอร์เซ็นต์แต่พบว่ามีประสิทธิภาพในการควบคุมการเกิดโรคบนผลกล้วยได้ดีที่สุดโดยสามารถลดการเกิดโรคได้ถึง 54.4 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้อาจอธิบายได้ว่ากลไกหลักในการควบคุมโรคพืชของเชื้อยีสต์ดังกล่าวน่าจะมาจากกลไกอื่นหรือเกิดจากหลายกลไกร่วมกัน เช่น เชื้อยีสต์อาจมีการสร้างเอนไซม์ ดังที่พบจากรายงานของ Saligkarias *et al*. (2002) ที่รายงานว่ายีสต์ *Candida* spp. สามารถผลิต hydrolytic enzymes ออกมาย่อยผนังเซลล์ของเชื้อรา *Botrytis cinerea* รวมถึงกระตุ้นให้เนื้อเยื่อพืชเกิดการผลิต phytoalexin ได้ด้วย หรือเชื้อยีสต์อาจมีความคงทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม หรือได้รับการกระตุ้นจากสภาพแวดล้อมนั้นเพื่อให้เพิ่มศักยภาพในการควบคุมโรคพืชได้ดีขึ้น ดังเช่นที่พบในรายงานของ Papouskova and Sychrova (2007) ที่กล่าวว่าเชื้อยีสต์ *D. hansenii* มีความคงทนต่อสภาพแวดล้อมที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงๆ ได้ดีมาก และในสภาพนี้เองทำให้เกิดการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ให้ดีกว่าปกติ อย่างไรก็ตาม สมศิริ (2550) กล่าวว่าจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เหล่านี้มักมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคต่ำ จึงมักมีการใช้สารเคมีในระดับความเข้มข้นต่ำร่วมด้วยเสมอ จึงจะทำให้เกิดศักยภาพสูงสุดในการควบคุมโรคพืช และควรทำการศึกษาเกี่ยวกับกลไกด้านอื่นๆ ของเชื้อยีสต์ที่มีผลต่อการควบคุมโรคพืชต่อไป

## สรุป

จากเชื้อยีสต์ทั้งหมดพบว่าเชื้อยีสต์ *A. pullulans* TISTR 3389 ให้ผลยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. musae* ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อได้ดีที่สุด แต่เมื่อทดสอบบนผลกล้วยพบว่าเชื้อยีสต์ที่ให้ผลดีที่สุดในการควบคุมโรคคือ *D. hansenii* TISTR 5155 *C. sake* TISTR 5143 และ *C. utilis*

## เอกสารอ้างอิง


สมศิริ แสงโชติ. 2550. การควบคุมโรคของผลิตผลหลังการเก็บเกี่ยวในปัจจุบันและแนวโน้มในอนาคต. การประชุมวิชาการวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวแห่งชาติ ครั้งที่ 5, วันที่ 28-29 มิถุนายน 2550 ณ โรงแรมมิราเคิล แกรนด์ คอนเวนชัน กรุงเทพฯ.

Arras, G. 1996. Mode of action of an isolate of *Candida famata* in biological control of *Penicillium digitatum* in orange fruits. Postharvest Biology and Technology 8: 191-198.

Blum, L.E.B., C.V.T. Amarante and R.M. Valdebenito-Sanhueza. 2005. Postharvest application of the yeast *Cryptococcus laurentii* reduces apple rots. Acta Hort. 682: 2109-2113.

Castoria, R., V. Morena, L. Caputo, G. Panfili, F. De Curtis and V. De Cicco. 2005. Effect of the biocontrol yeast *Rhodotorula glutinis* strain LS11 on patulin accumulation in stored apples. Phytpathology 95:1271-1278.

Droby, S.V., B. Vinokur, L. Weiss, A. Cohen, E.E. Daus and R. Porat. 2002. Induction of resistance to *Penicillium digitatum* in grapefruit by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila*. Phytopathology 92: 393-399.

Khan, S.H., J. Aked and N. Magan. 2001. Control of anthracnose pathogen of banana (*Colletotrichum musae*) using antioxidants alone and in combination with thiabendazole or imazalil. Plant Pathology 50: 601-608.

Krauss, U. and A. Johanson. 2000. Recent advances in the control of crown rot of banana in the Windward Islands. Crop Protection 19: 151-160.

Papouskova, K. and H. Sychrova. 2007. The co-action of osmotic and high temperature stresses results in a growth improvement of *Debareomyces hansenii* cells. International J. of Food Microbiol. 118:1-7.

Pongsuwan, D. 1993. Quality improvement of fruit and vegetable crops for export. Section of Plant Pathology and Microbiology, Department of Agriculture, Bangkok. 112p.

Prashanthi, S.K. and S. Kulkarani. 2005. *Aureobasidium pullulans,* a potential mycoherbicides for biocontrol of eupatorium (*Chromolaena odorata* L. King and Robinson) weed. Current Science 88:18-21.

Saligkarias, I.D., F.T. Gravanis and A.S. Epton. 2002. Biological control of *Botrytis cinerea* on tomato plants by the use of epiphytic yeasts *Candida guilliermondii* and *C. oleophila*. Biological control 25:151-161.

Zhou, T., C.L. Chu, W.T. Liu and K.E. Schaneider. 2001. Postharvest control of blue mold and gray mold on apples using isolates of *Pseudomonas syringae*. Can. J. plant Pathol. 23: 246-252.