ผลของยีสต์ปฏิปักษ์และสารแอมโมเนียมโมลิบเดตที่มีต่อการเจริญและการงอกของสปอร์เชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วง

Effects of an antagonistic yeast and ammonium molybdate on growth and spore germination of *Colletotrichum gloeosporioides* causing mango anthracnose disease

อนุเทพ ภาสุระ[1]* และ วรรณวิมล จิ๋วแย้ม[1]

Anuthep Pasura[1]* and Wanwimol Jiewyam[1]

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

บทคัดย่อ

โรคแอนแทรคโนสเป็นปัญหาสำคัญที่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อผลผลิตมะม่วงหลังการเก็บเกี่ยว การควบคุมโรคโดยชีววิธีเป็นแนวทางหนึ่งในการลดปัญหาที่เกิดจากการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืช งานวิจัยนี้ ทำการศึกษาประสิทธิภาพของยีสต์ปฏิปักษ์ร่วมกับสารแอมโมเนียมโมลิบเดต (NH_4Mo) ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยและการงอกของสปอร์เชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วง พบว่า การใช้ยีสต์ปฏิปักษ์สายพันธุ์ VCU24 หรือการใช้สาร NH_4Mo ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยมวลต่อปริมาตรเพียงอย่างเดียว มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* ในรูปของน้ำหนักแห้งได้ถึงร้อยละ 57.1 และ 78.6 ตามลำดับ และเมื่อใช้ยีสต์ปฏิปักษ์สายพันธุ์ VCU24 ร่วมกับสาร NH_4Mo พบว่า สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราก่อโรคได้ดีที่สุดถึงร้อยละ 92.9 เมื่อศึกษาผลต่อการงอกของสปอร์เชื้อราก่อโรคดังกล่าว พบว่า การใช้ยีสต์ปฏิปักษ์สายพันธุ์ VCU24 ร่วมกับสาร NH_4Mo ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยมวลต่อปริมาตร สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ราก่อโรคได้สูงกว่าการใช้ยีสต์ปฏิปักษ์สายพันธุ์ VCU24 หรือสาร NH_4Mo ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยมวลต่อปริมาตรเพียงอย่างเดียว

คำสำคัญ : โรคแอนแทรคโนส / แอมโมเนียมโมลิบเดต / ยีสต์ปฏิปักษ์ / *Colletotrichum gloeosporioides*

ABSTRACT

Anthracnose disease is a major problem which affects to damage of postharvest mangoes. The biological control of plant disease is an alternative method to reduce pesticide uses. This research aims to study the effectiveness of an antagonistic yeast combined with NH_4Mo on mycelial growth inhibition and spore germination of *Colletotrichum gloeosporioides* causing anthracnose disease in mango. It was found that an antagonistic yeast isolate VCU24 and NH_4Mo (0.5 % W/V) inhibited mycelial growth of *C. gloeosporioides* for 57.1% and 78.6%, respectively. The treatment of antagonistic yeast isolate VCU24 combined with NH_4Mo (0.5 % W/V) was most effective in inhibition of mycelia growth for 92.9%. For the study on spore germination, it was shown that the combined treatment provided more inhibition of spore germination than those applying the antagonistic yeast isolate VCU24 or NH_4Mo (0.5 % W/V) alone.

Keywords : Anthracnose / Ammonium molybdate / Antagonistic yeast / *Colletotrichum gloeosporioidoes*

***Corresponding author.** E-mail: anuthep@buu.ac.th

1. บทนำ

มะม่วง (*Mangifera indica* L.) เป็นผลไม้เศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทยที่ปลูกเพื่อบริโภคทั้งภายในประเทศและส่งออกไปจำหน่ายยังต่างประเทศ แต่มักมีปัญหาโรคพืชที่ส่งผลให้ผลผลิตลดลงทั้งในด้านปริมาณและด้านคุณภาพ โดยเฉพาะปัญหาจากโรคแอนแทรคโนสจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ซึ่งเป็นเชื้อราสาเหตุที่ทำสามารถทำให้เกิดโรคได้ทุกระยะของผลมะม่วงทั้งในระยะก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว (อภิตา บุญศิริ และจริงแท้ ศิริพานิช, 2550) การควบคุมโรคแอนแทรคโนสหลังการเก็บเกี่ยวของมะม่วงน้ำดอกไม้นิยมใช้สารเคมีกำจัดราพวก Benzimidazole เช่น Benomyl จุ่มผลก่อนการบรรจุลงภาชนะซึ่งสารเคมีดังกล่าวสามารถถูกดูดซึมเข้าในผลมะม่วงได้ จึงไม่ปลอดภัยต่อผู้บริโภคและยังพบว่าเชื้อสาเหตุโรคอาจต้านทานต่อสารเคมีได้ (Chung *et al*., 2010) วิธีการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี จึงเข้ามามีบทบาทอย่างมากในการลดปัญหาจากการใช้สารเคมีในการควบคุมโรคที่จะไม่ก่ออันตรายต่อผู้บริโภค

มีรายงานว่ายีสต์ปฏิปักษ์มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืชหลังการเก็บเกี่ยวของผลไม้ได้ดี เช่น ยีสต์ *Pichia membranifaciens* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Rhizopus* ที่ก่อโรคผลเน่าในลูกพีชได้ แต่การใช้ยีสต์เพียงอย่างเดียวมีประสิทธิภาพในการควบคุมทางชีวภาพเชื้อราอยู่ในวงจำกัด (Cao *et al*., 2010) จึงมีแนวคิดการประยุกต์ใช้วิธีการอื่นร่วมกับการใช้ยีสต์ปฏิปักษ์ในการเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืชหลังการเก็บเกี่ยว เช่น การใช้ยีสต์ปฏิปักษ์ร่วมกับการแช่ผลไม้ในน้ำร้อน (Zong *et al*., 2010) หรือการใช้ยีสต์ปฏิปักษ์ร่วมกับสารเคมีที่มีคุณสมบัติเป็นสารเจือปนในอาหาร (food additives) (Wang *et al*., 2011) มีตัวอย่างที่ประสบความสำเร็จเป็นอย่างดี ได้แก่ การใช้สารแอมโมเนียมโมลิบเดต (NH_4Mo) ร่วมกับยีสต์ *Hanseniaspora uvarum* ในการควบคุมโรคราสีเทาในผลองุ่น (Liu *et al*., 2010) การใช้ยีสต์ *Kluyveromyces marxianus* ร่วมกับสาร sodium bicarbonate ในการควบคุมโรคราเขียวในผลส้ม (Geng *et al*., 2011) และการใช้ยีสต์ปฏิปักษ์ *P. membranifaciens* ร่วมกับ NH_4Mo เพื่อควบคุมการเจริญของเชื้อรา *Penicillium expansum* ที่ก่อโรคผลเน่าในลูกพีช (Cao *et al*., 2010) ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงทำการประเมินประสิทธิภาพของการใช้สาร NH_4Mo ร่วมกับยีสต์ปฏิปักษ์ที่คัดเลือกได้จากประเทศไทยในการควบคุมทางชีวภาพเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่ก่อโรคแอนแทรคโนสในผลมะม่วงหลังการเก็บเกี่ยว เพื่อเป็นทางเลือกหนึ่งในการป้องกันกำจัดโรคดังกล่าว

2. วิธีการ

2.1 การทดสอบประสิทธิภาพยีสต์ปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ด้วยวิธี dual culture

เลี้ยงเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่แยกได้จากรอยแผลโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) ที่อุณหภูมิห้อง (27±2 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 7 วัน ตัดเส้นใยของเชื้อราบริเวณขอบโคโลนีด้วย cork borer นำชิ้นวุ้นเชื้อราที่ตัดแล้ววางตรงกลางจานอาหาร PDA ใหม่ จากนั้นนำยีสต์จำนวน 3 สายพันธุ์ที่แยกได้จากผักและผลไม้ ได้แก่ FCU02 VCU24 และ SCU11 ซึ่งได้ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีเบื้องต้นแล้วว่าเป็นยีสต์ที่เจริญบนผิวพืช (ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.นิสา ไกรรักษ์ ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยบูรพา) ที่เจริญบนอาหาร Yeast Peptone Dextrose Agar เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มาขีดเป็นเส้นตรงสองเส้นโดยใช้ลวดเขี่ยเชื้อ และให้เส้นใยของเชื้อราอยู่กึ่งกลางระหว่างรอยขีดของยีสต์ทั้งสอง ซึ่งรอยขีดของยีสต์ห่างจากขอบจานอาหาร PDA 1.5 เซนติเมตร บ่มจานเพาะเชื้อในที่มืด อุณหภูมิห้อง (27±2 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 5-7 วัน ทำการทดสอบยีสต์แต่ละสายพันธุ์จำนวน 3 ซ้ำ บันทึกผลการทดลอง โดยดูจากลักษณะโคโลนีของเชื้อราก่อโรคและวัดขนาดรัศมีของโคโลนีเชื้อราบนอาหาร ทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อราจากชุดควบคุมโดยคำนวณร้อยละของการยับยั้งการเจริญเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้ขีดเชื้อยีสต์

2.2 ผลของความเข้มข้นสาร NH_4Mo ที่มีต่อการเจริญของเชื้อราก่อโรค *C. gloeosporioides* และยีสต์ปฏิปักษ์

นำชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่เจริญบนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วันวางตรงกลางจานอาหาร PDA ที่มีหรือไม่มีสาร NH_4Mo ความเข้มข้นร้อยละ 0 0.5 1 และ 2 โดยมวลต่อปริมาตร ทำอีกการทดลองหนึ่งโดยเขี่ยเชื้อยีสต์ปฏิปักษ์ที่เจริญบนอาหาร PDA มาแล้วเป็นเวลา 48 ชั่วโมง มา Cross streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่มีสาร NH_4Mo ความเข้มข้นต่างๆ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน บันทึกการเจริญของเชื้อราและยีสต์ปฏิปักษ์ คัดเลือกระดับความเข้มข้นของสาร NH_4Mo ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้และยีสต์ทดสอบยังสามารถเจริญได้ จัดการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design หรือ CRD) แต่ละชุดการทดลองทำ 3 ซ้ำ

2.3 ผลของ NH_4Mo และยีสต์ปฏิปักษ์สายพันธุ์ VCU 24 ต่อการเจริญของราก่อโรค *C. gloeosporioides*

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ปริมาตร 50 มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร แบ่งการทดลองออกเป็น 4 ชุด ดังนี้

ชุดที่ 1 กรรมวิธีควบคุม (ไม่ใส่สาร NH_4Moหรือยีสต์ปฏิปักษ์)

ชุดที่ 2 ใส่ NH_4Mo ปรับให้มีความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยมวลต่อปริมาตร

ชุดที่ 3 ใส่ยีสต์ปฏิปักษ์สายพันธุ์ VCU24 ที่มีความเข้มข้น 10^3 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

ชุดที่ 4 ใส่ NH_4Moที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยมวลต่อปริมาตรและยีสต์ปฏิปักษ์สายพันธุ์ VCU24 ที่มีความเข้มข้น 10^3 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร100 ไมโครลิตร

ใส่สปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *C. gloeosporiodes* ที่มีความหนาแน่น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงไปในขวดรูปชมพู่ในแต่ละกรรมวิธี นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (27±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน กรองเส้นใยผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 ล้างเซลล์หลายๆครั้ง จนน้ำล้างที่ผ่านกระดาษกรองใส นำไปอบแห้งเส้นใยราที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จนน้ำหนักคงที่ ชั่งน้ำหนักแผ่นกระดาษกรองแล้วคำนวณหาน้ำหนักแห้งเส้นใยรา บันทึกน้ำหนักแห้งเส้นใยรา พร้อมทั้งคำนวณร้อยละการยับยั้งจากสูตร ร้อยละการยับยั้งการเจริญ = ((x-y)/x)*100 โดยกำหนดให้ x แทน น้ำหนักแห้งของเส้นใยราในชุดควบคุม และ y แทน น้ำหนักแห้งเส้นใยราเมื่อใส่สาร NH_4Mo ยีสต์ปฏิปักษ์สายพันธุ์ VCU24 หรือทั้งสองอย่างรวมกัน จัดการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ

2.4 ผลของ NH_4Mo และยีสต์ปฏิปักษ์ต่อการงอกของสปอร์ของ *C. gloeosporioides* (ดัดแปลงจาก Cao *et al*., 2010)

หยดสปอร์แขวนลอยของ *C. gloeosporioides* ความหนาแน่น 10^3 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร หรือหยดส่วนผสมระหว่างสปอร์แขวนลอยของ *C. gloeosporioides* ความหนาแน่น 10^3 สปอร์ต่อมิลลิลิตรและเซลล์แขวนลอยของยีสต์ปฏิปักษ์สายพันธุ์ VCU24 ความหนาแน่น 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงบนอาหาร PDA ที่มีหรือไม่มีสาร NH_4Mo ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยมวลต่อปริมาตร ทำการเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ จัดการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ ตัดชิ้นวุ้นวางบนแผ่นสไลด์ และปิดด้วย Cover slip จากนั้นนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์เมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้อง (27±2 องศาเซลเซียส) ภายหลังการบ่มเป็นเวลา 0 2 4 และ 6 ชั่วโมง นับจำนวนสปอร์ที่งอกและสปอร์ที่ไม่งอกจากพื้นที่ในวงกล้อง ให้มีจำนวนสปอร์อย่างน้อย 5-10 สปอร์ต่อวงกล้อง (จำนวน 10 วงกล้อง) คำนวณหาร้อยละการงอกของสปอร์ โดยสปอร์ที่มี germ tube ยาวกว่าขนาดความกว้างของสปอร์ถือว่าสปอร์นั้นงอก

2.5 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ข้อมูลที่ได้จากการทดลองแสดงค่าเป็นร้อยละ และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างตัวแปรโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (one-way ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองด้วยวิธี Least Significant Difference (LSD) ที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับ 0.05 ($P \leq 0.05$) โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติสำเร็จรูป SPSS

3. ผลและอภิปราย

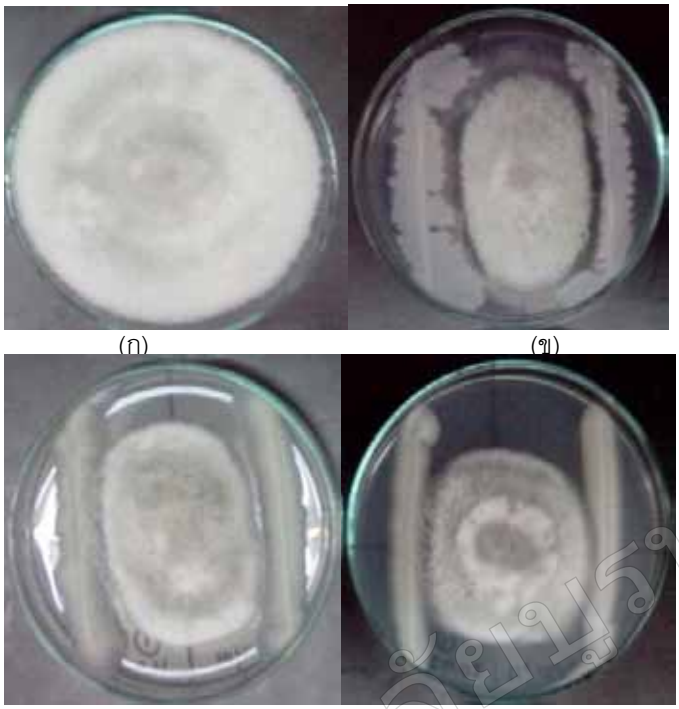
3.1 ประสิทธิภาพยีสต์ปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ด้วยวิธี dual culture

จากการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเส้นใยราก่อโรคโดยใช้ยีสต์ปฏิปักษ์ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ FCU02 VCU24 และ SCU11 พบว่า ยีสต์ปฏิปักษ์สายพันธุ์ VCU24 สามารถยับยั้งเส้นใยราก่อโรคด้วยวิธี dual culture บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน ได้ดีที่สุดเท่ากับร้อยละ 58.9 รองลงมา คือ ยีสต์สายพันธุ์ SCU11และ FCU02 ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยราได้ร้อยละ 52.2 และ 48.9 ตามลำดับ (ตารางที่ 1) จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่ายีสต์ปฏิปักษ์สายพันธุ์ VCU24 สามารถยับยั้งการเจริญของราก่อโรคได้ดีกว่ายีสต์ปฏิปักษ์สายพันธุ์อื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยยีสต์ปฏิปักษ์สายพันธุ์ VCU24 มีการเพิ่มขนาดของโคโลนีซึ่งจะเห็นโคโลนีในลักษณะแผ่ออกไปครอบครองผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อได้อย่างรวดเร็วกว่ายีสต์สายพันธุ์อื่น การที่ยีสต์ปฏิปักษ์สายพันธุ์ VCU24 ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราก่อโรคจึงน่าจะเป็นกลไกการแก่งแย่งสารอาหารและพื้นที่อาศัยบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ จึงทำให้เส้นใยของราก่อโรคเจริญได้น้อยลง สอดคล้องกับข้อมูลสนับสนุนจากรายงานการวิจัยในกรณีของยีสต์ *Pichia membranifacien* ที่ใช้ในการควบคุมเชื้อรา *Penicillium expansum* (Cao *et al*., 2010) ดังนั้น การทดลองขั้นตอนต่อไปจึงเลือกยีสต์ปฏิปักษ์สายพันธุ์ VCU24 ไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

ตารางที่ 1 ประสิทธิภาพของยีสต์ปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ด้วยวิธี dual culture

ยีสต์สายพันธุ์	การยับยั้งการเจริญ (%)[1]
ชุดควบคุม	0.0 ± 0.0^c
VCU24	58.9 ± 3.8^a
SCU11	52.2 ± 2.6^b
FCU02	48.9 ± 3.9^b

[1]ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่ต่างกันในคอลัมม์แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) จากการวิเคราะห์ด้วย LSD



(ก) (ข) (ค) (ง)

ภาพที่ 1 การยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา *C. gloeosporioides* โดยเลี้ยงร่วมกับยีสต์ปฏิปักษ์ 3 สายพันธุ์ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มในอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน

ก. *C. gloeosporioides* (ชุดควบคุม) ข. ยีสต์ปฏิปักษ์สายพันธุ์ VCU24 กับเชื้อก่อโรค

ค. ยีสต์ปฏิปักษ์สายพันธุ์ SCU11 กับเชื้อก่อโรค ง. ยีสต์ปฏิปักษ์สายพันธุ์ FCU02 กับเชื้อก่อโรค

3.2 ผลของความเข้มข้นสาร NH_4Mo ที่มีต่อการเจริญของเชื้อราก่อโรค *C. gloeosporioides* และยีสต์ปฏิปักษ์

จากการทดสอบเบื้องต้นถึงความเข้มข้นสาร NH_4Mo ที่มีต่อเชื้อราก่อโรค *C. gloeosporioides* และยีสต์ปฏิปักษ์สายพันธุ์ VCU24 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA พบว่า สาร NH_4Mo แต่ละความเข้มข้นมีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยที่สาร NH_4Mo ความเข้มข้นตั้งแต่ร้อยละ 0.5 โดยมวลต่อปริมาตรขึ้นไปสามารถยับยั้งการเจริญของราก่อโรคได้เมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุม ในขณะที่ยีสต์ปฏิปักษ์สายพันธุ์ VCU24 ยังคงสามารถเจริญได้เฉพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่มีสาร NH_4Mo ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยมวลต่อปริมาตร (ตารางที่ 2) ดังนั้นจึงเลือกสาร NH_4Mo ที่ความเข้มข้นนี้ไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 2 ผลของความเข้มข้นสาร NH_4Mo ที่มีต่อการเจริญของยีสต์ปฏิปักษ์และเชื้อราก่อโรค *C. gloeosporioides* บนอาหาร PDA

ความเข้มข้นสาร NH_4Mo (ร้อยละโดยมวลต่อปริมาตร)	ลักษณะการเจริญของยีสต์ปฏิปักษ์สายพันธุ์ VCU24	การยับยั้งการเจริญเส้นใย (%)[1]
0 (ชุดควบคุม)	เจริญได้ปกติ	0.0^{d}
0.5	เจริญได้แต่โคโลนีมีขนาดเล็ก	5.2^{c}
1.0	ไม่มีการเจริญ	12.6^{b}
2.0	ไม่มีการเจริญ	87.4^{a}

[1]ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่ต่างกันในคอลัมม์แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) จากการวิเคราะห์ด้วย LSD

3.3 ผลของ NH_4Mo และยีสต์ปฏิปักษ์ต่อการเจริญของราก่อโรค *C. gloeosporioides*

เมื่อทำการศึกษาผลของ NH_4Mo ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยมวลต่อปริมาตรและยีสต์ปฏิปักษ์สายพันธุ์ VCU24 ต่อปริมาณเส้นใยของราก่อโรค *C. gloeosporioides* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB บนเครื่องเขย่า ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่

อุณหภูมิห้อง (27±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำมากรองผ่านกระดาษกรอง และอบแห้งเส้นใยราที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน พบว่าการใช้สาร NH_4Mo หรือยีสต์ปฏิปักษ์สายพันธุ์ VCU24 เพียงอย่างเดียว หรือการใช้ทั้งสองอย่างร่วมกันนั้นสามารถยับยั้งการเจริญของราก่อโรคได้ โดยการใช้สาร NH_4Mo ร่วมกับยีสต์สายพันธุ์ VCU24 ให้ผลการยับยั้งดีที่สุด โดยสามารถยับยั้งได้ถึงร้อยละ 92.9 รองลงมาเป็นการใช้สาร NH_4Mo หรือยีสต์ปฏิปักษ์สายพันธุ์ VCU24 เพียงอย่างเดียว พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคได้ร้อยละ 78.6 และ 57.1 ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ผลของ NH_4Mo และยีสต์ปฏิปักษ์สายพันธุ์ VCU24 ที่มีต่อการเจริญของเชื้อราก่อโรค *C. gloeosporioides* ในอาหารเหลว PDB

ชุดการทดสอบ	การยับยั้งการเจริญ (%)[1]
ชุดควบคุม	0.0 ± 0.0^{c}
สาร NH_4Mo (0.5% M/V)	78.6 ± 12.4^{ab}
ยีสต์ VCU 24	57.1 ± 7.8^{b}
ยีสต์ VCU 24 + NH_4Mo (0.5% M/V)	92.9 ± 10.3^{a}

[1]ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่ต่างกันในคอลัมม์แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) จากการวิเคราะห์ด้วย LSD

ผลการทดลองจากงานวิจัยนี้สอดคล้องกับรายงานจากการศึกษาก่อนหน้านี้ที่ได้รายงานไว้ว่าสาร NH_4Mo สามารถควบคุมราก่อโรคพืชได้หลายชนิด เช่น *Penicillium expansum* (Cao *et al*., 2010) และ *Botrytis cinerea* (Liu *et al*., 2010) ซึ่งน่าจะเกิดจากการที่ยีสต์ปฏิปักษ์สามารถแข่งขันแย่งสารอาหารของเชื้อราก่อโรค ซึ่งถือว่าเป็นกลไกหลักที่ยีสต์ปฏิปักษ์ใช้ในการยับยั้งราก่อโรค ส่วนกลไกของสาร NH_4Mo ในการควบคุมจุลินทรย์นั้น มีการรายงานว่า สารดังกล่าวมีกลไกในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคโดยไปยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ acid phosphatase (PTPase) รบกวนกระบวนการฟอสโฟริเรชัน (phosphorylation) และดีฟอสโฟริเรชัน (dephosphorylation) ซึ่งเป็นกระบวนการสำคัญในการควบคุมเซลล์ (Cao *et al*., 2010) ส่งผลให้เชื้อราก่อโรคไม่สามารถเจริญได้ และเมื่อนำสาร NH_4Mo ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยมวลต่อปริมาตรมาใช้ร่วมกับยีสต์ปฏิปักษ์ พบว่า สาร NH_4Mo ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยมวลต่อปริมาตรมีผลต่อการเจริญของยีสต์เช่นเดียวกัน มีรายงานว่าสารดังกล่าวสามารถทำให้ยีสต์ปฏิปักษ์ลดจำนวนลงได้เมื่อทดลองในห้องปฏิบัติการ เช่น *Hanseniaspora uvarum Rhodotorula glutinis* และ *Cryptococcus laurentii* (Liu *et al*., 2010) สอดคล้องกับการศึกษาเบื้องต้นที่ได้ทดสอบการเจริญของยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่มีสาร NH_4Mo ความเข้มข้นต่างๆ แล้วพบว่าสาร NH_4Mo ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ร้อยละ 1 โดยมวลต่อปริมาตรขึ้นไป ทำให้ยีสต์ปฏิปักษ์ไม่สามารถเจริญได้ (ตารางที่ 2) แต่อย่างไรก็ตามที่ความเข้มข้นของสาร NH_4Mo ที่ใช้ในการทดลองนี้มีความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยมวลต่อปริมาตรยังสามารถทำให้ยีสต์ปฏิปักษ์เจริญอยู่ได้และสามารถเสริมประสิทธิภาพของยีสต์ปฏิปักษ์ให้สามารถควบคุมเชื้อราก่อโรคได้ดีขึ้น

3.4 ผลของ NH_4Mo และยีสต์ปฏิปักษ์สายพันธุ์ VCU24 ต่อการงอกของสปอร์ของราก่อโรค *C. gloeosporioides*

จากการศึกษาผลของสาร NH_4Mo ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยมวลต่อปริมาตร และยีสต์ปฏิปักษ์สายพันธุ์ VCU24 ต่อการงอกของสปอร์ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* โดยการนับจำนวนของสปอร์ทั้งหมดและจำนวนสปอร์ที่งอก แล้วนำมาคำนวณหาร้อยละการงอกของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่เวลา 0 2 4 และ 6 ชั่วโมง พบว่า เมื่อเพิ่มเวลาการบ่มสปอร์เชื้อราบนอาหาร PDA ร้อยละการงอกของสปอร์จะเพิ่มขึ้นด้วย โดยเมื่อบ่มถึงชั่วโมงที่ 6 พบว่าสปอร์มีการงอกทั้งหมด จึงใช้เวลาในการบ่ม 6 ชั่วโมงสำหรับการทดสอบผลของสาร NH_4Mo และยีสต์ปฏิปักษ์สายพันธุ์ VCU24 ต่อการงอกของสปอร์เชื้อรา *C. gloeosporioides* จากผลการทดลองพบว่า การใช้สาร NH_4Mo ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยมวลต่อปริมาตรหรือยีสต์ปฏิปักษ์สายพันธุ์ VCU24 เพียงอย่างเดียว มีการงอกของสปอร์เชื้อราก่อโรคได้ร้อยละ 26.2 และ 30.8 ตามลำดับ แต่ในกรรมวิธีที่ใช้ NH_4Mo ร่วมกับยีสต์ปฏิปักษ์สายพันธุ์ VCU24 พบว่า สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ราก่อโรคได้อย่างสมบูรณ์และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับชุดการทดสอบอื่น (ตารางที่ 4) จากผลการศึกษาการงอกของสปอร์ของ *C. gloeosporioides* พบว่า การใช้ NH_4Mo ร่วมกับยีสต์ปฏิปักษ์สายพันธุ์ VCU24 สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ราก่อโรคได้อย่างสมบูรณ์ สอดคล้องกับรายงานของ Cao *et al*. (2010) ที่ได้รายงานว่าสาร NH_4Mo สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์รา *Penicillium expansum* สาเหตุการเน่าเสียหลังการเก็บเกี่ยวของผลลูกพีชได้ โดยเมื่อเพิ่มความเข้มข้นสาร NH_4Mo สูงขึ้น พบว่าการงอกของสปอร์ราก่อโรคลดลงตามไปด้วย และเมื่อใช้สารดังกล่าวร่วมกับยีสต์ปฏิปักษ์ *Pichia membranefaciens* พบว่าสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ราได้มากขึ้นเมื่อเทียบกับการใช้สารเคมีหรือยีสต์เพียงอย่างเดียว

ตารางที่ 4 ผลของยีสต์ปฏิปักษ์และสาร NH_4Mo ต่อการงอกของสปอร์เชื้อรา *C. gloeosporioides* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

ชุดการทดสอบ	การงอกของสปอร์ (%)[1]
ชุดควบคุม	100.0±0.0[c]
สาร NH_4Mo (0.5% M/V)	26.2±2.4[b]
ยีสต์ VCU24	30.8±5.6[b]
สาร NH_4Mo (0.5% M/V) +ยีสต์ VCU24	0.0±0.0[a]

[1]ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่ต่างกันในคอลัมม์แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) จากการวิเคราะห์ด้วย LSD

4. บทสรุป

การใช้ยีสต์ปฏิปักษ์สายพันธุ์ VCU24 หรือสาร NH_4Mo ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยมวลต่อปริมาตร เพียงอย่างเดียวสามารถยับยั้งการเจริญในรูปของมวลชีวภาพและการงอกของสปอร์ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุของโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงได้ แต่ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราในรูปของมวลชีวภาพและการงอกของสปอร์เพิ่มมากขึ้นเมื่อใช้ยีสต์ปฏิปักษ์สายพันธุ์ VCU 24 ร่วมกับสาร NH_4Mo โดยสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ถึงร้อยละ 92.9 และสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ราก่อโรคได้อย่างสมบูรณ์ จากผลการทดลองที่ได้นี้ จะนำไปใช้ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสในมะม่วงหลังการเก็บเกี่ยวต่อไป

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัยประเภทเงินรายได้ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ประจำปีงบประมาณ 2555

6. เอกสารอ้างอิง

อภิตา บุญศิริ และจริงแท้ ศิริพานิช. (2550). *ส่งออกมะม่วงไปต่างประเทศทำอย่างไร.* กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Cao, S. F., Yuan, Y. J., Hu, Z. C. and Zheng, Y. H. (2010). Combination of *Pichia membranifacien* and ammonium molybdate for controlling blue mould caused by *Penicillium expansum* in peach fruit. *International Journal of Food Microbiology*, *141,* 173-17.

Chung, W. H., Chung, W. C., Peng, M. T., Yang, H. R. and Huang, J. W. (2010). Specific detection of benzimidazole resistance in *Colletotrichum gloeosporioides* from fruit crops by PCR-RFLP. *New Biotechnology*, *27*, 17-24.

Geng, P., Chen, S., Hu, M., Rizwan-ul-Haq, M., Lai, K., Qu, F. and Zhang, Y. (2011). Combination of *Kluyveromyces marxianus* and sodium bicarbonate for controlling green mold of citrus fruit. *International Journal of Food Microbiology*, *151,* 190-194.

Liu, H. M., Guo, J. H., Luo, L., Liu, P., Wang, B.Q., Cheng, Y.J., et al. (2010). Improvement of *Hanseniaspora uvarum* biocontrol activity against gray mold by the addition of ammonium molybdate and the possible mechanisms involved. *Crop Protection*, *29*, 277-282.

Wang, Y., Tang, F., Xia, J., Ting, Y., Wang, J., Azhati, R. and Zheng, X. D. (2011). A combination of marine yeast and food additive enhances preventive effects on postharvest decay of jujubes (*Zizyphus jujuba*). *Food Chemistry*, *125*, 835-840.

Zong, Y., Liu, J., Li, B., Qin, G. and Tian, S. (2010). Effects of yeast antagonists in combination with hot water treatment on postharvest diseases of tomato fruit. *Biological Control*, *54,* 316-321.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University