รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ ประจำปี 2557

โครงการวิจัยที่ 3060 – 3972

เรื่อง การคัดเลือกยีสต์ปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคผักบางชนิด

Selection of Potential Antagonistic Yeasts for Inhibit the Growth of Some Fungi Causing Vegetable Diseases

หัวหน้าโครงการวิจัย

นางสาวรัชดาวรรณ ชีวังกูร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณจากมูลนิธิโครงการหลวง

ประจำปี พ.ศ. 2557

บทคัดย่อ

จากการแยกยีสต์จากผลไม้ 26 ชนิดที่ไม่แสดงอาการของโรค สามารถแยกได้ทั้งหมด 203 ไอโซเลท และสามารถจัดกลุ่มยีสต์ตาลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นออกเป็น 26 กลุ่ม และศึกษาความสามารถของยีสต์ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชบางชนิดได้แก่ เชื้อรา *Alternaria brassicola*, *Colletotricum capsici*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Phytophthora* sp., *Pythium* sp. และ *Sclerotium* sp. ซึ่งผลจากการคัดกรองเบื้องต้นพบว่ามีเชื้อยีสต์จำนวน 14 ไอโซเลท คือไอโซเลท 12, 15, 16, 20, 62, 77A, 77B, 132, 149, 154, 157, 158, 191 และ 192 ที่มีประสิทธิภาพในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคพืชดังกล่าว และผลจากการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราพบว่ามียีสต์ 13 ไอโซเลตได้แก่ ไอโซเลท 20, 15, 62, 191, 154, 192, 16 และ 158 ที่มีประสิทธิภาพการควบคุมเชื้อรา *A. brassicola* ได้สูงกว่า 80% จากการทดสอบยีสต์ปฏิปักษ์กับเชื้อรา *Colletotrichum capsici* พบว่ายีสต์ 2ไอโซเลท ได้แก่ 12 และ15 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญได้ ในส่วนของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* พบว่ายีสต์ 5 ไอโซเลทมีประสิทธิภาพในการเป็นปฏิปักษ์อยู่ในระดับปานกลางถึงดี คือมีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งตั้งแต่ 50–75% ได้แก่ไอโซเลท 132,192 ,158 ,154 และ 191 และไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งดีที่สุดคือ 132, 192, 158, 191 และ 154 การทดสอบยีสต์ปฏิปักษ์กับเชื้อรา *Phytophthora* sp. พบว่ายีสต์ไอโซเลท 12, 157 และ 15 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งดีที่สุด และ ไอโซเลท 12 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญได้สูงกว่า 80% ผลการทดสอบกับเชื้อรา *Pythium* sp. พว่ายีสต์ไอโซเลท 77A, 132, 149 และ 154 สามารถยับยั้งได้ถึง 100% และไอโซเลท 15 และ 157 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญได้สูงกว่า 80% และเมื่อทดสอบกับเชื้อรา *Sclerotium* sp. พบว่าไอโซเลท 149, 15 และ12 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญได้สูงกว่า 80%

ศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์ปฏิปักษ์ที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มปริมาณยีสต์ในสภาพห้องปฏิบัติการโดยเลี้ยงเชื้อยีสต์ปฏิปักษ์ไอโซเลท 12, 77, 132, 149 และ 154 ในอาหารเหลวจำนวน 5 สูตร คือสูตร 1 คือ YPD สูตร 2 คือกากน้ำตาลผสมข้าว สูตร 3 คือกากน้ำตาลผสมข้าวโพด สูตร 4 คือกากน้ำตาลผสมเศษผักละผลไม้ และสูตร 5 คือกากน้ำตาลผสมรำข้าว พบว่าอาหารสูตรที่ 1

(YPD) สามารถทำให้เชื้อยีสต์ไอโซเลท 12, 77, 132 และ 149 เพิ่มจำนวนเซลล์ได้มากกว่าอาหารสูตรอื่น โดยเมีจำนวนเซลล์สูงมากที่สุดในวันที่ 4 โดยอาหารสูตรที่ 2-4 ให้ผลที่ไม่แตกต่างกัน

มูลนิธิโครงการหลวง ROYAL PROJECT FOUNDATION

บทที่ 1

บทนำ

โรคพืชเป็นปัญหาสำคัญสำหรับการเพาะปลูกพืช และจัดเป็นศัตรูพืชชนิดหนึ่งที่สามารถทำความเสียหายให้แก่ เกษตรกรผู้ปลูก ซึ่งอาจจะเกิดขึ้นตั้งแต่เริ่มเพาะปลูกจนกระทั่งหลังการเก็บเกี่ยว เชื้อราถือว่าเป็นกลุ่มเชื้อสาเหตุโรคที่มีความสำคัญมากกลุ่มหนึ่ง สามารถเป็นสาเหตุของโรคได้ทั้งส่วนใต้ดิน และเหนือดินของพืช ซึ่งการป้องกันกำจัดหรือควบคุมโรคพืชนั้นสามารถทำได้หลายวิธี ทั้งการเขตกรรม และใช้สารกำจัดโรคพืช ซึ่งวิธีที่เกษตรไทยนิยมใช้กันมากคือการใช้สารเคมี เพราะง่าย มีประสิทธิภาพดี ออกฤทธิ์เร็ว และเห็นผลชัดเจน อย่างไรก็ตามอาจจะเกิดปัญหาตามมา คือ การดื้อต่อสารเคมีของเชื้อโรค การปนเปื้อน และตกค้างของสารเคมีในผลิตผลการเกษตร และในสิ่งแวดล้อม และยังมีผลต่อสุขภาพของเกษตรกรผู้ใช้และผู้บริโภคด้วย

ปัจจุบันผู้บริโภคให้ความสนใจ และต้องการผลผลิตทางการเกษตรที่ปราศจากสารเคมีจึงเพิ่มมากขึ้นอย่างต่อเนื่อง ทำให้เกิดความจำเป็นต้องหาวิธีการลดการใช้สารเคมีลง โดยนำวิธีการอื่นๆ มาใช้อย่างเหมาะสม และมีความปลอดภัยมากกว่าการใช้สารเคมีเพียงอย่างเดียว ปัจจุบันการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี (Biological control) กำลังได้รับความสนใจ และตื่นตัวกันอย่างกว้างขวางในบรรดานักวิจัยทั้งใน และต่างประเทศ และมีผลงานวิจัยออกมาอย่างต่อเนื่อง รวมไปถึงการพัฒนาชีวภัณฑ์ (Bioproduct) ของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ซึ่งเป็นผลจากการวิจัยออกมาจำหน่ายด้วย

การควบคุมโดยชีววิธีคือการนำสิ่งมีชีวิตมาควบคุมสิ่งมีชีวิตด้วยกัน เช่นการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์หรือจุลินทรีย์ต่อต้าน (Antagonistic microorganism) มาควบคุมโรคพืชที่เกิดจากเชื้อต่างๆ ทั้งกลุ่มของแบคทีเรีย และเชื้อรา ซึ่งรวมไปถึงเชื้อยีสต์ ยีสต์หลายชนิดที่พบในธรรมชาติได้ถูกนำมาศึกษาการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อโรคพืช และพบว่าเป็นทางเลือกใหม่ที่ดีทดแทนสารเคมีกำจัดเชื้อราได้ (Druvefors, 2004; Fravel 2005) ซึ่งยีสต์ส่วนใหญ่ไม่มีรายงานว่ามีการสร้างสปอร์ที่ทำให้เกิดการแพ้คน (allergenic spore) (Droby and Chalutz, 1994) หรือสารที่เป็นอันตรายคนอื่นๆ (Arras *et al.*, 1999) นอกจากนี้ยังพบว่ายีสต์สามารถเจริญได้บนพื้นผิวที่แห้งได้เป็นเวลานาน และทนทานต่อสารกำจัดเชื้อราและสารปฏิชีวนะ (El-Tarabily and Sivasithamparam, 2006) ยีสต์สามารถ

เจริญเติบโตได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อราคาถูก ไม่มีความซับซ้อนมาก แต่สามารถผลิตสารได้ในปริมาณมาก (Druvefors, 2004) ซึ่งสารที่ยีสต์สร้างยังรวมไปถึงวิตามิน แร่ธาตุ และกรดอะมิโนต่างๆ ที่เป็นประโยชน์ที่พืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ ปัจจุบันมีผลิตภัณฑ์ยีสต์ออกมาจำหน่ายเพื่อใช้ในการป้องกันกำจัดโรคพืชทั้งก่อน และหลังเก็บเกี่ยว จึงเห็นได้ว่ายีสต์เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ในการควบคุมโรคพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ และสามารถพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ที่สะดวกในการใช้ต่อไป

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1. เพื่อคัดเลือกยีสต์ปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเชื้อราสาเหตุโรคบางชนิดในสภาพห้องปฏิบัติการ
2. เพื่อศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์ปฏิปักษ์ที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มปริมาณยีสต์ในสภาพห้องปฏิบัติการ

สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการสาขาวิชาโรคพืช ภาควิชากีฏวิทยา และโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

มูลนิธิโครงการหลวง ROYAL PROJECT FOUNDATION

บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

ผักเป็นพืชอาหารที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของโลก เพราะพืชผักมีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตของร่างกายให้ดำรงอยู่ได้ตามปกติ บางประเทศมีการปลูกผักในพื้นที่กว้าง และเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ ผักนับเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทยอีกประเภทหนึ่ง เนื่องด้วยสภาพภูมิประเทศที่ทำให้ประเทศไทยเป็นแหล่งเพาะปลูกผักผลไม้หลากหลายชนิด และเป็นที่นิยมบริโภคทั้งในประเทศ และต่างประเทศ สามารถสร้างรายได้ให้เกษตรกรผู้เพาะปลูกและผู้ส่งออกของไทยได้เป็นอย่างดี ถึงแม้ว่าจะมีความต้องการบริโภคผักสูง แต่มักเกิดปัญหาผลผลิตไม่เพียงพอต่อความต้องการ เนื่องจากเกษตรกรผู้ปลูกมักประสบปัญหาผลผลิตตกต่ำ

เชื้อราเป็นสาเหตุโรคพืชที่สำคัญชนิดหนึ่ง สามารถทำให้เกิดอาการผิดปกติบนพืชอาศัยได้หลายแบบ อาการบางอย่างเกิดขึ้นอย่างจำเพาะ แต่อาการบางอย่างอาจเป็นอาการเริ่มต้นที่ต่อมาเกิดการขยายจนเป็นอาการอย่างอื่นได้ โดยทั่วๆ ไปเชื้อราทำให้เกิดอาการตายของเนื้อเยื่อเฉพาะที่ และเป็นสาเหตุทำให้พืชอาศัยแคระแกรน (stunting) สำหรับอาการที่เชื้อราทำให้เกิดกับพืชอาศัยโดยทั่วๆ ไปได้แก่ อาการใบจุด (leaf spots), ใบไหม้ (blight), แคงเกอร์ (canker), การตายจากยอด (dieback), รากเน่า (root rot), ต้นล้ม (damping-off), โคนเน่า (basal stem rot), เน่าเปียก (soft rots) และเน่าแห้ง (dry rots), แอนแทรคโนส (anthracnose), สแคป (scab) และต้นโทรม (decline) นอกจากนี้เชื้อรายังทำให้เกิดอาการเหี่ยว (wilt), สนิมเหล็ก (rust), เขม่าดำ (smut) ซึ่งอาจส่งผลให้พืชทั้งต้นแคระแกรน หรือชะงักการเจริญเติบโตได้ (Agrios, 2005)

เชื้อราสำคัญหลายชนิดก่อให้เกิดโรคในผัก และสร้างความเสียหายกับผลผลิตอย่างมาก เช่น เชื้อรา *Alternaria* spp. ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคใบจุดในพืชหลายชนิด โดยพืชจะแสดงอาการโรคใบจุดที่พบส่วยใหญ่จะเกิดบริเวณใบ โดยเริ่มเป็นกับใบแก่หรือใบที่อยู่ล่างๆ ใกล้ระดับดินก่อน โดยแผลจะเกิดเป็นจุดสีเข้มเล็กๆ หากเกิดในผักระยะต้นกล้าเช่น กะหล่ำปลี จะทำให้กล้าต้นเล็กแคระแกรน ถ้าเกิดในระยะต้นโต อาการที่ใบจะเกิดเป็นจุดเล็กๆ เมื่อสภาพอากาศชื้น แผลมักจะขยายออกไปเป็นวงกลมสีน้ำตาล หรือดำ ซ้อนกันหลายๆ ชั้น เนื้อเยื่อรอบๆ แผลเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ใบ

แห้งกรอบ (อรพรรณ และจุมพล, 2531) เชื้อราสร้าง conidia ต่อกันเป็นโซ่ บางครั้งโซ่แตกแขนง มีรูปร่างคล้ายทรงกระบอก หรือกระบอง สีน้ำตาลอ่อนถึงน้ำตาลเข้ม มีผนังกั้นตามขวาง (transverse septa) และผนังตามยาว (longitudinal septa) เมื่อเชื้อราอายุได้ 5 วัน โคโลนีจะเป็นสีเขียวมะกอกอ่อน เมื่ออายุได้ 7 วัน โคโลนีจะกลายเป็นสีดำอมเขียวมะกอก สร้าง conidiophore สีน้ำตาลอ่อน มักเกิดเดี่ยวๆ หรืออาจเกิดเป็นกลุ่ม 2–12 เส้น หรือมากกว่า มีลักษณะตรงหรือโค้งงอเล็กน้อย รูปร่างเป็นทรงกระบอก ที่ปลายมีลักษณะบวมเล็กน้อย มีผนังกั้นตามขวาง (พัฒนา และคณะ, 2526; Agrios, 2005)

เชื้อรา *Cercospora* spp. เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคใบจุด (Leaf spot) โรคใบไหม้ (Leaf bright) เป็นโรคที่ทำให้เกิดความเสียหายกับพืชผักหลายชนิด โดยเฉพาะเกิดความเสียหายกับใบ ทำให้คุณภาพและปริมาณผลลิตลดลง ซึ่งเชื้อราชนิดนี้สร้าง conidia ที่มีลักษณะเรียวยาว (acicular) หลายเซลล์ สีใส (hyaline) ผนังกั้นตามขวาง (transverse septa) สร้างอยู่บนก้านชูสปอร์ (conidiophore) มีลักษณะสีน้ำตาล เมื่อนำไปเลี้ยงบนอาหารลี้ยงเชื้อ โคโลนีจะเป็นสีขาวอมเทา (Agrios, 2005)

เชื้อรา *Colletotruchum* spp. ทำให้เกิดโรค แอนแทรคโนส (antracnose) เป็นโรคที่ทำความเสียหายกับพืชหลายชนิด สามารถเข้าทำลายได้เกือบทุกส่วนของพืชไม่ว่าจะเป็นต้นกล้า ยอดอ่อน ใบอ่อน ช่อดอก ดอก ผลอ่อนจนถึงผลแก่ และผลหลังการเก็บเกี่ยว ทำให้เกิดอาการเป็นจุดแผลตกค้างอยู่บนใบ กิ่ง ผล และหากการเข้าทำลายของโรครุนแรงก็จะเกิดอาการใบแห้ง ใบบิดเบี้ยว และร่วงหล่น ช่อดอกแห้งไม่ติดผล ผลเน่าร่วงตลอดจนผลเน่าหลังเก็บเกี่ยว เช่น *C. gloeosporioides* ทำให้เกิดโรคในมะม่วง *C. dematium* ทำให้เกิดในโรคสตรอเบอรี่ และ *C. capsici* ทำให้เกิดโรคในผลพริก เป็นต้น ซึ่งเชื้อราชนิดนี้สร้าง conidia แบบเซลล์เดียว สีใส ทรงรี (ellipsoid) หรือรูปโค้งเสี้ยวพระจันทร์ (fusiform) ในโครงสร้างเรียกว่า acervulus ซึ่งในบางสปีชีส์อาจสร้าง setae สีน้ำตาลดำมีผนังกั้น (Agrios, 2005)

เชื้อรา *Fusarium* spp. เป็นสาเหตุโรคเหี่ยว (wilt) หรือเน่า (rot) ในพืชหลายชนิด เชื้อรา *Fusarium* สร้าง conidia ได้ 2 ชนิดคือ macroconidia เป็น conidia ขนาดใหญ่มีหลายเซลล์เกิดบน sporodochium และ microconidia เป็น conidia ขนาดเล็กเซลล์เดียวเกิดบนก้าน conidiophore เดี่ยวๆ

หรือบนกิ่งก้านที่แตกออกไปจากเส้นใย นอกจากนี้บางครั้งยังพบว่ารามีการสร้าง chlamydospore เชื้อราชนิดนี้เข้าทำลายพืชในส่วนของท่อน้ำท่ออาหารทั้งส่วนใต้ดินและเหนือดินทำให้ท่อน้ำท่ออาหารเกิดการอุดตัน และต้นพืชจะเหี่ยวแห้งตายในที่สุด ตัวอย่างโรคเหี่ยวของพืชที่เกิดจากเชื้อรา *Fusarium* ได้แก่ *F. solani* ทำให้เกิดโรคเหี่ยวในมันฝรั่ง *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* ทำให้เกิดโรคเหี่ยวกับมะเขือเทศ *F. oxysporum* f. sp. *cubense* ทำให้เกิดโรคตายพลายหรือ Panama wilt ในต้นกล้วย เป็นต้น(Agrios, 2005)

เชื้อรา *Phytophthora* spp. ทำให้เกิดโรคกับพืชหลายชนิดในระยะกล้า เช่น ผัก ไม้ดอก ไม้ประดับ พืชล้มลุกต่างๆ รวมทั้งไม้ยืนต้น เช่น ไม้ผล และป่าไม้ เป็นต้น ส่วนมากทำให้เกิดอาการเน่าโรคเน่าระดับดินของต้นกล้า โรคเน่าของลำต้นและหัว เชื้อรานี้บางชนิดจะทำให้เกิดอาการใบไหม้หรือทำลายกิ่งอ่อน และผล (Agrios, 2005) บางชนิดมีพืชอาศัยที่จำกัดสามารถเข้าทำลายพืชได้เพียงหนึ่งหรือสองชนิดเท่านั้น แต่บางชนิดมีพืชอาศัยที่กว้างขวาง ตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากเชื้อราชนิดนี้ เช่น *P. palmivora* ทำให้เกิดโรครากเน่า และโคนเน่าของทุเรียน *P. parasitica* var *nicotiana* ทำให้เกิดโรคแข้งดำของยาสูบ *P. parasitica* สาเหตุโรคโคนเน่า รากเน่าของส้ม โรครากเน่า และยอกเน่าของสับปะรด โรคเน่าดำของกล้วยไม้ โรคผลเน่าของมะเขือยาว โรคเน่าระดับดิน และผลเน่าของมะเขือเทศ เป็นต้น (นิตยา, 2534)

เชื้อรา *Pythium* spp. ส่วนใหญ่อาศัยอยู่ในดินที่ชื้นแฉะ ในลักษณะที่เป็น saprophyte หรืออาจเป็น parasite ชั่วคราว โดยเข้าทำลายรากฝอยของพืช เส้นใยมีสีขาว ไม่มีผนังกั้นตามขวาง เส้นใยสร้าง sporangium จากนั้นจะงอกเป็น germ tube หรืองอกเป็นเส้นใยสั้นๆ และให้กำเนิด zoospore รูปร่างคล้ายถั่วมี flagellum ติดอยู่ทางด้านข้างสองเส้น ใช้ในการว่ายน้ำเพื่อแพร่กระจายไปยังพืชอาศัย เชื้อราชนิดนี้สามารถเข้าทำลายพืชผักได้หลายชนิดทั้งในแปลงปลูก และหลังเก็บเกี่ยว โดยเฉพาะในระยะกล้า ตั้งแต่ทำให้เมล็ดพันธุ์เน่า (seed rot) เน่าคอดิน (damping off) รากเน่า (root rot) และ เน่าเละ (soft rot) (Agrios, 2005)

เชื้อรา *Sclerotium* spp. เป็นเชื้อราที่เป็น parasite ทำให้เกิดโรครากเน่าโคนเน่า และความเสียหายกับพืชได้มายหลายชนิด เช่น กล้วยไม้ กระเทียม ข้าว แตงกวา ถั่วเหลือง ผักสลัด ผักกะหล่ำปลี พริก มะเขือเทศ แอปเปิล อ้อย และสตรอเบอรี่ (Alteropoulos and Mims, 1979;

Giatgong, 1980) นอกจากนี้ยังพบว่าเป็นสาเหตุของโรคเน่าในพืชหัว และผลของพืชบางชนิด เช่น มันฝรั่ง หอมหัวใหญ่ แตง และมะเขือเทศ เชื้อรามีเส้นใยสีขาว มีผนังกั้นและมี clamp connection ไม่สร้าง conidia แต่สร้างเม็ด sclerotium ที่เกิดจากการอัดแน่นของเส้นใย (Agrios, 2005) เชื้อรามี perfect state อยู่ใน class Basidiomycestes คือ *Pellicularia rolfsii* (Webster, 1980)

การควบคุมโรคพืชที่เกิดจากเชื้อรามีด้วยกันหลายวิธี เช่น การใช้พันธุ์ต้านทานต่อโรค, การใช้เมล็ดที่ปลอดจากเชื้อสาเหตุ การกำจัดเชื้อโรคที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์โดยใช้สารเคมีประเภทดูดซึม การกำจัดพืชอาศัยรอง (alternate host) การใช้วัสดุ และอุปกรณ์ที่สะอาดปลอดจากเชื้อโรค การปลูกพืชหมุนเวียน การฉีดพ่นสารเคมีกำจัดเชื้อรา (สารประเภทสัมผัส หรือประเภทดูดซึม) ลงบนต้นพืช การคลุกเมล็ดพืชด้วยสารเคมี การแช่เมล็ดในน้ำร้อน (hot water treatments) การอบดินด้วยสารเคมี (fumigants) หรือการใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นปฏิปักษ์กับเชื้อราสาเหตุโรค เหล่านี้ล้วนแต่เป็นวิธีการที่สามารถควบคุมโรคพืชที่เกิดจากเชื้อราได้ทั้งสิ้น ซึ่งการใช้อาจใช้วิธีการใดวิธีการหนึ่ง หรือหลายๆ วิธีร่วมกัน ทั้งนี้ต้องคำนึงถึงประสิทธิภาพสูงสุด มีผลเสียต่อสภาพแวดล้อม และเสียค่าใช้จ่ายน้อยที่สุด

การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี

การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี หมายถึง การลดปริมาณของเชื้อโรค (inoculum) หรือลดกิจกรรมการเกิดโรคของเชื้อหรือปรสิตที่อยู่ในระยะที่มีปฏิกิริยา (active) หรือระยะพักตัว โดยการใช้สิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งหรือมากกว่าเข้ามาป้องกันกำจัด เพื่อให้บรรลุผลสำเร็จโดยวิธีธรรมชาติหรือโดยการจัดการสิ่งแวดล้อม สิ่งอาศัย จุลินทรีย์ปฏิปักษ์หรือจุลินทรีย์ต่อต้าน (antagonist) หรือการนำจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ชนิดหนึ่งหรือมากกว่ามาใช้ในการควบคุม ป้องกันกำจัด (Baker and Cook, 1974)

จุลินทรีย์ปฏิปักษ์

เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีความสามารถในการป้องกันกำจัดเชื้อราสาเหตุโรคพืชนั้น สามารถพบได้ทั่วไป เช่น จากดินบริเวณ rhizosphere จากดินบริเวณ root tissue (Blakeman, 1985) รวมทั้งจากในเนื้อเยื่อพืช (endophyte) (Hallmann *et al.*, 1997; Igarashi *et al.*, 2002) และบนส่วนต่างๆ ของพืช ไม่ว่าจะเป็น เชื้อจุลินทรีย์ที่อยู่บนกิ่ง ดอก ผล และใบของพืช (McLaughlin *et al.*,

1992) ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์ที่อยู่บนผิวพืชนี้จะมีอยู่มากมายหลายชนิด และสามารถนำมาใช้ในเป็นเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการป้องกันกำจัดเชื้อสาเหตุโรพืชได้ (จิระเดช, 2534) เชื้อจุลินทรีย์ที่พบมากบริเวณผิวใบพืชประกอบไปด้วย แบคทีเรีย เช่น *Bacillus subtilis*, *P seudomonas fluorescens* และ *Flavobacterium* sp. เป็นต้น (Klopper *et al.*, 1980) และเชื้อรา เช่น *Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp., *Curvularia* sp., *Drechslera* sp., *Fusarium* sp., และ *Penicillium* sp. เป็นต้น (McLaughlin *et al.*, 1992) และยีสต์ซึ่งเป็นเชื้อราชนิดหนึ่งที่สามารถพบได้ทั่วไป และมีปริมาณมากที่สุดบนผิวพืช เช่น *Aureobasidium* sp., *Rhodotorula* sp., *Saccharomyces* sp. และ *Candida* sp. เป็นต้น (Blakeman, 1985)

กลไกการทำงานของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ใช้ในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืช มีความสำคัญต่อการพัฒนา และการคัดเลือกเชื้อราปฏิปักษ์อย่างมีประสิทธิภาพ กลไกการทำงาน ของเชื้อราปฏิปักษ์มีด้วยกัน 4 วิธี (เกษม, 2532)

1. การสร้างสารปฏิชีวนะของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (antibiosis) หมายถึงการยับยั้งการเจริญของจุลินทรียอีกชนิดหนึ่ง ที่เกิดขึ้นจากสารที่สร้างโดยสิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่ง สารดังกล่าวจะมีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโต หรืออาจจะทำให้ตายได้

2. การแก่งแย่งแข่งขันอาหารระหว่างเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ และเชื้อสาเหตุโรค (competition) การที่สิ่งมีชีวิตสองชนิดหรือมากกว่า เจริญอยู่ด้วยกัน และมีความต้องการอาหาร และที่อยู่อาศัยซึ่งสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดต้องการ และเมื่ออาหารที่มีอยู่ไม่เพียงพอจึงทำให้เกิดการแข่งขันโดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้ธาตุอาหาร และปัจจัยอื่นๆ สำหรับการเจริญเติบโต

3. จุลินทรีย์ปฏิปักษ์หรือเอนไซม์ของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มีผลโดยตรงต่อเชื้อสาเหตุโรค (parasitism) การที่เชื้อราปฏิปักษ์สร้างเส้นใยแทงทะลุเข้าไปในเส้นใยของเชื้อราสาเหตุ แล้วดูดของเหลวจากราทำให้เส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืชเหี่ยวแฟบลงหรือการที่เชื้อราปฏิปักษ์สร้างเส้นใยพันรัดเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืชก่อนการเข้าทำลาย

4. การชักนำให้เกิดความต้านทาน เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์บางชนิดสามารถสร้างสารบางอย่างกระตุ้นให้พืชสร้างความต้านทานขึ้นมาป้องกันตัวเอง เช่นการสร้าง phytoalexin เป็นต้น

เชื้อยีสต์ (Yeast) เป็นจุลินทรีย์ชนิดหนึ่ง จัดอยู่ในพวกของเชื้อรา มีขนาดเล็กไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า มนุษย์มีการใช้ประโยชน์จากเชื้อยีสต์มาเป็นเวลานาน โดยมีรายงานครั้งแรกในการผลิตเบียร์ชนิดหนึ่งเรียกว่า Boozah เมื่อประมาณ 6,000 ปีก่อนคริสต์ศักราช ปัจจุบันมีการนำเชื้อยีสต์มาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมหลายประเภท เช่นการผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ การผลิตเอธิลแอลกอฮอล์เพื่อใช้เป็นสารเคมี และเชื้อเพลิง การผลิตเซลล์ยีสต์เพื่อใช้เป็นยีสต์ขนมปัง และโปรตีนเซลล์เดียวสำหรับมนุษย์และสัตว์ อย่างไรก็ตามเชื้อยีสต์บางสายพันธุ์อาจเป็นสาเหตุของโรคในมนุษย์ได้ เช่น *Cyptococcus meoformans* เป็นสาเหตุของโรคเยื่อสมองอักเสบ (สันทัด, 2544)

เชื้อยีสต์มีการดำรงชีวิตแบบเซลล์เดี่ยว (unicellular form) มีวิธีการสืบพันธุ์ทั้งแบบอาศัยเพศ และไม่อาศัยเพศ โดยวิธีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศได้แก่ การแตกหน่อ (budding) และการแบ่งเซลล์โดยการขยายขนาดของเซลล์แล้วสร้างผนังกั้นแบ่งเซลล์เป็นสองส่วน (fission) ยีสต์บางชนิดอาจมีการสร้างคอนิเดีย (conidia) ขนาดของเซลล์ยีสต์ แตกต่างกันในแต่ละชนิด มีรูปทรงหลายแบบ คือ กลม (round) รี (oval) สามเหลี่ยม (triangular) ยาวปลายด้านหนึ่งแหลม (ogival, boat) รูปร่างแบบมะนาวฝรั่ง (apiculated) คนโท (flask) หรือเป็นสายสั้นๆ (filamentous) (Ingold, 1975) ยีสต์บางชนิดมีการสร้างเส้นใยเทียม (pseudomycelium) และเส้นใยแท้ (true mycelium) ซึ่งข้อแตกต่างระหว่าง pseudomycelium และ true mycelium คือ เซลล์ปลายสุดของ pseudomycelium เป็นเซลล์ที่สั้นกว่าเซลล์อื่น ในขณะที่เซลล์ปลายสุดของ true mycelium นั้น จะยาวกว่าเซลล์อื่นๆ (วิจัย, 2551) ส่วนการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของยีสต์แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่สร้างแอสโคสปอร์ (ascosporogenous yeasts) และพวกที่สร้างเบสิดิโอสปอร์ (basidiosporogenous yeasts) ซึ่งสปอร์ทั้งสองชนิดนี้เกิดขึ้นจากการรวมตัวของนิวเคลียส และตามด้วยการแบ่งนิวเคลียสแบบไมโอซีส (meiosis) (Soll, 2002) และโคโลนีส่วนใหญ่ของยีสต์มีขนาด รูปร่าง โครงสร้าง และขอบแตกต่างกัน เช่นเดียวกับแบคทีเรีย มีลักษณะเป็นครีมข้น ทึบแสง ผิวเรียบหรือขรุขระ บางครั้งอาจจะเจริญเป็นมันวาว (นงลักษณ์ และ ปรีชา, 2541; บงกชวรรณ, 2550)

ลักษณะการเจริญเติบโตของยีสต์

การเจริญของเซลล์ยีสต์เกิดโดยการเพิ่มขนาดจนถึงขนาดวิกฤต (critical size) เซลล์จะมีการแบ่งเพื่อเพิ่มจำนวน ในระหว่างนั้นนิวเคลียสมีการแบ่งตัวแบบ mitosis เกิดการสังเคราะห์

cytoplasm และ organelle ต่าง ๆ สำหรับการแบ่งเซลล์ของยีสต์ซึ่งเป็นการเพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศนั้นพบว่า ยีสต์ส่วนใหญ่เกิดโดยการแตกหน่อ (budding) ทั้งนี้การแตกหน่ออาจเกิดจากเซลล์หรือเส้นใย นอกจากการแตกหน่อแล้วยังพบการเพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศ โดยวิธีฟิสชั่น (fission) การเพิ่มจำนวนแบบนี้เกิดโดยการที่เซลล์ขยายออกตามยาว และ organelle ต่าง ๆ รวมทั้ง nucleus และ cytoplasm เพิ่มเป็นสองเท่า จากนั้นมีการสร้างผนังกั้นขวาง (septum หรือ cross wall) แบ่งเซลล์ออกเป็น 2 ส่วนเท่า ๆ กัน และท้ายที่สุดแบ่งเป็น 2 เซลล์ นอกจากนั้นยังพบการเพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศของยีสต์โดยวิธีที่อยู่ระหว่างการแตกหน่อและ fission ที่เรียกว่า bud-fission ในกรณีนี้ผนังที่กั้นขวางระหว่างหน่อกับเซลล์แม่มีความกว้างกว่าที่พบในการแตกหน่อโดยทั่ว ๆ ไป ยีสต์ที่พบการเพิ่มจำนวนแบบนี้ เช่น *Saccharomycodes, Nadsonia* และ *Pityrosporum* การสร้าง conidia บนก้าน เป็นอีกวิธีหนึ่งของการเพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศโดยการสร้าง conidia ที่ปลายก้าน บนเซลล์ที่อาจมีมากกว่า 1 ก้าน เมื่อ conidia แก่เต็มที่จะหลุดออกตรงบริเวณผนังกั้นที่ส่วนกลางของก้านหรือที่ใกล้กับ conidia การเพิ่มจำนวนแบบนี้พบในยีสต์เพียงบางชนิด เช่น *Fillomyces* และ *Sterigmatomyces* ส่วนการสร้าง ballistospore หรือ ballistoconidia ซึ่งเป็น spore แบบไม่อาศัยเพศที่เมื่อแก่เต็มที่แล้ว spore จะถูกดีดออกจากก้านโดยกลไกที่เรียกว่า กลไกแบบหยด (Drop mechanism) ยีสต์ที่สร้าง spore ชนิดนี้ เช่น *Bullera* และ *Sporobolomyces* นอกจากนั้นยังอาจพบการเพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศโดยการสร้างเส้นใยเทียมและเส้นใยแท้

ยีสต์เป็นราที่มีการดำรงชีวิตเป็นเซลล์เดี่ยว ส่วนใหญ่เพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อ (budding) การแตกหน่อเป็นการแบ่งเซลล์ที่มีลักษณะค่อนข้างจำเพาะต่างจากการแบ่งเซลล์ของ eukaryote ชนิดอื่น ๆ การแตกหน่อของยีสต์แบ่งตามตำแหน่งที่เกิดหน่อได้ 3 แบบ (Yarrow, 1998) คือ

1. การแตกหน่อขั้วเดียว (monopolar budding) เป็นการแตกหน่อที่เกิดที่ทั้งขั้วหรือปลายเพียงด้านเดียว โดยการแตกหน่อจะเกิดขึ้นซ้ำ ๆ กันที่ตำแหน่งเดิม ยีสต์ที่มีแตกหน่อแบบนี้ เช่น *Pityrosporum*

2. การแตกหน่อสองขั้ว (bipolar budding) การแตกหน่อแบบนี้เกิดขึ้นที่ขั้วหรือปลายทั้งสองด้านของเซลล์ ปกติจะเกิดทีละขั้วหรืออาจจะเกิดพร้อมกันทั้งสองขั้วก็ได้ ยีสต์ที่มีการแตกหน่อแบบนี้ เช่น *Hanseniaspora, Nadsonia* และ *Saccharomycodes*

3. การแตกหน่อหลายขั้ว (multipolar หรือ multilateral budding) ยีสต์ส่วนใหญ่มีการแตกหน่อแบบนี้ โดยการแตกหน่อเกิดได้โดยรอบเซลล์ทุก ๆ ด้าน ยีสต์ที่มีการแตกหน่อแบบนี้ เช่น *Saccharomyces, Zygosacharomyces, Pichia* และ *Hansenula*

ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของยีสต์

แหล่งของสารอาหารสำหรับยีสต์

สำหรับการเจริญและพัฒนาของยีสต์นั้นยีสต์ต้องการสารอาหาร ซึ่งทำหน้าที่เป็นแหล่งพลังงาน แหล่งคาร์บอน รวมทั้งธาตุอาหารหลัก (major element) อื่นๆ ได้แก่ ไฮโดรเจน ออกซิเจน ไนโตรเจน ซัลเฟอร์ และ ฟอสฟอรัส นอกจากนั้นยังต้องการอาหารบางชนิดในปริมาณค่อนข้างมากธาตุอาหารเหล่านั้นจัดเป็น macro element ประกอบด้วย แมกนีเซียม และโพแทสเซียม ในขณะที่ธาตุอาหารบางชนิดยีสต์ต้องการในปริมาณที่ต่ำ (micro element หรือ trace element) ได้แก่ แคลเซียม เหล็ก ทองแดง แมงกานีส สังกะสี นิเกิล โคบอลต์ และ โมลิบดีนัม ยิ่งไปกว่านั้น ยีสต์ ยังต้องการสารประกอบบางชนิดเพื่อทำหน้าที่เป็น growth factor เช่น วิตามิน พิวรีน (purine) ไพริมิดีน (pyrimidine) และนิวคลีโอไทด์ (Isaac and Jenning, 1995; Walker, 1998)

1. คาร์บอน

ภายในเซลล์ยีสต์มีคาร์บอนประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ยีสต์เป็นคีโมออร์กาโนโทร (chemoorganotroph) ซึ่งต้องใช้สารประกอบอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอน และพลังงาน ส่วนใหญ่สารอินทรีย์ที่ใช้คือน้ำตาล กลูโคสเป็นน้ำตาลที่ยีสต์ทุกชนิดสามารถ metabolism ได้ ยีสต์บางชนิดสามารถ metabolism กลูโคสโดยการหมักได้ด้วย โดยปกติถ้ายีสต์ชนิดใดไม่สามารถหมักกลูโคสจะไม่สามารถหมักฟรุกโทส และแมนโนสด้วย แต่กลูโคสอาจไม่ได้เป็นน้ำตาลที่เกิด metabolism ได้อย่างมีประสิทธิภาพที่สุดในยีสต์ทุกชนิด โดยปกติในธรรมชาติกลูโคสจะไม่ได้มีอยู่อย่างอิสระแต่อยู่ในรูปพอลิเมอร์จำพวกเซลลูโลส แป้ง และ polysaccharides อื่น อีกทั้งปกติกลูโคสไม่ได้ใช้เป็น substrate (ogata et al., 5969; ogata et al., 1975; Berry and Brown, 1987; Halasz and Laztity, 1991; van der Klei and Veehuis, 1997; Walker, 1998)

2. ไฮโดรเจน

ไฮโดรเจนไอออน (H ion) หรือโปรตอน (proton) สำคัญมากในสรีรวิทยาของยีสต์โดย pH ทั้งภายนอกและภายในเซลล์มีอิทธิพลมากต่อการเจริญและ metabolism ของยีสต์ มีรายงานว่า pH ที่เหมาะสม (optimal PH) สำหรับการเจริญและการหมักกลูโคสคือ pH ที่ให้ไฮโดรเจนไอออนเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ (pH 6) และ 10 ไมโครโมลาร์ (pH 5) ยีสต์ปกติเจริญดีมากเมื่อ อาหารเลี้ยงเชื้อมี pH เริ่มต้นอยู่ในช่วง 4–6 แต่ยีสต์บางชนิดสามารถเจริญในช่วง pH กว้างกว่า คือ pH 2–8 และยีสต์ส่วนใหญ่เจริญไม่ดีใน pH ที่เป็นด่าง ในขณะที่บางชนิดสามารถปรับตัวให้ เจริญได้ในสภาพที่เป็นด่างเล็กน้อย เช่น ยีสต์ที่พบในน้ำทะเลสามารถปรับตัวให้เจริญในน้ำทะเลที่ เป็นด่างเล็กน้อย การเจริญของยีสต์อย่างรวดเร็วทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีสภาพเป็นกรด ซึ่งเป็นผลรวม จากการนำเข้าของ

ไอออนต่างชนิดกัน การปลดปล่อยโปรตอนระหว่างการขนส่งสารอาหาร การปลดปล่อยกรดอินทรีย์และการเกิดคาร์บอนไดออกไซด์ การผลิตเอทานอลมีผลจากการเปลี่ยน pH ของอาหารมากเช่นกัน (Isaac and Jenning, 1995; Walker, 1998)

3. ออกซิเจน

ยีสต์หลายชนิดเจริญเฉพาะในที่มีออกซิเจน ยีสต์เหล่านี้เรียกว่า obligate aerobic yeast เช่น *Candida* ยีสต์ไม่สามารถเจริญในที่ขาดออกซิเจนอย่างสมบูรณ์ โดยไม่มียีสต์ชนิดใดที่เจริญได้เฉพาะในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (obligate anaerobic yeast) ยีสต์บางชนิดเจริญได้ทั้งสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจนที่เรียกว่า facultative anaerobic yeast ซึ่งยีสต์ประเภทนี้มี ลักษณะสำคัญ 3 อย่าง คือ สามารถเจริญได้ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ชอบเจริญในที่มีออกซิเจนมากกว่าเพราะได้รับพลังงานในรูป ATP มากกว่า และในสภาวะที่มีออกซิเจนจะมีอัตราการใช้กลูโคส (glucose consumption) ต่ำกว่าในที่ไม่มีออกซิเจน ออกซิเจนมีหน้าที่หลักเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายในห่วงโซ่อิเล็กตรอน (electron transpod chain ETC) นอกจากนั้นยังทำหน้าที่เป็น growth factor โดยยีสต์ต้องการออกซิเจนสำหรับการเกิดไฮดรอกซีเลชัน (hydroxylation) เพื่อรักษาการเจริญ เช่น ใช้ในการสังเคราะห์สเตรอล และกรดไขมันไม่อิ่มตัว ยีสต์บางชนิดต้องการโมเลกุลออกซิเจนสำหรับเอนไซม์ออกซิเดส (Halasz and Laztity, 1991; Walker, 1998)

4. ไนโตรเจน

ยีสต์มีไนโตรเจนภายในเซลล์ประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบของอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงยีสต์ที่มีปริมาณมากรองลงมาจากคาร์บอน สารหลายชนิดสามารถใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ โดยแหล่งไนโตรเจนที่มีโมเลกุลขนาดเล็กและใช้ได้ง่าย เช่น แอมโมเนียมไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียมไนเตรต แอมโมเนียมคลอไรด์ และแอมโมเนียมซัลเฟต มักใช้ในอุตสาหกรรมการหมักโดยยีสต์ โดยเฉพาะแอมโมเนียมซัลเฟตมักใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงยีสต์เพราะนอกจากให้ไนโตรเจนแล้วยังให้ซัลเฟอร์ด้วย ยีสต์บางชนิดใช้ไนเตรต เช่น Citeromyces และบางสายพันธุ์ของ Pichia และ Candida ในขณะที่บางชนิดไม่ใช้ไนเตรต เช่น Debaryomyces, Kluyveromyces, Saccharomyces, และบางสายพันธุ์ของ Pichia และ Candida ยีสต์ที่ใช้ไนเตรตได้อาจใช้ไนไตรต์ที่ความเข้มข้นต่ำกว่าความเข้มข้นที่เป็นพิษกับยีสต์ได้ (Copper, 1982; Berry and Brown, 1987; Walker, 1998)

5. ซัลเฟอร์

ยีสต์มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบในเซลล์ 0.3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง โดย 60 เปอร์เซ็นต์ของซัลเฟอร์ ในเซลล์อยู่ที่กรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบในโปรตีน อีก 5 เปอร์เซ็นต์เป็นอนินทรีย์ซัลเฟตอิสระ ส่วนที่เหลืออยู่ในรูปของซัลเฟตที่เกาะกันหรือกรดอะมิโน

อิสระนอกจากนั้นยังพบอยู่ในวิตามินบางชนิด เช่น ไบโอดิน และสารที่มีซัลเฟอร์ อื่น ๆ ยีสต์ต้องการซัลเฟอร์ เพื่อใช้ในการสังเคราะห์กรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบในอันดับแรก (Berry and Brown, 1987; walker, 1998)

6. ฟอสฟอรัส

บทบาทหลักของฟอสฟอรัสคือ เป็นองค์ประกอบของน้ำตาลฟอสเฟต (sugar phoshate) กรดนิวคลีอิก และนิวคลีโอไซดดฟอสเฟต หรือ นิวคลีโอไทดทรฟอสเฟต และยังพบในอนินทรีย์ฟอสเฟตในรูปของพอลิเมอร์สายตรงคือ พอลิฟอสเฟตมีความสำคัญในการควบคุม metabolism ของเซลล์ให้ฟอสเฟตสะสม และให้พลังงาน ฟอสฟอรัสทำให้มีประจุลบใน cytoplasm ของยีสต์จากการที่มีอนินทรีย์ฟอสเฟต และกลุ่มฟอสเฟตในสารอินทรีย์ ฟอสเฟตในเซลล์ยีสต์มีอยู่ประมาณ 3–5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้งซึ่งส่วนใหญ่อยู่ในรูปของออร์โทฟอสเฟต ฟอสฟอรัสถูกแอสซิมิเลตในรูปของไดไฮโดรเจนฟอสเฟตไอออนหรือออร์โทฟอสเฟตไอออน (odhophosphate ion H po) เท่านั้น (Berry and Brown, 1987; walker, 1998)

7. เกลือแร่

ยีสต์ต้องการเกลือแร่ (mineral elements) เหมือนกับจุลินทรีย์อื่น เกลือแร่ที่ยีสต์ต้องการประกอบด้วยโพแทสเซียม แมกนีเซียม และธาตุที่ต้องการในปริมาณที่ต่ำหลายชนิด สำหรับโพแทสเซียมและแมกนีเซียมเป็นธาตุอาหาร macro element ที่ยีสต์ต้องการที่ความเข้มข้นเป็นมิลลิโมลาร์เพื่อทำให้เกิดสภาวะที่มีประจุบวกภายในเซลล์ยีสต์

ปกติยีสต์มีโพแทสเซียมประมาณ 1-2.2 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยปริมาณโพแทสเซียมในเซลล์ผันแปรตามสภาวะของเจริญ ยีสต์ทุกชนิดต้องการโพแทสเซียมสำหรับการเจริญโดยโพแทสเซียมทำหน้าที่เป็น cofactor สำหรับเอนไซม์หลายชนิดที่เกี่ยวกับ ออกซิเดทีฟฟอสโฟรีเลชัน (oxidative phosphorylation) การสังเคราะห์โปรตีน และ metabolism ของคาร์โบไฮเดรต เช่น ไพรูเวตไดเนส (pyruvate kinase) อัลโดเลส (aldolase) อัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส (aldehyde dehydrogenase) และเอทีพีเอส (ATPase) ที่เยื่อหุ้มเซลล์ นอกจากนั้นยังร่วมในการนำสารอาหารอื่นเข้าเซลล์

สำหรับแมกนีเซียมเป็นสารที่จำเป็นสำหรับการเจริญของยีสต์เช่นกัน และมีอยู่ในเซลล์ประมาณ 0.3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ทำหน้าที่เกี่ยวกับโครงสร้างและเมแทบอลิซึม เช่น การทำงานของเอนไซม์สำหรับการเคลื่อนย้ายฟอสเฟต (transphosphovlation) ต้องอาศัยแมกนีเซียมไอออน

เกลือแร่อื่น ๆ ที่ยีสต์ต้องการปริมาณต่ำมากในระดับไมโครโมลาร์หรือนาโนโมลาร์ ประกอบด้วย แมงกานีส แคลเซียม เหล็ก สังกะสี ทองแดง นิเกิล โคบอลท์ และโมลิบดีนัม ในขณะ

ที่เกลือแร่อื่น คือ เงิน แบเรียม แคดเมียม ปรอท ลิเทียม และตะกั่ว เป็นสารพิษเพราะถ้าความเข้มข้นสูงกว่า 100 ไมโครโมลาร์จะมีผลเสียต่อการเจริญ (Berry and Brown, 1987; walker,1998)

8. Growth factor

Growth factor เป็นสารอินทรีย์ซึ่งยีสต์ต้องการที่ความเข้มข้นต่ำมาก มีบทบาทในการเร่งหรือเป็นส่วนในโครงสร้าง สารที่เป็น growth factor สำหรับยีสต์ คือ วิตามิน พิวรีน ไพริมิดีน นิวคลีโอไทด์ นิวคลีโอไซด์ (nucleoside) กรดอะมิโน กรดไขมัน และสารอื่น ๆ เช่น พอลิเอมีน (polyamine) โคลีน และมีโซ-อินอซิทอล การที่ยีสต์ต้องการ growth factor หมายความว่ายีสต์นั้นไม่สามารถสังเคราะห์ได้เอง ในบางครั้งความต้องการอาจไม่ใช่ความต้องการที่แท้จริงแต่เมื่อเติม growth factor ลงไปยีสต์จะมีอัตราการเจริญเพิ่มขึ้น สำหรับ growth factor แบบนี้เรียกว่า relative growth factor (walker, 1998)

อิทธิพลของสภาวะแวดล้อมต่อการผลิตชีวมวล

1. อุณหภูมิ

ปกติจุลินทรีย์จะเจริญเร็วขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจนถึงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญการเลี้ยงยีสต์ส่วนใหญ่มักบ่มที่อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส โดยการเจริญจะลดลงมากที่ 20 องศาเซลเซียส และไม่เจริญที่ 60-70 องศาเซลเซียส (Halasz and Lasztity, 1991)

2. pH

pH มีผลต่อกิจกรรมทางชีววิทยาของเซลล์น้อยกว่าอุณหภูมิเป็นเพราะว่า เซลล์สามารถควบคุมความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออนภายในเซลล์ได้อย่างดี เมื่อมีการเปลี่ยนแปลง pH ภายนอกเซลล์ pH ของอาหารภายนอกอาจมีผลต่อโครงสร้างและสภาพให้ซึมผ่านได้ของเซลล์ (cellpermeability) pH มีบทบาทช่วนลดการปะปนของจุลินทรีย์อื่นในระหว่างการหมัก โดยปกติอาหารที่ใช้สำหรับการเจริญของยีสต์มี pH อยู่ในช่วง 4-5 (Halasz and Lasztity, 1991)

3. ออกซิเจนละลาย

ออกซิเจนทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายในลูกโซ่ขนส่งอิเล็กตรอน และทำหน้าที่เป็น growth factor ของยีสต์ โดยร่วมในการสังเคราะห์กรดโอลีอิก (oleic acid) เออร์กอสเตรอล และกรดนิโคตินิกซึ่งส่งเสริมการเจริญของยีสต์ภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (Halasz and Lasztity, 1991)

4. คาร์บอนไดออกไซด์

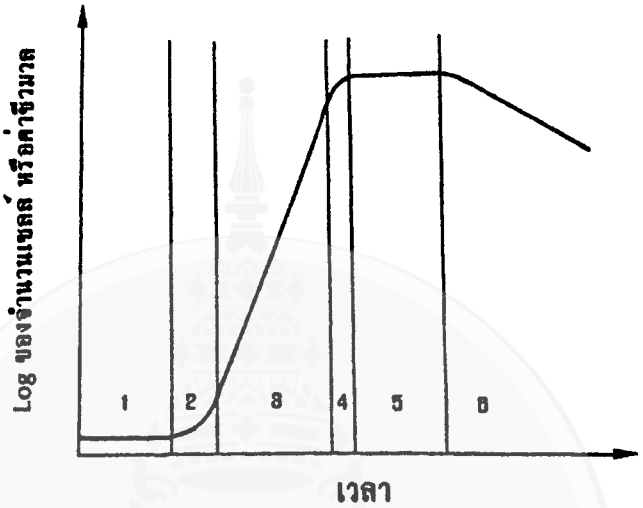
S. cerevisiae ต้องการคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้นต่ำสำหรับกระบวนการบางอย่างในเซลล์ เช่น การสร้างสารประกอบสี่คาร์บอน มีผู้รายงานว่าการใช้คาร์บอนไดออกไซด์เพียง 2.5 เปอร์เซ็นต์ของอากาศทั้งหมดสามารถเพิ่มความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้

อากาศ 100 เปอร์เซ็นต์ แต่ความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเจริญของยีสต์คือ 5 เปอร์เซ็นต์ของอากาศทั้งหมด (Halasz and Lasztity, 1991)

การเพิ่มจำนวนของยีสต์ในอาหารเหลว

การเพิ่มจำนวนเชื้อในอาหารเหลว (enrichment liquid culture) มักทำใน flask บ่มแบบเขย่า (shaking flask) โดยนำตัวอย่างมาเพาะลงในอาหารดังกล่าวและบ่มการเจริญของจุลินทรีย์ที่ต้องการทำให้อาหารและปัจจัยคัดเลือกเปลี่ยนแปลงไปทำให้จุลินทรีย์อื่นยังคงเจริญได้แต่ปัจจัยคัดเลือกอาจสร้างขึ้นใหม่โดยการนำเชื้อที่เพิ่มจำนวน (enrichment culture) ที่ได้ไปเพาะลงในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ ซึ่งอาจทำซ้ำหลายครั้งก่อนที่จะแยกจุลินทรีย์ที่มีจำนวนมากออกโดยการนำไปเลี้ยงบนอาหารแข็งชนิดที่เหมาะสม สิ่งสำคัญของวิธีนี้คือ เวลาของการถ่ายเชื้อควรสัมพันธ์กับเวลาที่มีจำนวนจุลินทรีย์ที่ต้องการมากที่สุด การที่จุลินทรีย์บางชนิดมีจำนวนมากกว่าชนิดอื่นในการเพิ่มจำนวนเชื้อโดยการเพาะเลี้ยงแบบ batch culture นั้นเป็นเพราะอัตราการเจริญสูงสุด (maximum specific growth rate) ของเชื้อเหล่านั้นสูงกว่าของชนิดอื่นที่เจริญได้เช่นกัน ดังนั้นการถ่ายเชื้อใหม่ในเวลาที่ถูกต้องมีผลให้เชื้อที่มีจำนวนมากคือ เชื้อที่เจริญเร็วที่สุดในบรรดาพวกที่มีการเจริญ อย่างไรก็ตามไม่จำเป็นเสมอไปว่าเชื้อที่มีอัตราการเจริญสูงจะเป็นเชื้อที่ดีที่สุดสำหรับนำไปใช้ต่อไป

การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์หรือการหมักแบบ batch culture ถือว่าเป็นระบบการเพาะเลี้ยงแบบปิดโดยเริ่มต้นจากการเพาะเชื้อลในสารละลายสารอาหารในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ จากนั้นบ่มภายในสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญ ตลอดระยะที่ทำการเลี้ยงเชื้อไม่มีการเติมอาหาร แต่อาจมีการเติมสารต่อต้านการเกิดฟอง (antifoam) และกรดหรือด่างเพื่อควบคุม pH องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ความเข้มข้นของชีวมวล และความเข้มข้นของ metabolite มักมีการเปลี่ยนแปลงคงที่เป็นผลจาก metabolism ของเซลล์ เมื่อนำค่าประชากรเซลล์ที่มีชีวิตมาทำเป็นกราฟความสัมพันธ์กับเวลาจะได้กราฟแบบฉบับการเจริญแบบ batch culture (typical batch growth curve) ซึ่งประกอบด้วยระยะ (phase) ต่างๆ คือ (1) ระยะ lag (2) ระยะที่มีความเร่ง (acceleration phase) (3) ระยะ exponential (4) ระยะลดความเร่ง (deceleration) (5) ระยะstationary และ (6) ระยะที่มีการตาย (dead phase)



ระยะ lag เป็นระยะที่มีการเจริญเป็นต่ำมากและอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ในช่วงแรกต่ำสุดแต่จะค่อยเพิ่มสูงขึ้นแม้ว่าจะน้ำหนักของเซลล์อาจมีการเปลี่ยนแปลง ในระยะนี้ยีสต์จะปรับตัวเข้ากับสภาวะแวดล้อมใหม่ เช่น สารอาหารที่มีปริมาณลดลง และ pH ใหม่ มีสารยับยั้งลดลง ต้องมีการเหนี่ยวนำระบบการขนส่งของสารอาหารใหม่และเอนไซม์สำหรับ metabolism อันดับแรก (primary metabolism) ทั้งนี้สภาวะทางสรีรวิทยาของกล้าเชื้อมีผลต่อระยะ lag ถ้ากล้าเชื้ออยู่ในระยะ exponential อาจจะไม่เกิดระยะ lag และเชื้ออาจจะมีการเจริญทันที นอกจากนั้นความเข้มข้นของกล้าเชื้ออาจมีผลต่อระยะ lag เช่นกัน โดยปกติในกระบวนการอุตสาหกรรมระยะนี้ควรลดให้สั้นที่สุดเท่าที่จะทำได้ เมื่อเซลล์เปลี่ยนจากระยะ lag เข้าสู่การแบ่งเซลล์ที่รวดเร็วเซลล์จะผ่านเข้าสู่ระยะที่มีความเร่งก่อนมีการเจริญแบบ exponential การเจริญของเซลล์สามารถอธิบายเป็นปริมาณได้เท่ากับการเพิ่มจำนวนของเซลล์เป็นสองเท่า (doubling of cell number) ต่อหน่วยของเวลาหรือการเพิ่มชีวมวลเป็นสองเท่า (doubling of biomass) ต่อหน่วยของเวลา (Brock, 1984; Smith, 1996; Walker, 1998)

สำหรับการเพาะเลี้ยงแบบ batch culture ระยะ exponential จะค่อนข้างสั้นเนื่องจากสารอาหารหมด โดยชนิดของสารอาหารมีผลต่อการเข้าสู่ระยะ stationary series เช่น เมื่อ *S. cerevisiae* ขาดแหล่งคาร์บอนจะเข้าสู่ระยะ stationary series แต่หากขาดแหล่งไนโตรเจนถ้าเซลล์นั้นมีนิวเคลียส ซึ่งมีโครโมโซมสองชุดจะมีการแบ่งนิวเคลียสแบบไมโอซิสและสร้างสปอร์หรือสร้างเส้นใยเทียม นอกจากนั้นยีสต์ยังอาจจะปล่อยผลิตภัณฑ์และ metabolite บางชนิด เช่น เอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์ที่มีผลยับยั้งการเจริญ หรือการที่มีการจับกลุ่มตกตะกอนของเซลล์

(cell flocculation) มาก ต่อจากระยะ exponential การเจริญช้าลงในระยะลดความเร่งก่อนที่เซลล์จะเข้าสู่ช่วงที่มีอัตราการเจริญเป็นศูนย์หรือระยะ stationary series การลดและหยุดการเจริญเพราะอาหารหมด

ดังนั้นเมื่อเชื้ออยู่ในระยะ substrate ชนิดหนึ่งหมดไปแต่ยังมี substrate ชนิดอื่น ยีสต์อาจเข้าสู่ระยะที่สอง (secondary phase) ของการเจริญแบบ exponential แม้ในการเพาะเลี้ยงแบบ batch culture ธรรมดาที่เรียกว่า ไดออกซี (diauxy) ปรากฏการณ์นี้เกิดเมื่อยีสต์อยู่ในแหล่งคาร์บอนสองชนิดซึ่งยีสต์ใช้เป็นลำดับ (ไม่ได้ใช้พร้อมกัน) จะมีระยะ exponential เกิดขึ้นโดยมีระยะ lag ระยะที่สองแยกระยะ exponential ออกจากจากกัน กระบวนการ diauxy นี้เกิดขึ้นเพราะ substrate แรกถูก metabolite อย่างสมบูรณ์ เช่น การเจริญ diauxy ของ *S. cerevisiae* ตรวจพบได้เมื่อเลี้ยงในสภาพที่มีออกซิเจนและขาดกลูโคส ซึ่งการกดดันเอนไซม์หลายชนิดหมดไป ทำให้สามารถใช้ substrate ชนิดที่สองคือ เอทานอล

ในระยะ stationary series การสะสมของชีวมวลของยีสต์ยังคงที่หรือเพิ่มทีละน้อยและอัตราการเจริญเป็นศูนย์ หลังจากระยะ stationary series ยีสต์อาจตาย และเกิดการย่อยตัวเอง (autolysis) ซึ่งมีผลต่อการเจริญต่อไป และการมีชีวิตของเซลล์ที่เหลือ (Walker, 1998; Standbury *et al.*, 1999)

การใช้เชื้อยีสต์ในการควบคุมทางชีววิธี

จุลินทรีย์ส่วนใหญ่ที่นำมาใช้ในการป้องกันกำจัดโรคพืชมักพบว่าไม่ประสบความสำเร็จในการควบคุมโรคในแปลงปลูก เนื่องจากสภาพแวดล้อมมีอิทธิพลอย่างมากต่อการรอดชีวิต ซึ่งส่วนใหญ่จะไม่ทนทานต่อสภาพแวดล้อมภายนอก จะตายหรืออ่อนแอลงได้ง่าย (Kooman *et al.*, 1990) ซึ่งแตกต่างจากเชื้อยีสต์ที่ส่วนใหญ่พบว่าสามารถเจริญได้บนพื้นผิวที่แห้งได้เป็นเวลานาน และทนทานต่อสารกำจัดเชื้อรา และสารปฏิชีวนะ (El-Tarabily and Sivasithamparam, 2006) นอกจากนี้ยังไม่มีรายงานว่ามีการสร้างสปอร์ที่ทำให้เกิดการแพ้คน (allergenic spore) (Droby and Chalutz, 1994) หรือสารที่เป็นอันตรายคนอื่นๆ (Arras *et al.*, 1999) เชื้อยีสต์สามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อราคาถูก ไมความซับซ้อนมาก แต่สามารถผลิตสารได้ในปริมาณมาก (Druvefors, 2004) ซึ่งสารที่เชื้อยีสต์สร้างยังรวมไปถึงวิตามิน แร่ธาตุ และกรดอะมิโนต่างๆ ที่เป็นประโยชน์ที่

พืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ (Hussein *et al.*, 1996) ยีสต์หลายชนิดที่พบในธรรมชาติได้ถูกนำมาศึกษาการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อโรคพืช และพบว่าเป็นทางเลือกใหม่ที่ดีทดแทนสารเคมีกำจัดเชื้อราได้ (Druvefors *et al.*, 2002; Saligkarias *et al.*, 2002)

Saprophytic yeasts เป็นเชื้อยีสต์ที่มักพบบนผิวใบพืช เปลือกไม้ ผิวผลไม้ ดอก ดินและผิวราก (rhizosphere) (Andrews and Buck 2002; Buck 2002; Buck *et al.*, 1998) และพบได้ในสภาพแวดล้อมทุกประเภท และมีความเฉพาะเจาะจงต่อสภาพแวดล้อมด้วยเช่นกัน (Phaff *et al.*, 1978) นอกจาก saprophytic yeasts ยังมี endophytic yeasts ซึ่งสามารถแยกได้จากเนื้อเยื่อพืชหลายชนิด เช่นจีนัส *Pichia Rhodotorula, Cryptococcus* และ *Williopsis* ซึ่งมีการศึกษาพบว่ามีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคทางดินหลายชนิด (Larran *et al.*, 2002; Nassar *et al.*, 2005)

การศึกษากลไกการต่อต้านของเชื้อยีสต์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุได้ทั้ง air borne pathogens ที่เข้าทำลายในส่วนของใบและผล และ soil borne pathogens ที่เข้าทำลายในส่วนของเมล็ดที่กำลังงอก และรากได้ไม่แตกต่างกัน (Buck 2002; Urquhart and Punja 2002) ซึ่งในการศึกษาการควบคุมโรคบนใบ และผลพบว่า antagonistic yeasts มีกลไกในการควบคุมการพัฒนาของโรคโดยการเจริญแย่งอาหาร และครอบครองพื้นที่ได้เร็วกว่าเชื้อโรค (Janisiewicz *et al.*, 2000) เช่น เชื้อยีสต์ *Candida ciferrii, Cryptococuc laurenii* (Vero *et al.*, 2002) และ *Pichia guilliermondii* (Droby *et al.*, 1992) มีความสามารถในการแย่งชิงอาหาร และเติบโตได้รวดเร็ว เนื่องจากเชื้อยีสต์ชนิดนี้สร้างส่วนขยายพันธุ์ได้ภายใน 24 ชั่วโมง ในช่วงอุณหภูมิและระดับความชื้นสัมพัทธ์ที่กว้าง ในขณะที่สปอร์ของเชื้อรา *Penicillium digitatum* ยังอยู่ในช่วงที่เริ่มงอก germ tube ซึ่งยีสต์ยังสร้างเอ็นไซม์ β-1,3-glucanase และ chitinase เพื่อย่อยผนังเซลล์ของเชื้อรา (Castoria *et al.*, 2001; Urquhart and Punja 2002) เช่นเชื้อยีสต์ *P. guilliermondi* ที่เกาะบนเส้นใยของเชื้อรา *Botrytis cinerea, Penicillium expansum* สาเหตุของโรคผลเน่าในผลไม้ (Wisniewski *et al.*,1991) และ *Colletotrichum capsici* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสในพริก (Chanchaichaovivat *et al.*, 2007) สามารถย่อยผนังเส้นใยเชื้อราและเส้นใยเกิดรูรั่ว ทำให้เชื้อราไม่สามารถเจริญต่อได้ การสร้างสารปฏิชีวนะทั้งในรูปที่แพร่ไปตามผิวพืช (diffusible) และรูปของก๊าซ (volatile) (Höfte *et al.*, 2004) เป็นอีกกลไกหนึ่งที่ยีสต์ใช้ในการต่อต้านเชื้อรา และเชื้อยีสต์ยังพบว่าเชื้อยีสต์ยังสามารถกระตุ้นความต้านทานของพืชได้ เช่น การกระตุ้นให้พืชสร้างสารประกอบ phenylalanine ammonia lyase phytoalexins peroxidases และ ethylene ขึ้นในเนื้อเยื่อพืช (Droby *et*

al., 2002) นอกจากนี้ยีสต์ยังสามารถใช้ควบคุมโรคที่จาก soil borne pathogens ได้ เช่น การควบคุมโรครากเน่าโคนเน่าที่เกิดจากเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ของ sugar beet (El-Tarabily, 2004) โรคเหี่ยวของข้าวโพดที่เกิดจากเชื้อ *Cephalosporium maydis* (El-Mehalawy *et al.*, 2004d) และโรคเหี่ยวของถั่วที่เกิดจากเชื้อ *Fusarium oxysporum* (El-Mehalawy *et al*, 2004a) ดังนั้นจะเห็นว่าการใช้เชื้อยีสต์ที่แยกจากบริเวณรากพืชสามารถการควบคุมโรคพืชที่เกิดกับระบบรากได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งอาจจะมีผลมาจากสารที่รากพืชหลั่งออกมา (root exudates) เป็นแหล่งอาหารที่กระตุ้นให้ยีสต์มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น ซึ่งการรายงานการศึกษาเชื้อยีสต์ที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดโรคพืชในประเทศไทยส่วนใหญ่เป็นการศึกษาในโรคหลังการเก็บเกี่ยว เช่น การใช้เชื้อยีสต์ *Candida tropicalis* ยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรา *Botrytis theobrome* สาเหตุโรคขั้วผลเน่าของมะม่วง Somsiri (1997) การใช้เชื้อยีสต์ *Issatchenkia orientalis* ที่แยกได้จากผลละมุดสุกควบคุมโรคแอนแทรคโนสของมะม่วง (Jomduang and Sardsud, 2006) และการใช้ยีสต์หลายชนิดร่วมกันในการควบคุมโรคแอนแทรคโนส ของพริกชี้ฟ้า ซึ่งเกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Chanchaichaovivat *et al.*, 2007)

การนำเชื้อยีสต์มาใช้ในการควบคุมโรคพืชอาจทำได้โดยการใช้ชื้อยีสต์เพียงอย่างเดียวหรือนำเชื้อยีสต์มาใช้ร่วมกับวิธีการอื่นๆในการควบคุมโรค เช่น การใช้ *Candida oleophila* และ *Pichia guilliermondii* ร่วมกับ 2% CaCl2 ควบคุม *Penicillium digitatum* สาเหตุโรค gray mold และblue mold ในแอปเปิล และ grape fruit (McLaughlin *et al.* 1990; Wisniewski *et al.* 1995; El-Ghaouth *et al.*, 2000a; Droby *et al.* (1997) นอกจากนี้ยังสามารถใช้ร่วมกับอนุพันธุ์ของไคโตซาน เช่นการใช้ *Candida saitoana* รวมกับ 0.2% glycochitosan ควบคุมโรค blue mold ในมะนาวและส้ม (El-Ghaouth *et al.*, 2000a) หรือใช้ร่วมกับ 2-deoxy-D-glucose 0.2 % ในการควบคุมเชื้อรา *Botrytis cinerea* และ *Penicillium expansum* ในแอปเปิล (El-Ghaouth *et al.*, 2000a, b) และยังพบว่าการใช้เชื้อยีสต์ *P. guillimondii* การใช้ร่วมกับสารเคมีกำจัดเชื้อราในกลุ่ม thiabendazole (TBZ) ในการควบคุม *Pe. digitatum* ในส้มพบว่าสามารถควบคุมเชื้อราได้ในระดับใกล้เคียงกับการใช้ TBZ ที่มีความเข้มข้นสูง (Barkai-Golan, 2001) เช่นเดียวกับการควบคุมโรคดังกล่าวบนผลแอปริคอท โดยใช้ *C. oliophila* ร่วมกับ TBZ มีประสิทธิภาพดีกว่าการใช้สารเคมีหรือเชื้อยีสต์เพียงอย่างเดียว (El-Nashawy, 1999) วิธีการควบคุมโรคทางกายภาพสามารถนำมาใช้รวมกับเชื้อยีสต์ปฏิปักษ์ได้เช่นกัน มีการใช้ แสง UV-C (254 nm) รวมกับเชื้อยีสต์ *Debaryomyces hansenii* สามารถลดเชื้อรา *Monilinia fructicola* สาเหตุโรคเน่าสีน้ำตาลบนผลท้อ และเชื้อรา *Pe. expansum* บนส้มเขียวหวาน

และเชื้อรา *Rhizopus stolonifer* บนมะเขือเทศและมันเทศ (Stevens *et al.*, 1997) ต่อมา Hallewin *et al.* (1999) ใช้เชื้อยีสต์ *Candida famata* ในการควบคุมโรค เน่าราสีเขียวที่เกิดจากเชื้อรา *Pe. digitatum* บนผล grape ซึ่งพบว่าสามารถลดการเน่าได้ดี

มูลนิธิ โครงการหลวง ROYAL PROJECT FOUNDATION

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 การแยกเชื้อราสาเหตุโรคพืช

ทำการเก็บตัวอย่างคะน้าที่แสดงอาการใบจุด ผลพริกที่แสดงอาการแอนแทรคโนส มะเขือยาวที่แสดงอาการผลเน่า สตรอเบอรี่ และกะหล่ำที่แสดงอาการรากเน่าโคนเน่า และต้นมะเขือเทศที่แสดงอาการเหี่ยว แยกเชื้อราโดยตรงจากชิ้นส่วนพืชภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo หรือ ทำ moist chamber บ่มที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส นาน 3–5 วัน เมื่อเชื้อราสร้าง fruiting body ใช้เข็มเขี่ยส่วนของเชื้อรามาวางบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) ในจานเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส นาน 3–5 วัน แยกเชื้อราให้บริสุทธิ์โดยวิธี single spore isolation และ hyphal tip isolation จากนั้นนำเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้ เลี้ยงบนอาหาร PDA Slant ในหลอดแก้ว เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ศึกษาต่อไป

3.2 การแยกยีสต์จากผิวผลไม้และการจัดกลุ่มยีสต์ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น

เก็บตัวอย่างผักและผลไม้ที่สมบูรณ์และไม่เป็นโรคจากแปลงที่ไม่ใช้สารเคมี (ตารางที่ 3.1) โดยนำพืชมาแช่ในน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วเป็นเวลา 1 นาที เพื่อใช้เป็น suspension นำ cell suspension ที่ได้มาเจือจางโดยวิธี Ten-fold dilution (Assis and Mariano, 1999) ให้ได้ระดับความเข้มข้น 10^{-4} และ 10^{-6} จากนั้นใช้ sterile micropipette ดูด suspension มา 1000 ไมโครลิตร ใช้แท่งแก้วรูปตัวแอล (L) spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ yeast malt extract agar (YMA) ที่ผสม streptomycin ความเข้มข้น 30 ppm จากนั้นบ่มเชื้อ incubate ที่อุณหภูมห้อง เป็นเวลา 1 วันเพื่อให้ยีสต์เจริญบนผิวหน้าอาหาร จากนั้นใช้เข็มเขี่ยเชื้อ (Needle) เขี่ยเชื้อจากแต่ละโคโลนีเดี่ยว ที่มีลักษณะแตกต่างกัน เช่น สีโคโลนี ผิวหน้าโคโลนี เป็นต้น จากนั้นแยกเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ YMA เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ เพื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชต่อไป

ตารางที่ 3.1 ตัวอย่างผลไม้ที่นำมาแยกยีสต์

ลำดับ	พืช (Host Plants)	ชื่อวิยาศาสตร์ (Scientific Name)	แหล่งที่มา (Location)
1	กระเจี๊ยบเขียว	*Abelmoschus esculentus* Moench.	คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2	กล้วยฤาษี	*Diospyros glandulosa* Lace	บ้านปางมะโอ อ.เชียงดาว จ.เชียงใหม่
3	กาแฟ	*Coffea arabica* L.	บ้านปางมะโอ อ.เชียงดาว จ.เชียงใหม่
4	จะค้าน	*Piper ribesioides* Wall.	บ้านปางมะโอ อ.เชียงดาว จ.เชียงใหม่
5	ตะขบ	*Muntingla calabura* L.	คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
6	ปาล์มพัด	*Prichardia Pacifica* Seem. & H.A. Wendl.	คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
7	ผักฮาก	*Erythropalum scandens Blume.*	บ้านปางมะโอ อ.เชียงดาว จ.เชียงใหม่
8	ฝรั่ง	*Psidium guajava* Linn.	บ้านปางมะโอ อ.เชียงดาว จ.เชียงใหม่
9	พริกขี้หนู	*Capsicum flutescens* Linn.	บ้านปางมะโอ อ.เชียงดาว จ.เชียงใหม่
10	พริกขี้ฟ้า	*Capsicum annuum* var. *minimum*	บ้านปากกอง อ.สารภี จ.เชียงใหม่
11	พิกุล	*Mimusops elengi* Linn.	คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
12	ฟักแม้ว หรือ มะระหวาน	*Sechium edule*	บ้านปางมะโอ อ.เชียงดาว จ.เชียงใหม่
13	มะเขือแจ้	*Solanum xanthocarpum*	บ้านปากกอง อ.สารภี จ.เชียงใหม่

ตารางที่ 3.1 ตัวอย่างผลไม้ที่นำมาแยกยีสต์ (ต่อ)

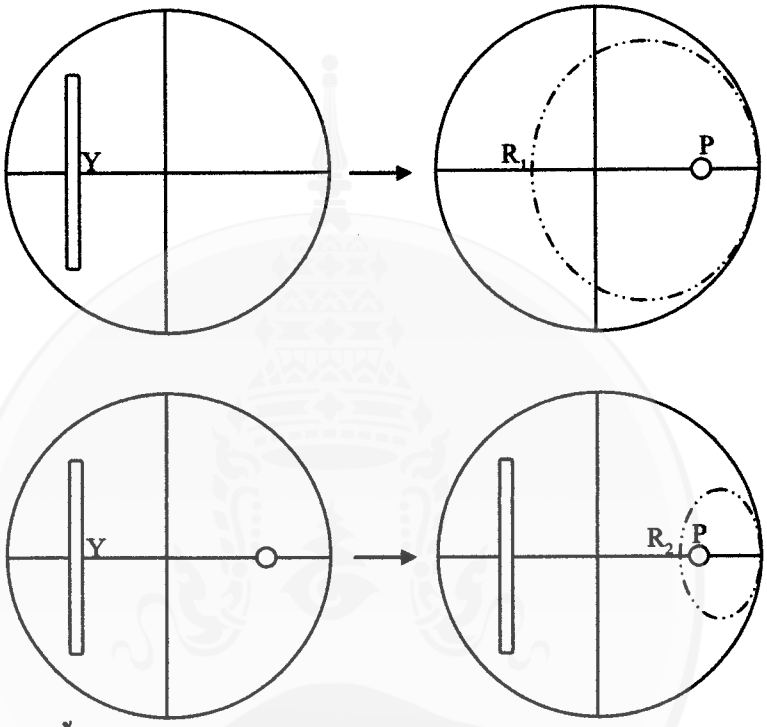
ลำดับ	พืช (Host Plants)	ชื่อวิยาศาสตร์ (Scientific Name)	แหล่งที่มา (Location)
14	มะเขือเทศ	*Lycopersicon esculuentum* Mill.	(MCC) คณะ เกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
15	มะเขือเปราะ	*Solanum xanthocarpum* Schrad. & Wendl.	(MCC) คณะ เกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
16	มะเขือพวง	*Soanum torvum* Sw	บ้านปางมะโอ อ.เชียงดาว จ.เชียงใหม่
17	มะเดื่อ	*Ficus racemosa* L.	บ้านปางมะโอ อ.เชียงดาว จ.เชียงใหม่
18	มะเฟือง	*Averrhoa carambola* L.	(MCC)
19	มะละกอ	*Carica papyya* L.	บ้านปากกอง อ.สารภี จ.เชียงใหม่
20	มะแว้ง	*Solanum trilobatum* L.	บ้านปางมะโอ อ.เชียงดาว จ.เชียงใหม่
21	ยอ	*Morinda citrifolia*	บ้านปากกอง อ.สารภี จ.เชียงใหม่
22	ละมุด	*Manikaro zapota* (L.) P. Royen	บ้านปากกอง อ.สารภี จ.เชียงใหม่
23	วาสนา	*Dracaena Fragrans Massangeana*	บ้านปางมะโอ อ.เชียงดาว จ.เชียงใหม่
24	หมาก	*Areca catechu* Linn.	คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
25	หมากนวล	*Adonidia merrillii*	คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
26	อินทผลัม	*Phoenix sylvestris*	คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3.3 การทดสอบประสิทธิภาพของยีสต์ปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราสาเหตุโรคพืช

นำเชื้อยีสต์ที่แยกได้จากการทดลอง 3.2 มาทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้แก่ *Alternaria brassicicola*, *Colletotrichum capsici*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Phytophthora* sp., *Pythium* sp. และ *Sclerotium* sp. ที่แยกได้จากการทดลองที่ 3.1 โดยวิธี Dual culture technique หรือ biculture technique (ภาพที่ 3.1) ใช้ loop แตะยีสต์ที่ใช้ทดสอบการเป็นปฏิปักษ์แต่ละไอโซเลท ลากเป็นเส้นตรงยาว 5 เซนติเมตรบนอาหาร YMA และบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน ก่อนการวางเชื้อสาเหตุโรค จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะปลายเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรค (culture disc) ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA นาน 7 วัน วาง ห่างจากขอบอาหาร 2 เซนติเมตร และห่างจากเชื้อยีสต์ 5 เซนติเมตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง ทำการตรวจสอบลักษณะของโคโลนีเชื้อราแต่ละชนิดเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีเชื้อยีสต์

คัดเลือกเชื้อยีสต์ที่แสดงปฏิกิริยาเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคเพื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราสาเหตุโรคพืชอีกครั้ง โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD กรรมวิธีละ 3 ซ้ำ เก็บผลการทดลองคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชดังด้านล่าง และวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชชนิดต่างด้วยโปรแกรมสถิติ Statistic 8.0

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา} = \frac{R1 - R2}{R1} \times 100$$



P = เชื้อราสาเหตุโรคพืช (pathogen)

Y = ยีสต์ปฏิปักษ์ antagonist

R1 = เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราสาเหตุโรคพืชในชุดควบคุม

R2 = เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราสาเหตุโรคพืชในจานอาหารเลี้ยงร่วม

ภาพที่ 3.1 การวางเชื้อราสาเหตุ และยีสต์ปฏิปักษ์โดยวิธี Dual culture techniqu

3.4 การศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์ปฏิปักษ์ที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มปริมาณยีสต์ในสภาพห้องปฏิบัติการ

ทำการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์ปฏิปักษ์ 5 สูตรดังนี้

สูตร 1 YPD (Yeast Peptone Dextrose) (Sherman, 2002)

Yeast extract	10	g
Peptone	20	g
Dextrose	20	g
Water	1	L

วิธีเตรียม ต้ม Yeast extract กับ Peptone ในน้ำกลั่น 500 ml ด้วยไฟอ่อน ๆ แล้วคนจนส่วนผสมรวมเป็นเนื้อเดียวกัน นำ Dextrose ละลายในน้ำกลั่น 500 ml แล้วผสมน้ำ Yeast extract กับ Peptone ที่ต้มไว้ วัดปริมาตรและเติมน้ำให้ได้ 1 ลิตร คนให้ส่วนผสมเข้ากัน

สูตร 2 กากน้ำตาลผสมข้าว

ข้าว	200	g
กากน้ำตาล	20	g
น้ำ	1	L

วิธีเตรียม ต้มข้าวในน้ำกลั่น 500 ml จนน้ำเดือดทิ้งไว้ 5 นาทีแล้วกรองน้ำข้าวด้วยผ้ากรอง เก็บส่วนที่เป็นน้ำไว้ นำกากน้ำตาลละลายในน้ำกลั่น 500 ml แล้วผสมน้ำข้าวที่ต้มไว้ วัดปริมาตรและเติมน้ำให้ได้ 1 ลิตร คนให้ส่วนผสมเข้ากัน

สูตร 3 กากน้ำตาลผสมข้าวโพด

ข้าวโพด	200	g
กากน้ำตาล	20	g
น้ำ	1	L

วิธีเตรียม ต้มข้าวโพดที่หั่นเอาเฉพาะเมล็ดในน้ำกลั่น 500 ml จนน้ำเดือดทิ้งไว้ 5 นาทีแล้วกรองน้ำข้าวโพดด้วยผ้ากรอง เก็บส่วนที่เป็นน้ำไว้ นำกากน้ำตาลละลายในน้ำกลั่น 500 ml แล้วผสมน้ำข้าวโพดที่ต้มไว้ วัดปริมาตรและเติมน้ำให้ได้ 1 ลิตร คนให้ส่วนผสมเข้ากัน

สูตร 4 กากน้ำตาลผสมเศษผักและผลไม้

เศษผักและผลไม้	200	g
กากน้ำตาล	20	g
น้ำ	1	L

วิธีเตรียม ต้มเศษผักและผลไม้ที่หั่นละเอียดในน้ำกลั่น 500 ml จนน้ำเดือดทิ้งไว้ 5 นาที แล้วกรองน้ำเศษผักและผลไม้ด้วยผ้ากรอง เก็บส่วนที่เป็นน้ำไว้ นำกากน้ำตาลละลายในน้ำกลั่น 500 ml แล้วผสมน้ำเศษผักและผลไม้ที่ต้มไว้ วัดปริมาตรและเติมน้ำให้ได้ 1 ลิตร คนให้ส่วนผสมเข้ากัน

สูตร 5 กากน้ำตาลผสมรำข้าว

รำข้าว	200	g
กากน้ำตาล	20	g
น้ำ	1	L

วิธีเตรียม ต้มรำข้าวในน้ำกลั่น 500 ml จนน้ำเดือดทิ้งไว้ 5 นาทีแล้วกรองน้ำรำข้าวผ้ากรองเก็บส่วนที่เป็นน้ำไว้ นำกากน้ำตาลละลายในน้ำกลั่น 500 ml แล้วผสมน้ำรำข้าวที่ต้มไว้ วัดปริมาตรและเติมน้ำให้ได้ 1 ลิตร คนให้ส่วนผสมเข้ากัน

เมื่อเตรียมอาหารแต่ละสูตรเสร็จแล้วจึงทำการแยกใส่ขวดแก้ว (flask) ขนาด 250 ml สูตรละ 5 ขวด แล้วปิดปิดขวดด้วยจุกสำลี ใช้กระดาษหุ้มจุกสำลีอีกชั้น ใช้เชือกหรือยางรัดกระดาษไว้ นำไปนหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตร.นิ้ว นาน 20 นาที เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

คัดเลือกยีสต์ปฏิปักษ์ที่แสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคในระดับดีจำนวน 5 ไอโซเลท คือไอโซเลท 12, 77, 132, 149 และ 154 มาเพื่อใช้ในการเตรียมสารแขวนลอยของเซลล์ยีสต์แต่ละไอโซเลท โดยใช้น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 2–5 ml เติมลงไปบนหน้าอาหาร MEA ที่มีเชื้อยีสต์เจริญอยู่ ขูด colony ของเชื้อยีสต์ให้หลุดออกหน้าอาหาร จากนั้นนำเซลล์แขวนลอยของยีสต์ที่ได้มาทำการปรับความเข้มข้นด้วยวิธี dilution technique เพื่อให้ได้จำนวนของเซลล์ยีสต์ในช่วง 4.5–6.5 × 10^5 cell/ml ด้วย hemocytometer จากนั้นใช้ pipette ดูด เซลล์แขวนลอยของยีสต์ที่ปรับปริมาตรไว้ใส่ลงไปในอาหารเหลว 5 ml จะได้ปริมาตรสุทธิที่ 50 ml แล้วในไปเขย่าใน shaking flask ด้วยรอบเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน บันทึกผลการทดลองทุกวัน โดยนับความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์ด้วย hemocytometer ทุกวัน จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการเพิ่มจำนวนเซลล์ของเชื้อยีสต์ในอาหารเหลวแต่ละชนิดด้วยโปรแกรมสถิติ Statistic 8.0

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การศึกษาลักษณะอาการของโรคการแยกเชื้อราสาเหตุโรคพืช

จากการศึกษาอาการและเชื้อสาเหตุโรคของผักบางชนิดพบว่า ใบคะน้าที่แสดงอาการใบจุด ส่วนใหญ่มักพบอาการที่ใบแก่ก่อนโดยปรากฏเป็นจุดเล็กๆ สีน้ำตาลอ่อนปนเหลือง พบสปอร์ของเชื้อรา *Alternaria brassicicola* จำนวนมาก conidiophore และ conidia มีสีน้ำตาล จากการแยกเชื้อพบว่าโคโลนีของเชื้อราเป็นสีดำอมเขียวมะกอก เมื่อไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบเชื้อรามีการสร้างสปอร์เป็นจำนวนมาก (ภาพที่ 4.1)

ผลพริกที่แสดงอาการของโรคแอนแทรคโนสพบว่า อาการที่เกิดในระยะแรกปรากฏแผลเป็นวงกลมช้ำสีน้ำตาล เนื้อเยื่อลึกลงไปในเนื้อเยื่อผลเล็กน้อย จากนั้นแผลจะค่อยๆ ขยายกว้างออกไปเป็นวงกลมหรือวงรีรูปไข่ ปรากฏเป็นจุดดำๆ อยู่บนแผลจำนวนมาก ซึ่งลักษณะจุดดำที่เห็นคือ setae ของเชื้อ จากการแยกเชื้อเชื้อสาเหตุบริเวณแผลผลพริก พบเชื้อรา *Colletotrichum capsici* ซึ่งเป็นสปอร์เซลล์เดียว รูปเคียวหรือพระจันทร์เสี้ยว ลักษณะใส เส้นใยของเชื้อรามีสีขาวอมเทา ตรงกลางโคโลนีมีสีเทาเข้ม ภาพที่ 4.2)

จากการแยกเชื้อสาเหตุโรคพืชจากต้นมะเขือเทศที่แสดงอาการเหี่ยว ที่บริเวณโคนต้นภายนอกไม่มีอาการผิดปกติ เมื่อผ่าตามยาวของต้นพบว่า บริเวณท่อน้ำท่ออาหารมีสีน้ำตาลแดงหรือแดง ซึ่งเป็นลักษณะสำคัญของโรคที่เกิดจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* ซึ่งสร้างสปอร์สีใส พบ conidia 2 ชนิด คือ macroconidia (มีหลายเซลล์รูปเคียวหรือพระจันทร์เสี้ยว) และ microconidia (มีเซลล์เดียวรูปไข่) ลักษณะของโคโลนีเมื่อเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เส้นใยฟูมีสีขาว ขาวอมชมพู จนถึงสีขาวอมม่วง และสีเหลืองอ่อน ภาพที่ 4.3)

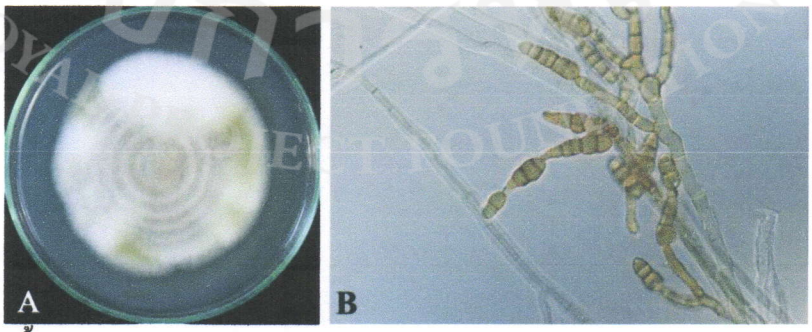
การแยกเชื้อราสาเหตุโรคพืชจากสตรอเบอรี่แสดงอาการรากเน่าโคนเน่า พบเชื้อราสาเหตุโรค คือ เชื้อรา *Phytophthora* sp. เมื่อเลี้ยงเชื้อให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เชื้อราสร้างเส้นใยสีขาวฟู ลักษณะของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเชื้อสร้าง sporangiospores ที่พบมี

รูปร่างอ้วนกลมรูปร่างคล้ายผลมะนาว มี papillate อยู่บนก้าน sporangiophores ที่แตกแขนง ภาพที่ 4.4)

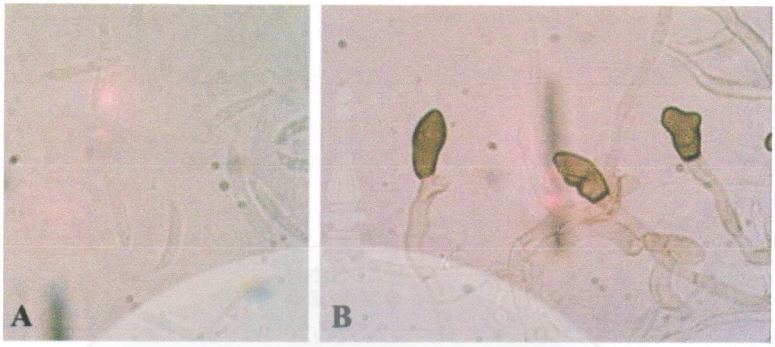
มะเขือยาวที่แสดงอาการผลเน่าที่เกิดจากเชื้อรา *Pythium* sp. หลังจากเชื้อราเข้าทำลายพบเส้นใยเจริญเต็มเนื้อเยื่อมองเห็นลักษณะขาวฟูลุกลามไปบริเวณข้างเคียง ทำให้ผลมะเขือยาวแสดงอาการเน่าเละผลมะเขือยาวจะกลายเป็นสีดำ ต่อมาเชื้อราสร้าง sporangium และ oospore ภายในและภายนอกผลมะเขือยาว ภาพที่ 4.5)

กะหล่ำปลีที่แสดงอาการรากเน่าโคนเน่า พบว่าโคนต้นกะหล่ำบริเวณระดับดิน หรือส่วนของต้นพืชที่ติดกับดินจะถูกทำลาย และมีเส้นใยของเชื้อราขึ้นปกคลุมอยู่ พบมีเม็ดสีน้ำตาล sclerotium ขนาดเท่าเมล็ดผักกาดติดอยู่กับเส้นใย ทำให้เรียกโรคนี้อีกชื่อหนึ่งว่า โรคราเมล็ดผักกาด จากการแยกเชื้อ พบเชื้อรา *Sclerothium* sp. โคโลนีของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ สร้างเส้นใยสีขาวแผ่กระจายบนผิวหน้าอาหารอย่างรวดเร็ว และสร้างเม็ด sclerotium หลังการเลี้ยงเชื้อประมาณ 2 สัปดาห์ ภาพที่ 4.6)

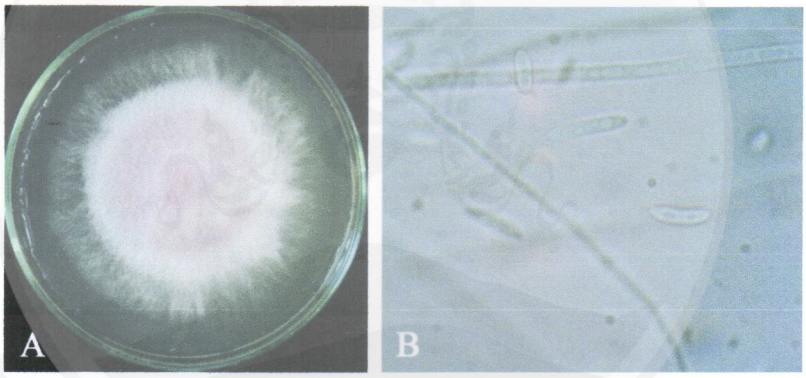
จากการศึกษาในระยะแรกได้ทำการแยกเชื้อรา *Cercospora lactuca-sativae* ได้จากผักสลัด แต่เนื่องจากผู้วิจัยไม่สามารถกระตุ้นให้เชื้อราสร้างสปอร์บนอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์เพื่อใช้ในการปลูกเชื้อในการทดลองต่อไปได้ จึงได้ตัดเชื้อราดังกล่าวออกจากการศึกษาครั้งนี้



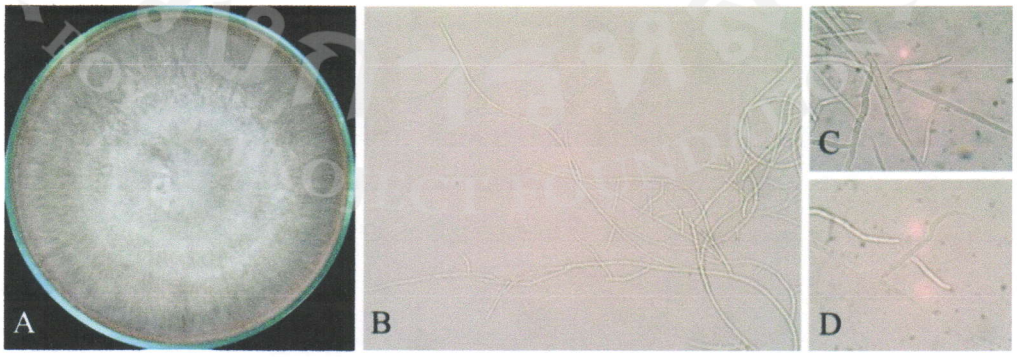
ภาพที่ 4.1 เชื้อรา *Alternaria brassicicola*; ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA (A) และโคนิเดีย (B)



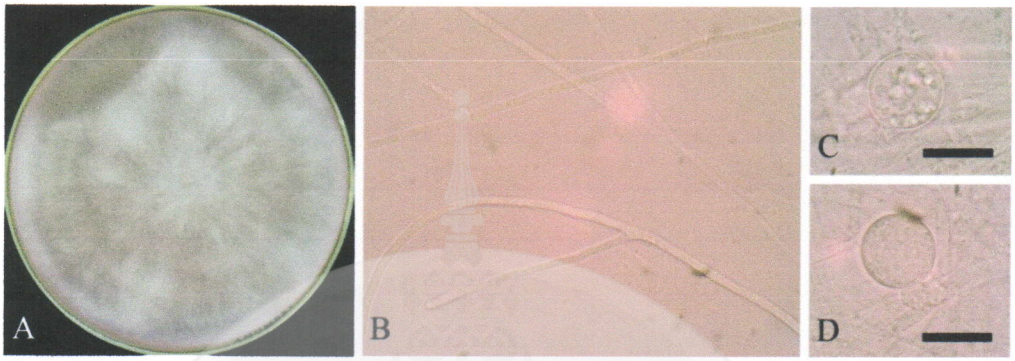
ภาพที่ 4.2 เชื้อรา *Colletotrichum capsici*; ลักษณะโคนิเดีย (A) และ appressorium (B)



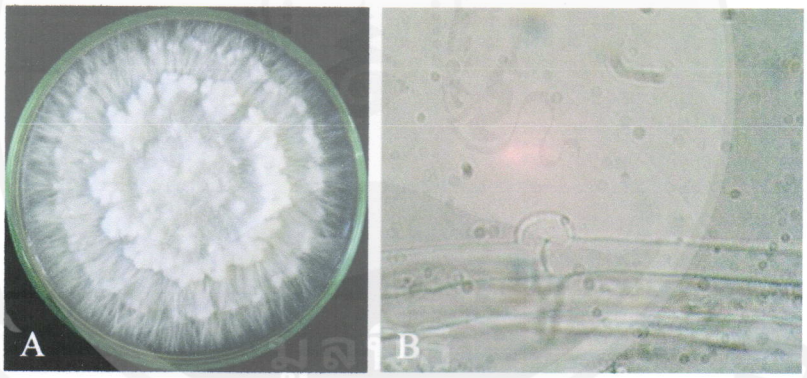
ภาพที่ 4.3 เชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*; ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA (A) และโคนิเดีย (B)



ภาพที่ 4.4 เชื้อรา *Phytopthora* sp.; ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA (A) และเส้นใย (B-D)



ภาพที่ 4.5 เชื้อรา *Pythium* sp. ; ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA (A), เส้นใย (B), oospore (C) และ sporangium (D)



ภาพที่ 4.6 เชื้อรา *Sclerothium* sp. ; ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA (A) และเส้นใย (B)

โครงการหลวง
ROYAL PROJECT FOUNDATION

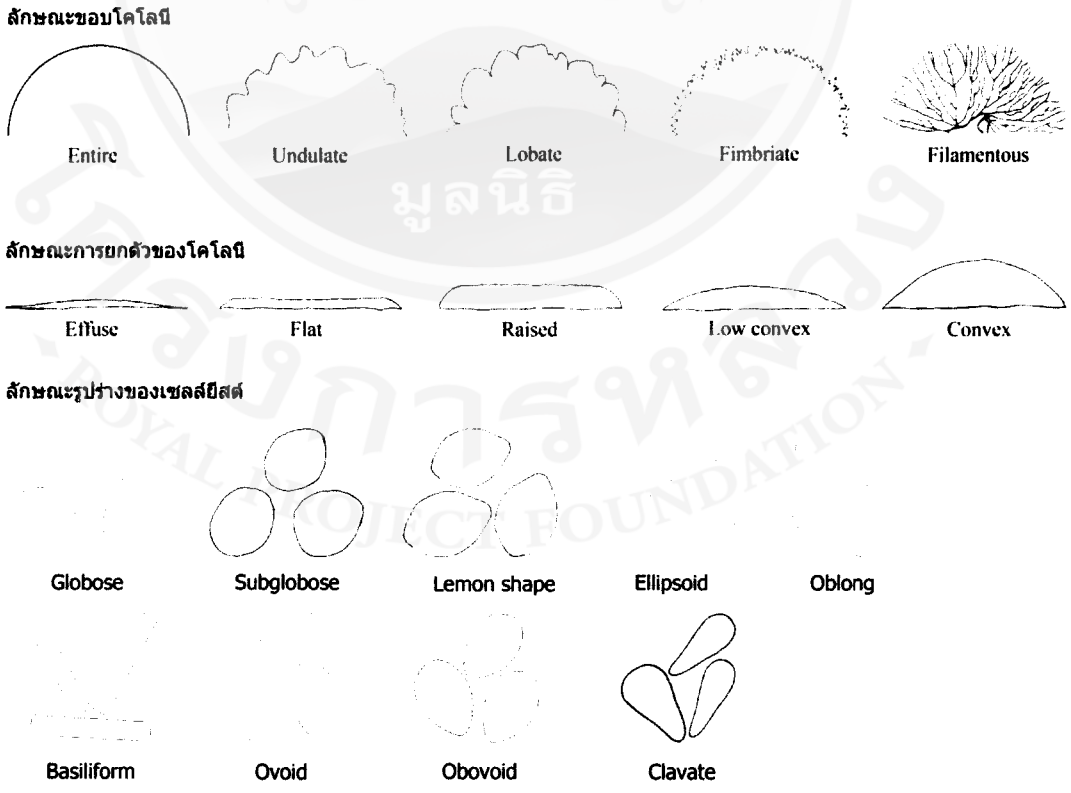
4.2 การแยกเชื้อยีสต์จากผิวผลไม้และการจัดกลุ่มยีสต์ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น

จากการแยกเชื้อยีสต์จากผิวของผลไม้ 26 ชนิด สามารถเก็บรวบรวมเชื้อยีสต์ได้ทั้งหมด 203 ไอโซเลท มีจำนวนที่พบแตกต่างกันตามชนิดของพืช โดยพบยีสต์จำนวนมากที่สุดบนผิวเปลือกกล้วยน้ำว้าสุก (159 ไอโซเลท) รองลงมาคือ ผลตะขบสุก (30 ไอโซเลท) มะเขือเทศสุก (22 ไอโซเลท) และมะละกอสุก (20 ไอโซเลท) ตามลำดับ ผลไม้ชนิดอื่นพบจำนวนยีสต์น้อยกว่า คือ 2-10 ไอโซเลทต่อพืช (ตารางที่ 1) ซึ่งอาจเนื่องมาจากผลไม้สี่ชนิดที่พบยีสต์จำนวนมากเป็นผลไม้ที่เมื่อสุกแล้วมีรสหวานมาก และมีเนื้อผลที่นุ่ม และอาจและเมื่อสุกจัด ทำให้มีน้ำตาลและสารอาหารบริเวณผิวรอบผลปริมาณมาก เมื่อยีสต์ซึ่งส่วนใหญ่เป็น saprophytic yeasts ที่สามารถแพร่กระจายได้ง่ายทั้งที่ติดไปกับแมลงและโดยกระแสลม และยังมีความเฉพาะเจาะจงต่อพืชอาศัยค่อนข้างต่ำ (Andrews and Buck 2002; Buck 2002) สัมผัสบนผิวพืช จึงสามารถมีชีวิตรอดและเจริญบนผิวพืชได้มากกว่า

ตารางที่ 4.1 จำนวนเชื้อยีสต์ที่แยกได้จากผลไม้ชนิดต่างๆ

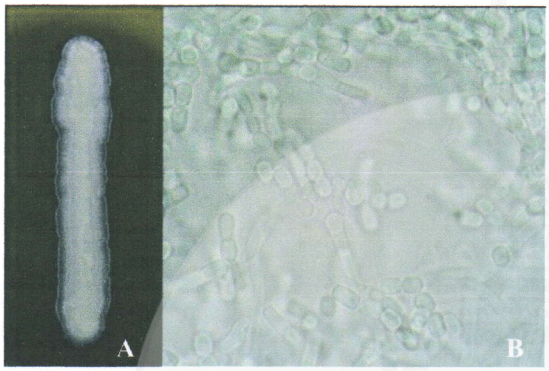
ลำดับ	พืช	จำนวนไอโซเลท	ลำดับ	พืช	จำนวนไอโซเลท
1	กระเจี๊ยบเขียว	10	14	มะเขือแจ้	4
2	กล้วยน้ำว้า	15	15	มะเขือเทศ	20
3	กล้วยฤาษี	4	16	มะเขือพวง	4
4	เฉาสะค้าน	3	17	มะเขือยาว	6
5	ตะขบ	30	18	มะเดื่อ	3
6	ปาล์มพัด	5	19	มะเฟือง	5
7	ผักฮาก	2	20	มะละกอ	22
8	ฝรั่ง	4	21	ยอ	7
9	พริกขี้หนู	6	22	ละมุด	2
10	พริกชี้ฟ้า	11	23	วาสนา	4
11	พิกุล	8	24	หมาก	5
12	มะเขือเปราะ	7	25	หมากนวล	2
13	ฟักแม้ว	3	26	อินทผลัม	2
				รวม	203

การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของยีสต์บนอาหารเลี้ยงเชื้อได้แก่ ลักษณะโคโลนี เช่น สีโคโลนี ผิวหน้าโคโลนี และ ลักษณะขอบของโคโลนี และลักษณะของเซลล์ยีสต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ได้แก่ ลักษณะรูปร่างเซลล์ยีสต์ สี การเกิดสายโซ่ และเส้นใย สามารถแบ่งได้เป็น 26 กลุ่มโดยอ้างอิงลักษณะโคโลนี และลักษณะเซลล์ในภาพที่4.2 พบว่ายีสต์บางชนิดพบได้บนผิวพืชหลายชนิดและพบได้ในหลายพื้นที่ เช่น ไอโซเลท 94, 128, 156, 172, 173, 190 และ 200 ที่พบบนมะเขือพวง ละมุด อินทผลัม ข้าวบาร์เลย์ มะเดื่อ และ หมาก ตามลำดับ แต่บางชนิดพบบนพืชอาศัยแคบ เช่น ไอโซเลท123และ 189 ที่พบบน มะเขือเทศ และมะเดื่อ เท่านั้น แสดงให้เห็นว่ายีสต์แต่ละชนิดมีระดับความเฉพาะเจาะจงต่อพืชแตกต่างกัน (Libkind *et al.*, 2007; Phaff *et al.*, 1978; Starmer *et al.*, 1978) อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาความหลากหลายของยีสต์บนพืชอาศัยข้างต้น และในพื้นที่ๆ ต่างกัน ทั้งนี้เป็นการตรวจสอบยืนยันข้อสันนิษฐานของยีสต์ที่พบ เพื่อเปรียบเทียบ



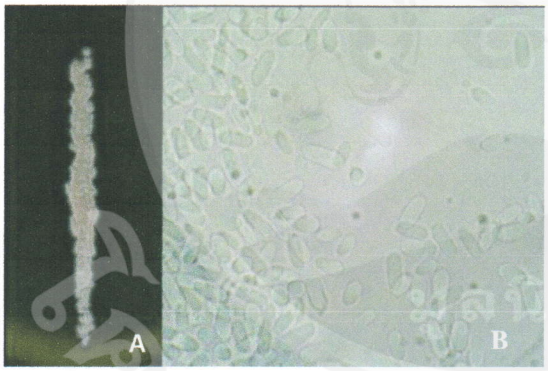
ภาพที่ 4.7 ลักษณะโคโลนีของยีสต์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ YMA และลักษณะรูปร่างของเซลล์ยีสต์

ลักษณะสัณฐานวิทยาของยีสต์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ yma (A) เป็นเวลา 3 วัน และลักษณะของเซลล์ (B) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า ของเชื้อยีสต์ทั้ง 26 กลุ่ม ดังนี้



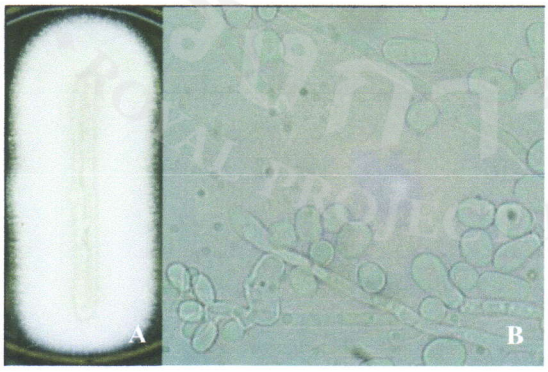
กลุ่ม 1 ได้แก่

ไอโซเลท 15 โคโลนีมีสีขาว ผิวหน้ามันวาว โคโลนีเจริญยกขึ้นจากผิวอาหารแบบ raised ขอบโคโลนีเรียบ (entire) ถึง (fimbriate) เล็กน้อย; เซลล์มีสีใส ทรงกระบอก (obtuse) ต่อกันเป็นสายโซ่ แตกกิ่งก้านสั้นๆ หัวท้ายตัด (trancate) หรือมนเล็กน้อย (round)



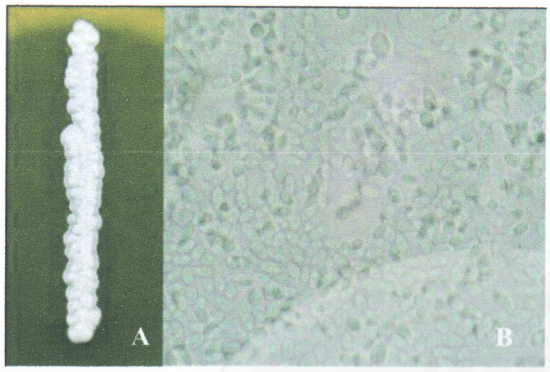
กลุ่ม 2 ได้แก่

ไอโซเลท 59 โคโลนีมีสีครีม ผิวหน้ามันวาว เล็กน้อย โคโลนีนูนขึ้นมาบนผิวอาหารแบบ low convex มีขอบและผิวหน้าโคโลนีเป็นรอยหยักแบบ erose ถึง lobate; เซลล์สีใส ทรงกระบอก (oblong) ถึงรี (ellipsoid)



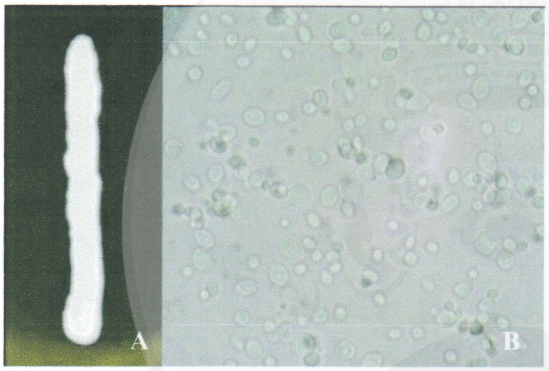
กลุ่ม 3 ได้แก่

ไอโซเลท 123 โคโลนีมีสีขาว สร้างเส้นใยแผ่บนผิวหน้าอาหารแบบ effuse ขอบโคโลนีเป็นเส้นใย (filamentouse) ชัดเจน สร้างสปอร์ขนาดใหญ่ รูปร่างตั้งแต่ subglobose ถึง clavate บางครั้งพบแบบ ellipsoid สปอร์ถูกสร้างบรเวณปลายเส้นใยแท้ หรือบนเซลล์ปลายเส้นใยที่มีขนาดใหญ่ รูปร่างไม่แน่นอน



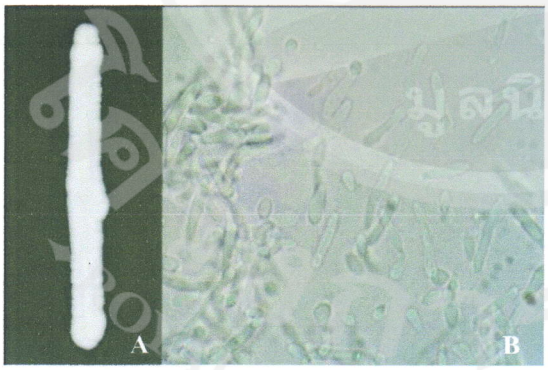
กลุ่ม 4 ได้แก่

ไอโซเลท 124 โคโลนีมีสีขาวอมเทา ผิวหน้ามันวาว โคโลนีนูนขึ้นมาบนผิวหน้าอาหารแบบ convex; ขอบและผิวหน้าโคโลนีเป็นรอยหยักแบบ lobate เซลล์สีใส ทรงกระบอก (oblong) และรูปไข่ (ovoid)



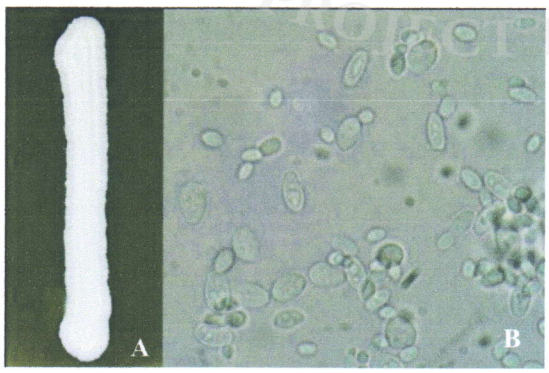
กลุ่ม 5 ได้แก่

ไอโซเลท 155 โคโลนีมีสีขาวครีม ผิวหน้ามันวาวโคโลนีเรียบไปบนผิวหน้าอาหารแบบ flat ขอบและผิวหน้าโคโลนีเรียบ (entire); เซลล์สีใส ทรงรี และ รูปไข่ (ovoid)



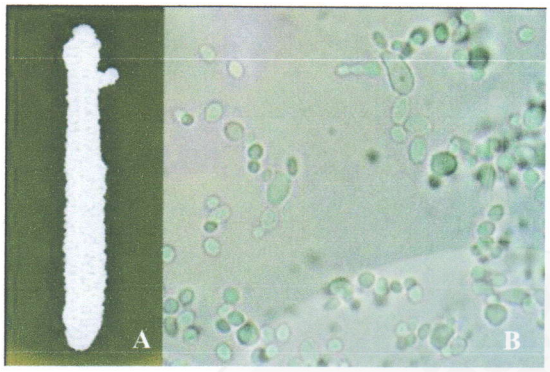
กลุ่ม 6 ได้แก่

ไอโซเลท 159 โคโลนีมีสีขาวอมเทา ผิวหน้ามันวาว โคโลนีบนผิวหน้าอาหารแบบ low convex ขอบและผิวหน้าโคโลนีเรียบ (entire); เซลล์สีใส ทรงกระบอก (basiliform) บางครั้งพบทรงรี (ellipsoid)



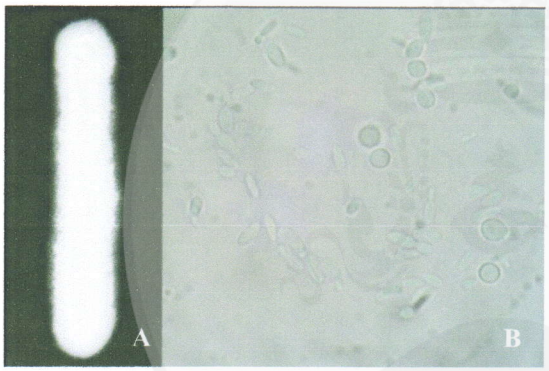
กลุ่ม 7 ได้แก่

ไอโซเลท 164 โคโลนีมีสีขาว เจริญนูนขึ้นมาผิวอาหารแบบ raised ขอบและผิวหน้าโคโลนีเรียบ บางส่วนพบหยักแบบ undulate; เซลล์สีใส รูปทรงหลากหลาย ตั้งแต่ subglobose, ellipsoid, ovoid และ lemon shape



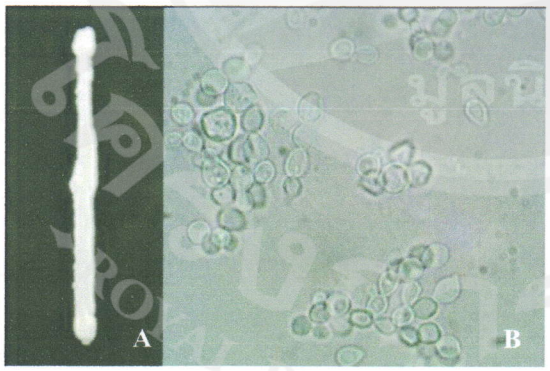
กลุ่ม 8 ได้แก่

ไอโซเลท 185 โคโลนีมีสีขาว เจริญโค้งขึ้นมา ผิวอาหารแบบ convex ผิวหน้าและขอบโคโลนีหยักแบบ lobate บางส่วนพบ fimbriate; เซลล์สีใส ทรงกลม (globose) รูปไข่ (ovoid) หรือ lemon shape



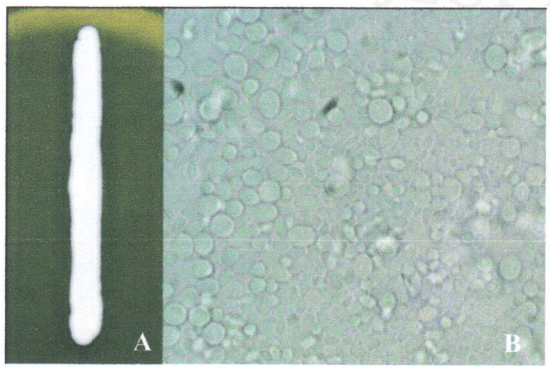
กลุ่ม 9 ได้แก่

ไอโซเลท 186 โคโลนีสีขาว เจริญเรียบบนผิวอาหารแบบ flat ขอบและผิวหน้าโคโลนีสร้างเส้นใยแบบ filamentous; เซลล์สีใส ทรงกลม (globose) และทรงรี (ellipsoid)



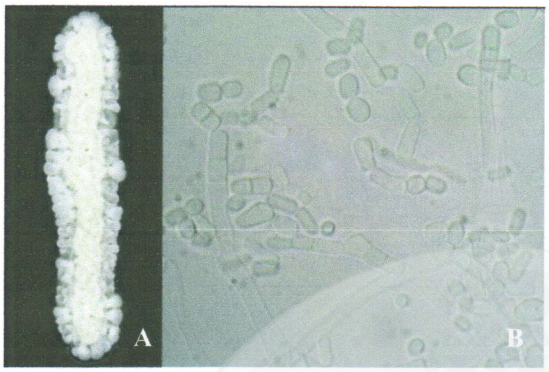
กลุ่ม 10 ได้แก่

ไอโซเลท 189 โคโลนีมีสีขาวครีม ผิวหน้ามันวาวเจริญนูนขึ้นมาผิวอาหารแบบ raised ขอบและผิวหน้าโคโลนีหยักแบบ undulate เล็กน้อย; เซลล์สีใส รูปไข่ (ovoid) หรือคล้าย lemon shape สร้างต่อกันเป็นสายสั้นๆ ตั้งแต่ 3– เซลล์



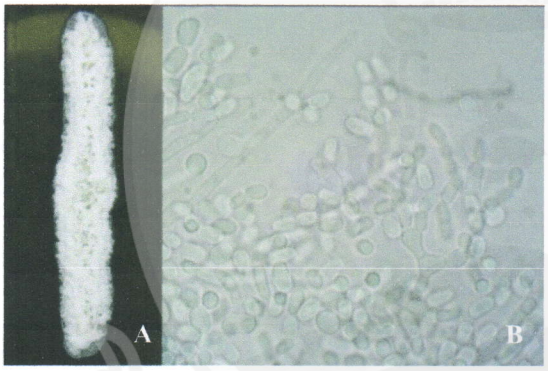
กลุ่ม 11 ได้แก่

ไอโซเลท 198 โคโลนีมีสีขาวครีม ผิวหน้ามันวาว เจริญนูนขึ้นมาผิวอาหารแบบ flat ขอบและผิวหน้าโคโลนีเรียบแบบ low convex; เซลล์สีใส ทรงกลม (subglobose) รี (ellipsoid) หรือ (lemon shape)



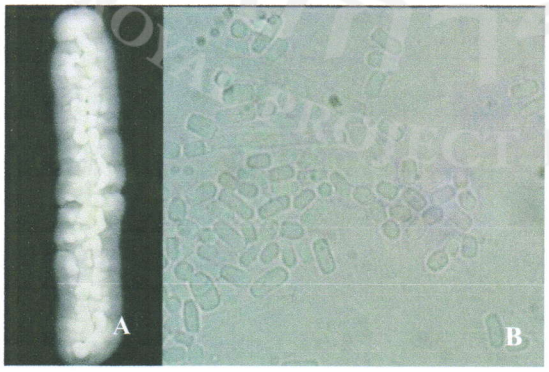
กลุ่ม 12 ได้แก่

ไอโซเลท 1 และ 16 โคโลนีสีขาวครีมเนื้อด้านเจริญนูนขึ้นมาผิวอาหารแบบ convex และหยักลงไปในผิวอาหารแบบ (lobate) ;เซลล์สีใสทรงกระบอก (oblong) ปลายแบบหน้าตัด truncate บางครั้งพบคล้ายทรงกลม (subglobose) สปอร์เกิดจากการหักของเส้นใยเทียมแบบ thallie



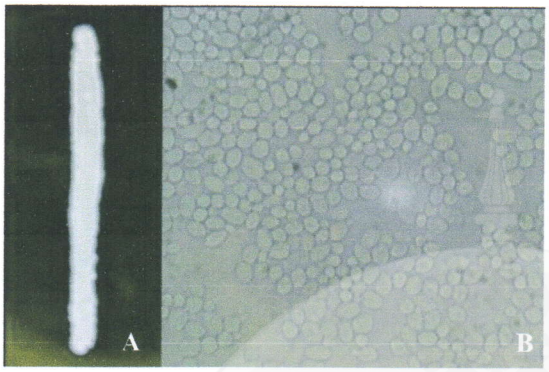
กลุ่ม 13 ได้แก่

ไอโซเลท 9 และ 2 โคโลนีมีสีขาวด้านเจริญนูนขึ้นมาผิวอาหารแบบ convex ขอบและผิวหน้าโคโลนีหยักเป็นรอยแบบ lobate ขนาดเล็ก บางส่วนพบลักษณะคล้ายเส้นใย fimbriate หรือ undulate; เซลล์สีใสคล้ายทรงกลม (subglobose) รูปไข่ (ovoid) หรือกระบอง (clavate) ทรงกระบอก (obtuse) สร้างจากปลายเส้นใยเทียมต่อกันเป็นสาย และแตกกิ่งก้าน



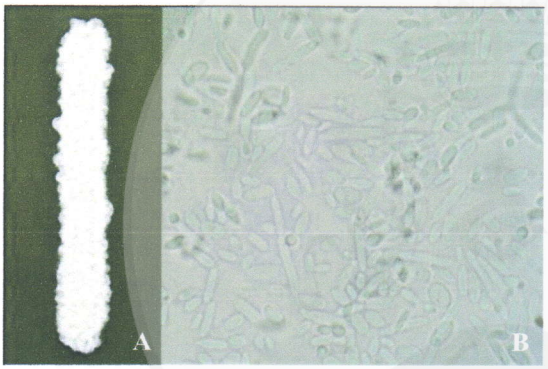
กลุ่ม 14 ได้แก่

ไอโซเลท 20 และ 60 โคโลนีสีขาวด้าน เจริญนูนขึ้นมาผิวอาหารแบบ (convex) และหยักลงไปในผิวอาหาร ขอบโคโลนีเรียบ ผิวหน้าเป็นแบบ lobate; เซลล์สีใส ทรงกระบอก (oblong) หัวตัด (truncate) สปอร์เกิดจากการหักของเส้นใยเทียมแบบ thallic ต่อกันเป็นสายสั้นๆ



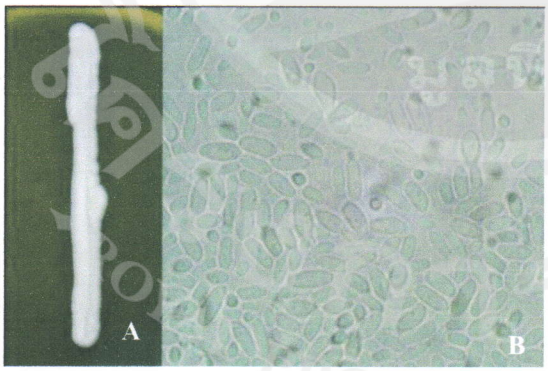
กลุ่ม 15 ได้แก่

ไอโซเลท 79 และ 80 โคโลนีมีสีขาวครีม เจริญบนผิวอาหารแบบ raised ขอบและหน้าโคโลนีเรียบ; เซลล์สีใส คล้ายทรงกลม (subglobose) หรือคล้ายผลมะนาว (lemon shape)



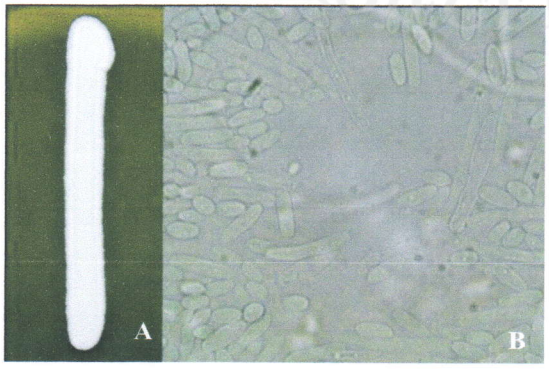
กลุ่ม 16 ได้แก่

ไอโซเลท 202 และ 90 โคโลนีมีสีขาวเนื้อด้าน เจริญนูนขึ้นมาผิวอาหารแบบ convex ขอบและหน้าโคโลนีเป็นรอยหยักแบบ lobate มีเส้นใยเล็กน้อย (fimbriate); เซลล์สีใส ทรงกระบอกสั้น (oblong) ถึงยาว (basilliform)



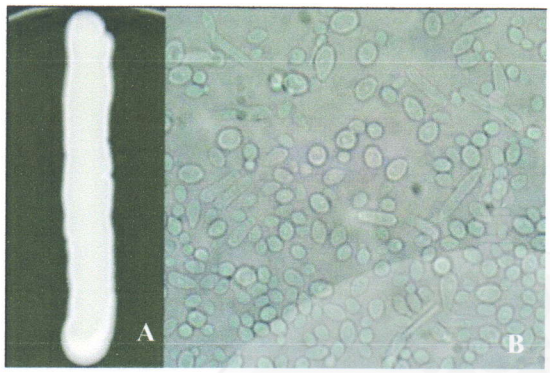
กลุ่ม 17 ได้แก่

ไอโซเลท 136 และ 95 โคโลนีมีสีขาวขุ่นเนื้อสัมผัสเยิ้ม เจริญบนผิวหน้าอาหารแบบ flat ขอบและหน้าโคโลนีเรียบ (entire); เซลล์สีใส ทรงกระบอก (oblong) หรือรี (ellipssoid)



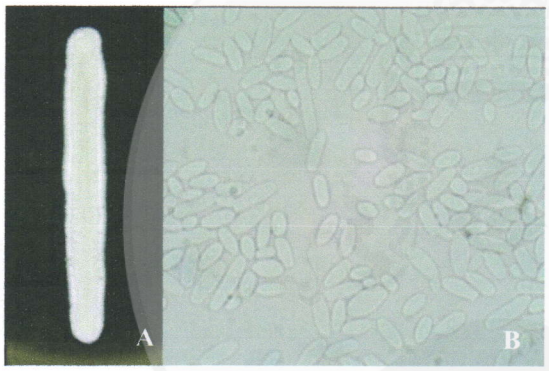
กลุ่ม 18 ได้แก่

ไอโซเลท 106 และ 102(2) โคโลนีมีสีขาว เจริญบนนูนขึ้นมาผิวอาหารแบบ raised ขอบและผิวหน้าโคโลนีเรียบ (entire); เซลล์สีใส ทรงกระบอก (oblong และ bacilliform) เกิดการ budding มากกว่า 1 ตำแหน่ง ทำให้เห็นคล้ายการแตกกิ่งก้าน



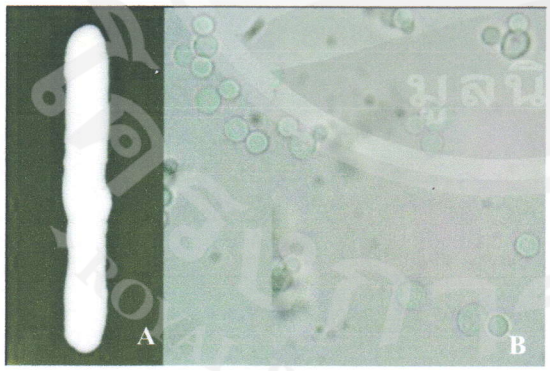
กลุ่ม 19 ได้แก่

ไอโซเลท 194 และ 199 โคโลนีมีสีขาวครีม ผิวหน้ามันวาวเจริญนูนขึ้นมาผิวอาหารแบบ flat ขอบและผิวหน้าโคโลนีเรียบ; เซลล์สีใส ทรงกลม (globose) ทรงกระบอก (oblongf) และคล้ายผลมะนาว (lemon shape)



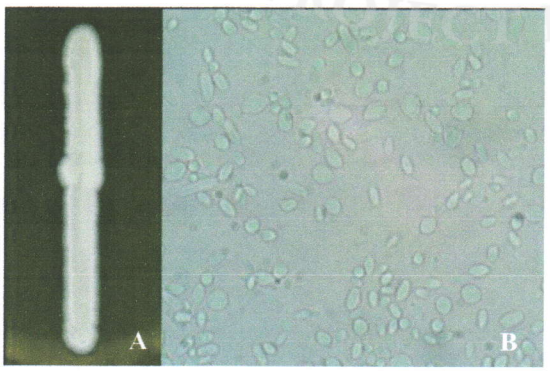
กลุ่ม 20 ได้แก่

ไอโซเลท 4, 114 และ 116 โคโลนีมีสีขาวขุ่น เจริญนูนขึ้นมาผิวอาหารแบบ low convex ผิวโคโลนีเรียบ ขอบหยักเล็กน้อย (nodulate); เซลล์สีใส ทรงกระบอก (oblong) ปลายโค้งมน หรือทรงรี (ellipsoid)



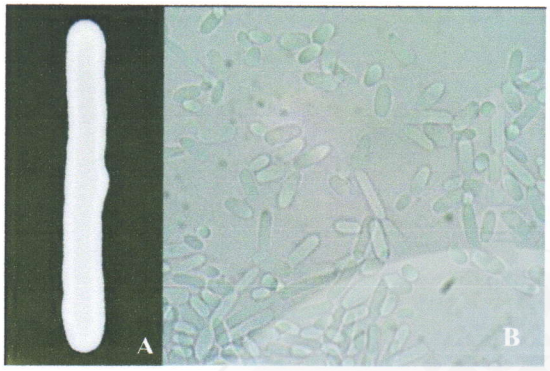
กลุ่ม 21 ได้แก่

ไอโซเลท 8(2), 181 และ 184 โคโลนีมีสีขาว เนื้อสัมผัสเยิ้ม มันวาวเล็กน้อย เจริญนูนขึ้นมาผิวอาหารแบบ low convex ขอบและผิวโคโลนีเรียบ (entire); เซลล์สีใส ทรงกลม (globose) มีการ budding มากกว่า 1 ตำแหน่ง



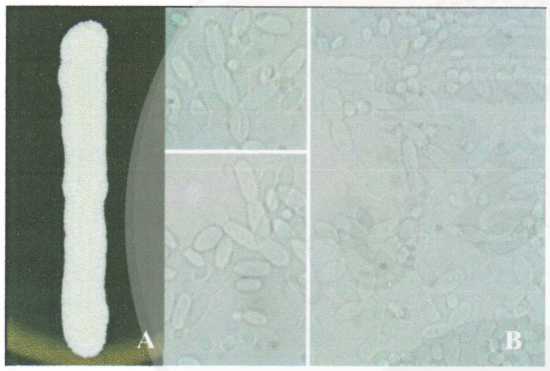
กลุ่ม 22 ได้แก่

ไอโซเลท 98, 103 และ 188 โคโลนีมีสีขาวขุ่น เนื้อด้าน เจริญนูนขึ้นมาผิวอาหารแบบ raised ผิวหน้าและขอบโคโลนีหยักเล็กน้อย (nodulate); เซลล์สีใส รูปไข่ (ovoid) หรือรี (ellipsoid)



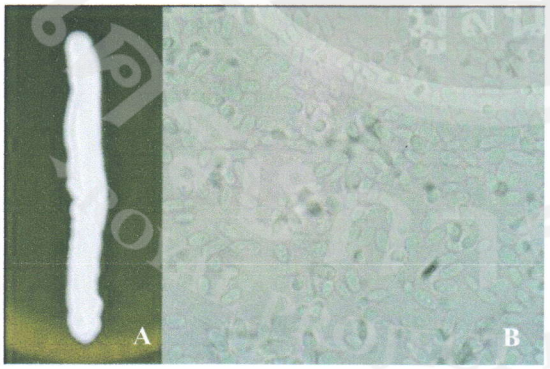
กลุ่ม 23 ได้แก่

ไอโซเลท 6, 97, 104 และ 108 โคโลนีมีสีขาว เจริญนูนขึ้นมาผิวอาหารแบบ raised ขอบและผิวหน้าโคโลนีค่อนข้างเรียบหรือ nodulate เล็กน้อย; เซลล์สีใส ทรงกระบอก (oblong) ปลายมน และรูปไข่ (ovoid) หรือรี (ellipsoid)



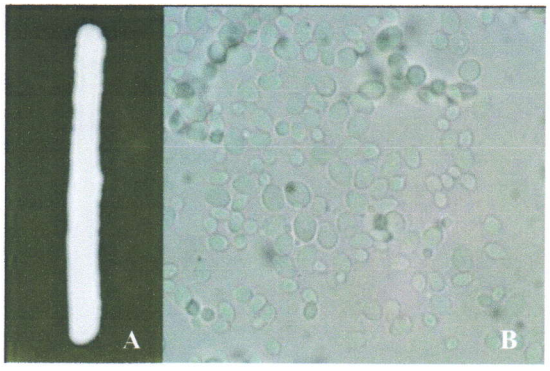
กลุ่ม 24 ได้แก่

ไอโซเลท 13, 65, 69 และ 107 โคโลนีมีสีขาวอมเนื้อสัมผัสด้าน เจริญนูนขึ้นมาผิวอาหารแบบ effuse ขอบและผิวหน้าโคโลนีเรียบ (entire) หรือหยักเล็กน้อย (nodulate); เซลล์สีใส ทรงกระบอก (oblong) และทรงรี (ellipsoid) เกิด budding มากกว่า 1 ตำแหน่ง และสปอร์ต่อกันเป็นสายสั้นๆ



กลุ่ม 25 ได้แก่

ไอโซเลท 113, 165, 201 และ 203โคโลนีมีสีขาวครีม ผิวหน้าเป็นมันวาว เจริญนูนขึ้นมาผิวอาหารแบบ flat ขอบและผิวหน้าโคโลนีเรียบ (entire); เซลล์สีใส ทรงกระบอก (oblong) สั้น หรือรูปไข่ (ovoid)

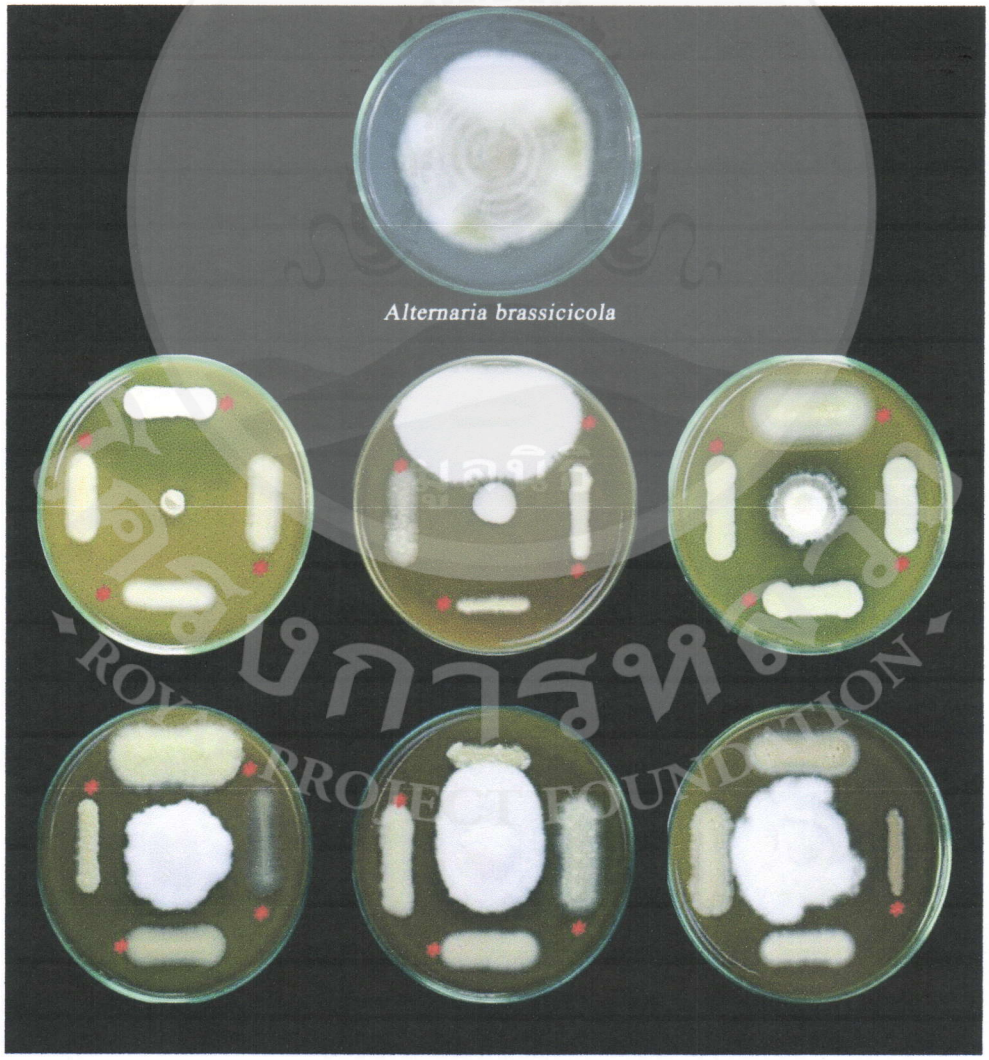


กลุ่ม 26 ได้แก่

ไอโซเลท 94, 128, 156, 172, 173, 190 และ 200 โคโลนีมีสีขาว ผิวหน้าเป็นมันวาว เจริญ ผิวอาหารแบบ flat ขอบแลผิวหน้าโคโลนีเรียบ (entire); เซลล์สีใส ทรงกลม (globose) และรูปไข่ (ovoid)

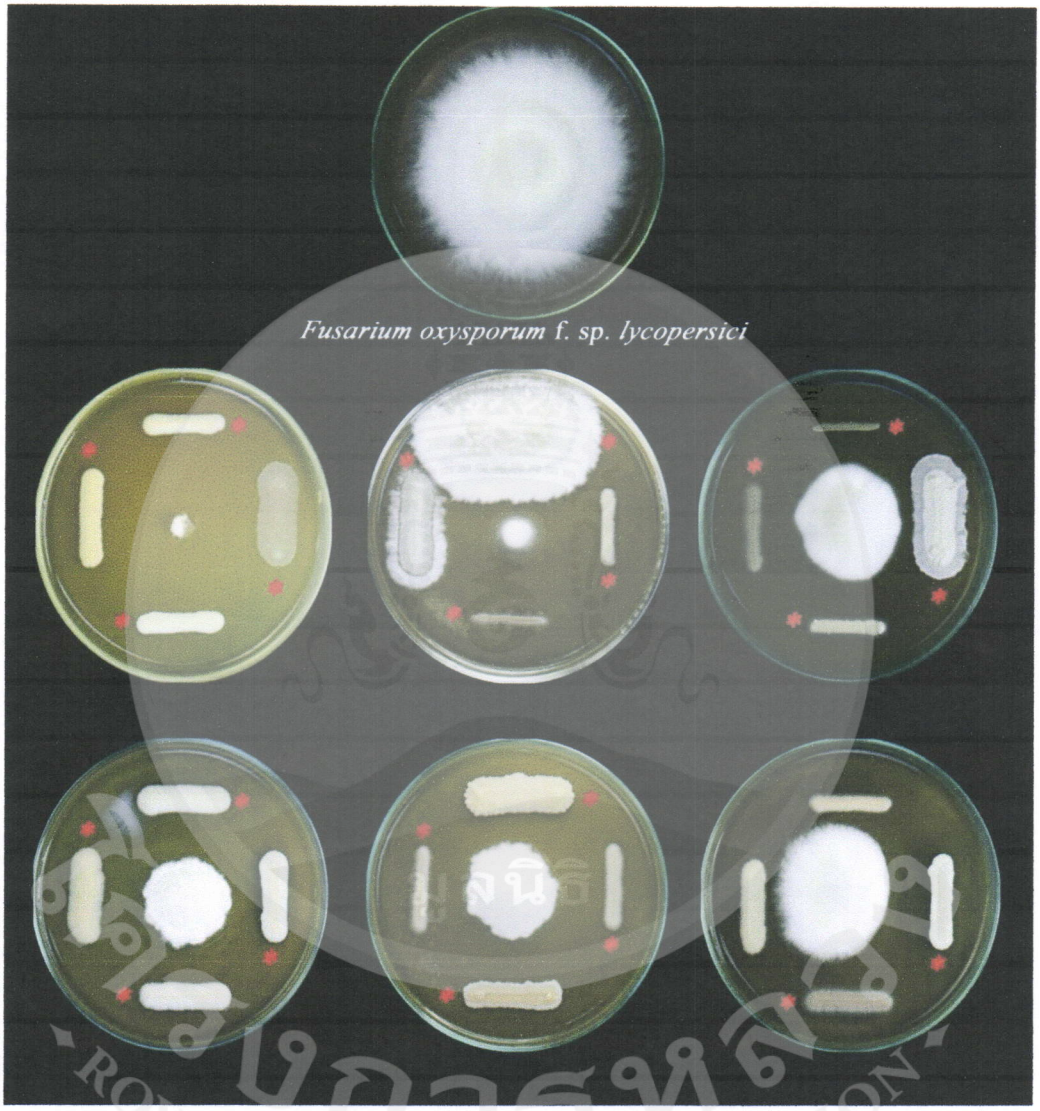
4.3 การทดสอบประสิทธิภาพของยีสต์ปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราสาเหตุโรคพืช

จากการนำเชื้อยีสต์ที่แยกได้จากผิวผลไม้ในข้อ 4.2 รวม 203 ไอโซเลทมาคัดเลือกเพื่อหาไอโซเลทที่แสดงผลการยับยั้งการเจริญเจริญเติบโตของเชื้อราสาเหตุโรคพืช ได้แก่ *Alternaria brassicicola*, *Colletotrichum capsici*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Phytophthora* sp., *Pythium* sp. และ *Sclerotium* sp. (ภาพที่ 4.8–4.11)



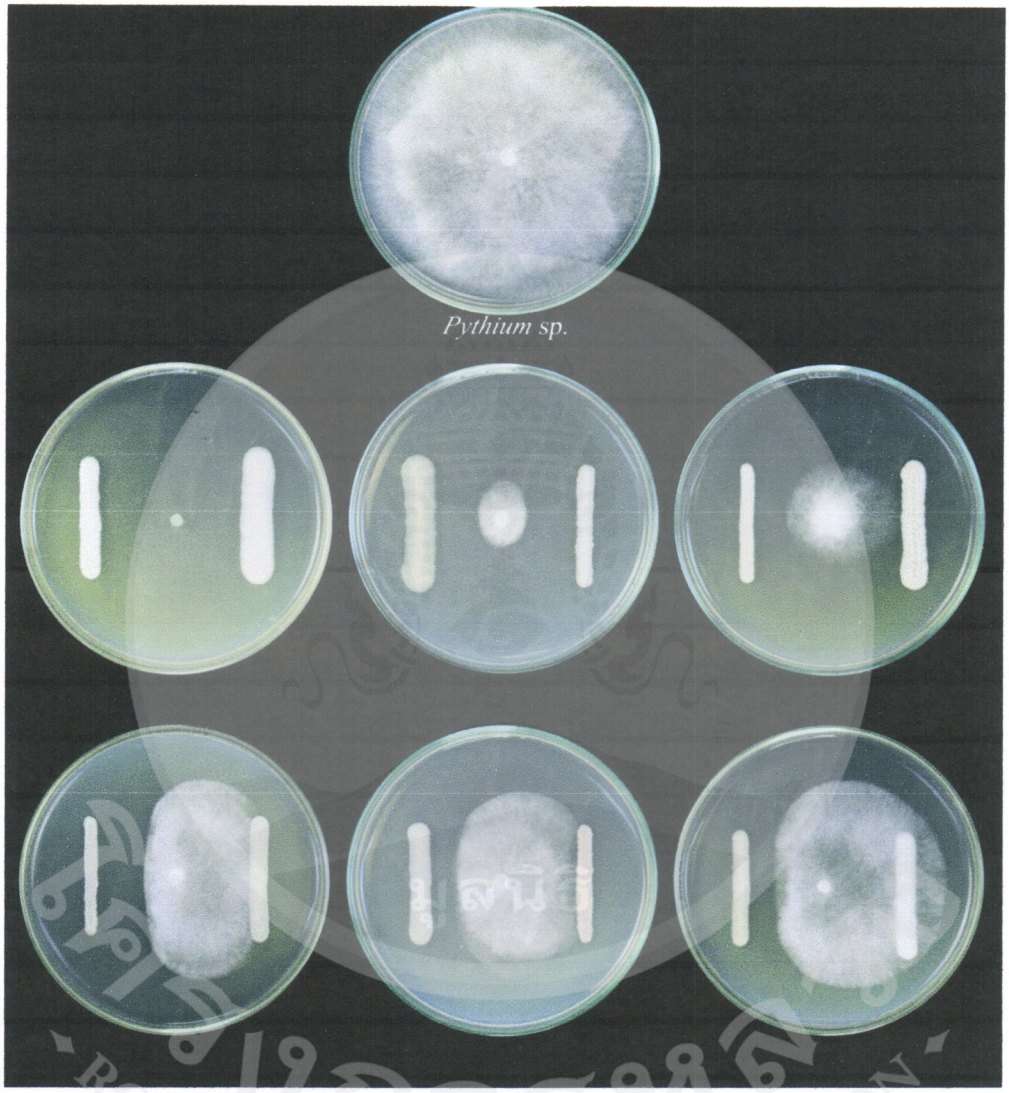
ภาพที่ 4.8 การคัดเลือกเบื้องต้นของเชื้อยีสต์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Alternaria brassicicola* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ YMA

หมายเหตุ * หมายถึงไอโซเลทของเชื้อยีสต์ที่คัดเลือกเพื่อใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราในขั้นต่อไป



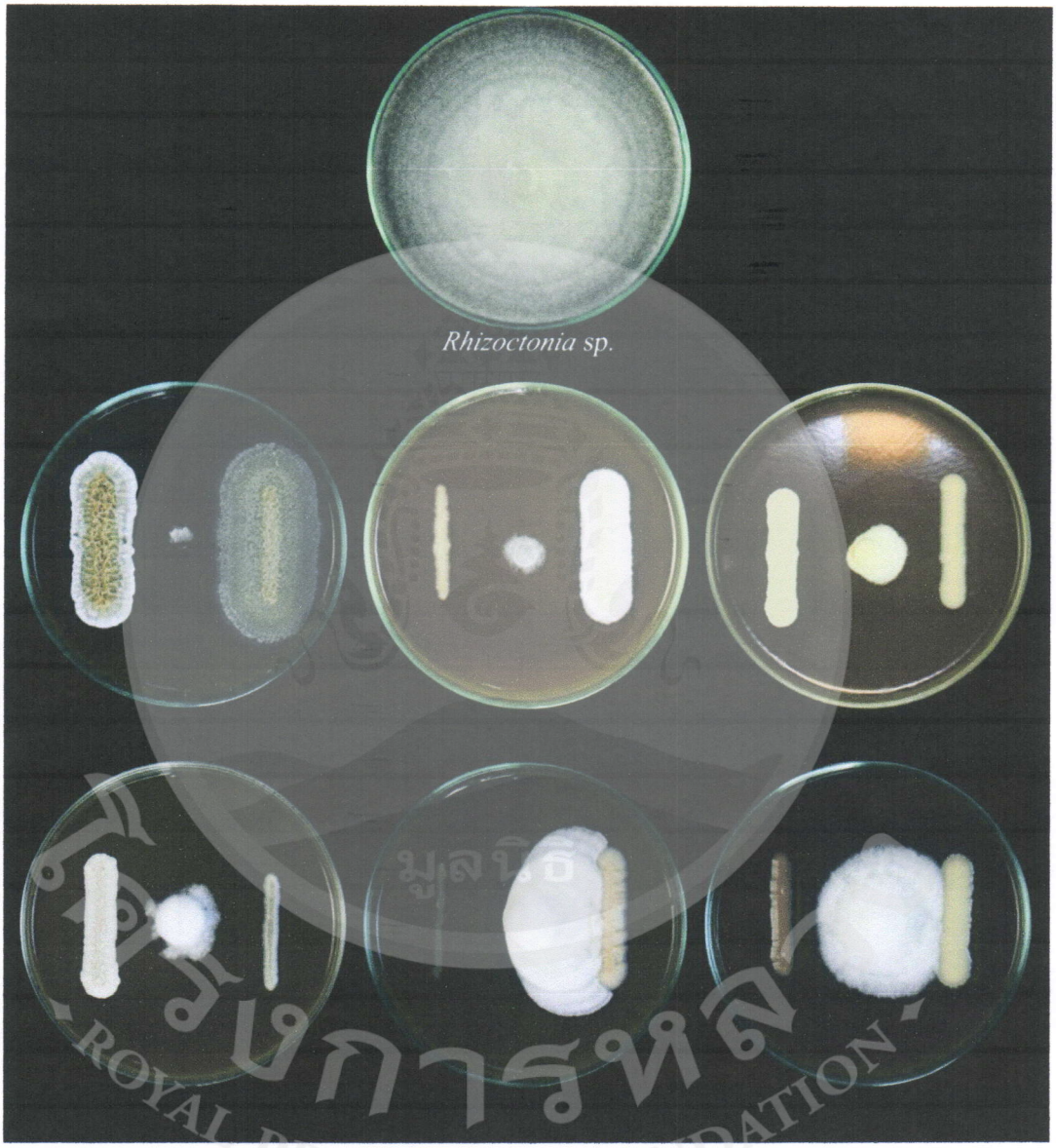
ภาพที่ 4.9 การคัดเลือกเบื้องต้นของเชื้อยีสต์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ YMA

หมายเหตุ * หมายถึงไอโซเลทของเชื้อยีสต์ที่คัดเลือกเพื่อใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราในขั้นต่อไป



ภาพที่ 4.10 การคัดเลือกเบื้องต้นของเชื้อยีสต์ปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pythium* sp. บนอาหาร MEA

ROYAL PROJECT FOUNDATION



ภาพที่ 4.11 การคัดเลือกเบื้องต้นของเชื้อยีสต์ปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Rhizoctonia* sp. บนอาหาร YMA

ในเบื้องต้นพบว่าเชื้อยีสต์จำนวน 14 ไอโซเลท ได้แก่ 12, 15, 16, 20, 62, 77A, 77B, 132, 149, 154, 157, 158, 191, และ 192 (ตารางที่ 4.2) แสดงปฏิกิริยายับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรคพืชข้างต้นชัดเจน โดยพบว่าบางไอโซเลททำให้โคโลนีของเชื้อราโค้งหนีออกจากโคโลนีของยีสต์ บางไอโซเลททำให้โคโลนีของเชื้อรามีขนาดเล็กลง สีเส้นใยเปลี่ยนเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม จากนั้นจึงนำเชื้อยีสต์ปฏิปักษ์ 14 ไอโซเลท ที่คัดเลือกไว้ มาทดสอบประสิทธิภาพในการ

ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราสาเหตุโรคพืชกลุ่มเดิมอีกครั้งด้วยวิธี Dual culture method พร้อมวัดเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง โดยใช้จำนวนไอโซเลทละ 5 ซ้ำ พบว่าเชื้อยีสต์ไอโซเลท 20 และ15 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโต *A. brasicicola* ได้ดีที่สุด (ภาพที่ 4.12) โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 96.193% และ 94.287% ตามลำดับ อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบทางสถิติพบว่าทั้งสองไอโซเลทมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งไม่แตกต่างจากไอโซเลท 62, 191, 154, 192, 16, 158, 77A และ132 ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ยับยั้ง 93.33%, 85.71%, 84.76%, 84.76%, 83.81%, 81.90%, 78.10% และ 75.24% ตามลำดับ (ตารางที่ 4.2)

การทดสอบยีสต์ปฏิปักษ์กับเชื้อรา *Colletotrichum capsici* พบว่ายีสต์สี่ไอโซเลทมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราดีที่สุดคือไอโซเลท 192 ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 82.50% (ภาพที่ 4.13) โดยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ คือไอโซเลท 15, 132 และ 12 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 80.00%, 75.83% และ 71.68% ตามลำดับ (ตารางที่ 4.2) ในส่วนของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* พบว่าห้าไอโซเลทของยีสต์มีประสิทธิภาพในการเป็นปฏิปักษ์อยู่ในระดับปานกลางถึงดี (ภาพที่ 4.14) คือมีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งตั้งแต่ 50–75 % ได้แก่ไอโซเลท 132, 192, 158, 191 และ 154 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 71.88%, 69.79% 65.63%, 62.50% และ 59.38% ตามลำดับ โดยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 4.2)

การทดสอบยีสต์ปฏิปักษ์กับเชื้อรา *Phytophthora* sp. พบว่ายีสต์ไอโซเลท 12, 157 และ 15 ที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อราอยู่ในระดับดีถึงดีมาก (ภาพที่ 4.15) คือมีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งตั้งแต่ 70 % ขึ้นไป 81.94%, 70.14% และ 69.45% ตามลำดับ โดยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบทางสถิติพบว่าไอโซเลท 157 และ 15 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งไม่แตกต่างทางสถิติกับไอโซเลท 62, 192, 191 และ 132 ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ยับยั้ง 63.20%, 61.81%, 60.42% และ 59.03% (ตาราง 4.2) ในส่วนของเชื้อรา *Pythium* sp.พบว่าไอโซเลทของยีสต์ส่วนใหญ่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งในระดับดีถึงดีมาก (ภาพที่ 4.16) โดยพบว่าไอโซเลท 77A, 132, 149 และ 154 สามารถยับยั้งได้สูงถึง 100% แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับไปโซเลท 15 ที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 94.33% อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับไอโซเลท 157 ที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 89.36% ส่วนไอโซเลท 77B มีเปอร์เซ็นต์การยังยั้งอยู่ในระดับต่ำมาก คือ 10.64% โดย

แตกต่างจากไอโซเลทอื่นอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 4.2) และเมื่อทดสอบกับเชื้อรา *Sclerotium* sp. พบว่าไอโซเลท 149, 15 และ 12 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งอยู่ในระดับดีมาก (ภาพที่ 4.17) โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 97.50%, 94.167% และ 92.50% ตามลำดับ ซึ่งไอโซเลท 12 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งไม่แตกต่างจากไปโซเลท 62 และ 192 ที่ 78.33% และ 77.50 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.2)

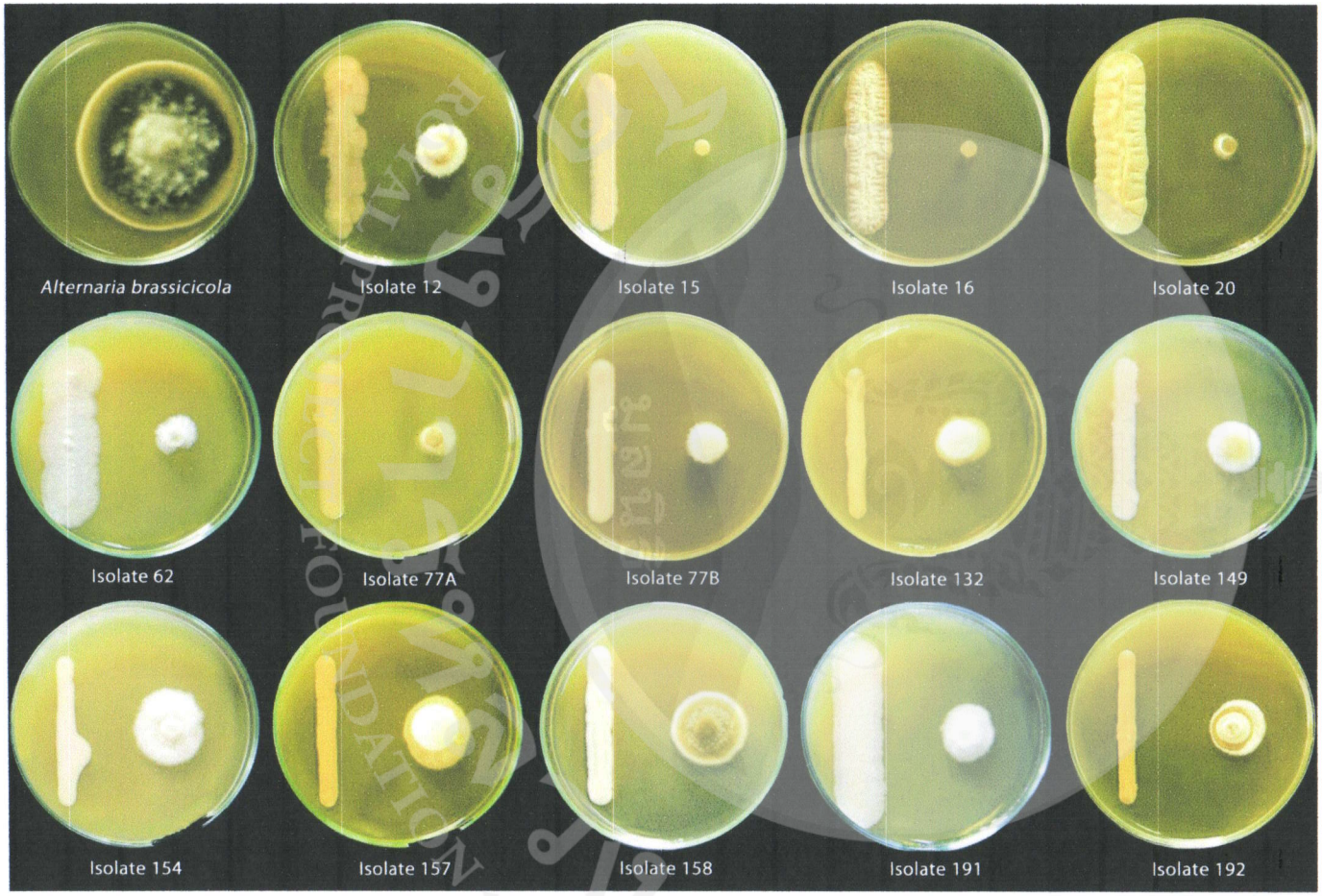
จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อยีสต์ แสดงให้เห็นว่าเชื้อราสาเหตุโรคทั้งหกชนิดมีการตอบสนองต่อยีสต์ปฏิปักษ์แต่ละไอโซเลทแตกต่างกัน สอดคล้องกับการศึกษาของ Saleem *et al.* (2000) ซึ่งพบว่าเชื้อราปฏิปักษ์มีกลไกการเป็นปฏิปักษ์ที่เฉพาะเจาะจงต่อเชื้อราแต่ละชนิดต่างกัน โดยแบ่งปฏิกิริยาการยังยั้งการเจริญของเชื้อราออกเป็นสองแบบคือ โคโลนีเชื้อราโค้งหนีออกจากโคโลนีของเชื้อยีสต์ และมีความหนาแน่นของเส้นใยลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับด้านตรงข้ามและชุดควบคุม ซึ่งเป็นลักษณะเช่นเดียวกับการศึกษาของ Masih *et al.* (2001) ที่ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อยีสต์ *Pichia membranifaciens* ในการยับยั้งเชื้อรา *Botrytis cinerea* ด้วยการทดสอบแบบเดียวกัน และได้รายงานว่า inhibition zone ดังกล่าวเกิดจากการที่ยีสต์สร้างป้องกันกำจัดเชื้อรา (fungicide) แสดงว่าเชื้อยีสต์สร้างสารที่สามารถลดการเจริญของเส้นใยเชื้อราที่ซึมผ่านอาหารเลี้ยงเชื้อได้ ส่วนปฏิกิริยาอีกแบบคือ โคโลนีของเชื้อรายังคงมีรูปร่างกลม สมมาตรปกติ แต่มีขนาดเล็กลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งแสดงว่าเชื้อยีสต์เหล่านั้นสร้างสาร fungicide ในรูปของก๊าซ (volatile) ที่สามารถกระจายและมีผลต่อการเจริญของเชื้อราได้ทุกส่วนของโคโลนี เช่นเดียวกับยีสต์ *Candida sake, Epicoccum nigrum, Pantoea agglomerans* และ *Pichia anomala* (Höfte *et al.*, 2004) ดังนั้นจึงควรทำการศึกษาสารที่เชื้อยีสต์สร้างขึ้น เพื่อความชัดเจนและสามารถพัฒนาการใช้ยีสต์ในการควบคุมโรคพืชโดยที่มีประสิทธิภาพต่อไป ดังเช่นการค้นพบสารที่สร้างโดยเชื้อยีสต์ *Candica oleophola* คือ เอ็นไซม์ exo-β-1, 3-glucanase และ chitinase ซึ่งต่อมาสามารถพัฒนายีสต์ดังกล่าวเป็นผลิตภัณฑ์การค้าชื่อว่า Aspire เพื่อใช้ในการควบคุมโรคเน่ากลังการเก็บเกี่ยวของพืชตระกูลส้มได้ (Arras and Agabbio, 2000; Bar-Shimmon *et al.*, 2004)

ตารางที่ 4.2 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของยีสต์ปฏิปักษ์ 14 ไอโซเลท ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราสาเหตุโรคพืช

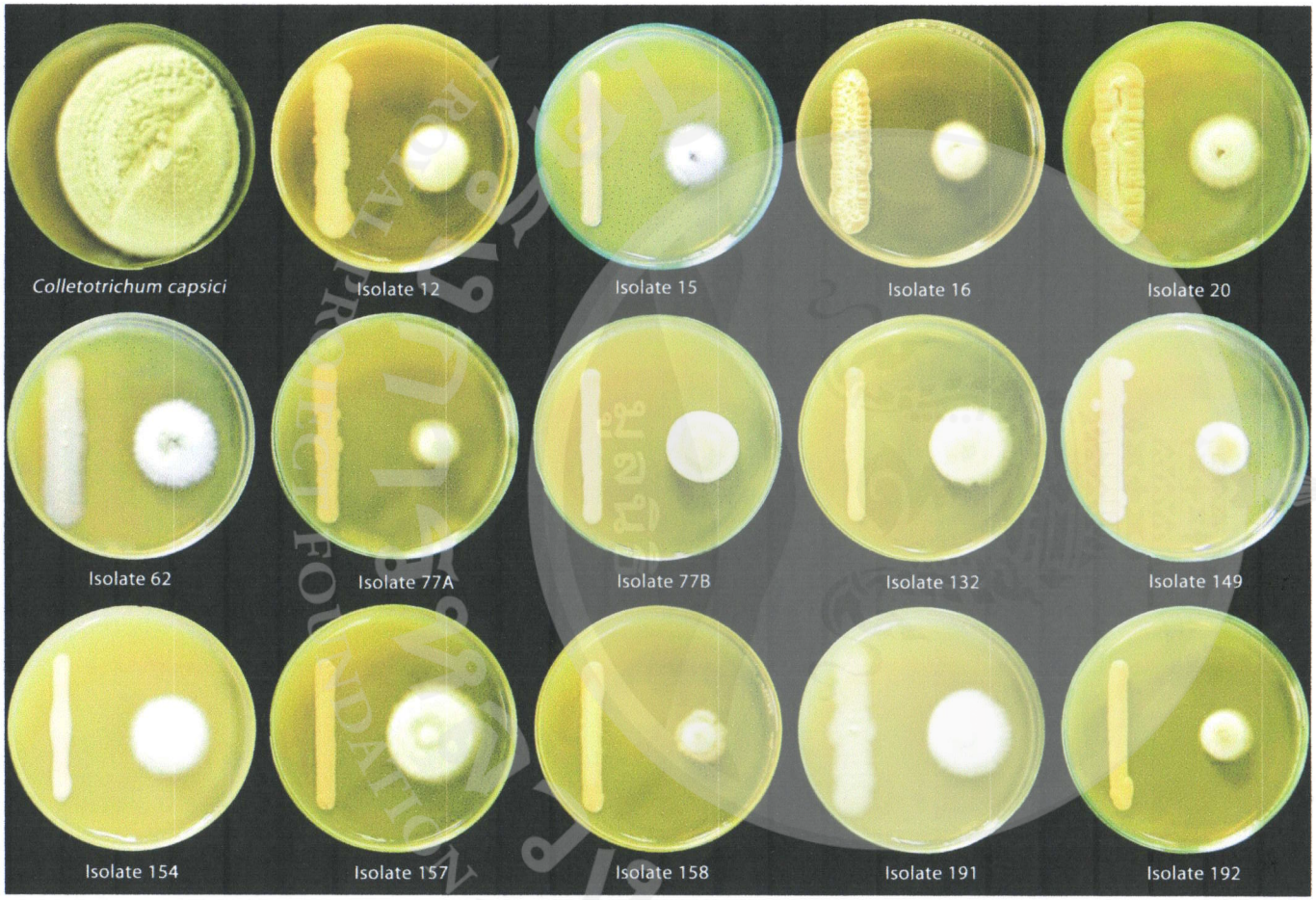
ลำดับ	ยีสต์ปฏิปักษ์ (ไอโซเลท)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา [1]					
		Alternaria brassicicola	*Colletotrichum capsicum*	*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*	*Phytophthora* sp.	*Pythium* sp.	*Sclerotium* sp.
1	12	49.43e [2]	71.67abcd	51.04bcd	81.94a	77.31c	92.50ab
2	15	94.29a	80.00ab	44.79def	69.45ab	94.33ab	94.17a
3	16	83.76abcd	70.00bcd	29.17g	6.25e	27.66e	60.00d
4	20	96.19a	65.00cd	32.29fg	4.17e	29.79e	70.00cd
5	62	93.33ab	64.17de	42.71defg	63.20bc	54.61d	78.33bc
6	77	78.10abcd	67.50cd	33.34efg	22.92d	100.00a	8.33f
7	77*	62.86de	53.33e	36.46efg	0.00e	10.64f	42.50e
8	132	75.24abcd	75.83abc	71.88a	59.03bc	100.00a	74:17cd
9	149	72.38abcd	63.33de	43.75efg	56.25c	100.00a	97.50a
10	154	84.76abc	62.50de	59.38abc	31.25d	100.00a	34.17e
11	157	71.43cd	64.17de	46.88cde	70.14ab	89.36b	74.17cd
12	158	81.90abcd	70.83bcd	65.63a	54.86c	60.99d	68.33cd
13	191	85.71abc	70.00bcd	62.50ab	60.42bc	56.03d	69.17cd
14	192	84.76abc	82.50a	69.79a	61.80bc	58.86d	77.50bc
CV%		16.02	9.51	16.84	16.62	7.87	13.51
$LSD_{0.0}$		21.32	10.91	13.87	12.58	9.02	15.19

[1] ค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ

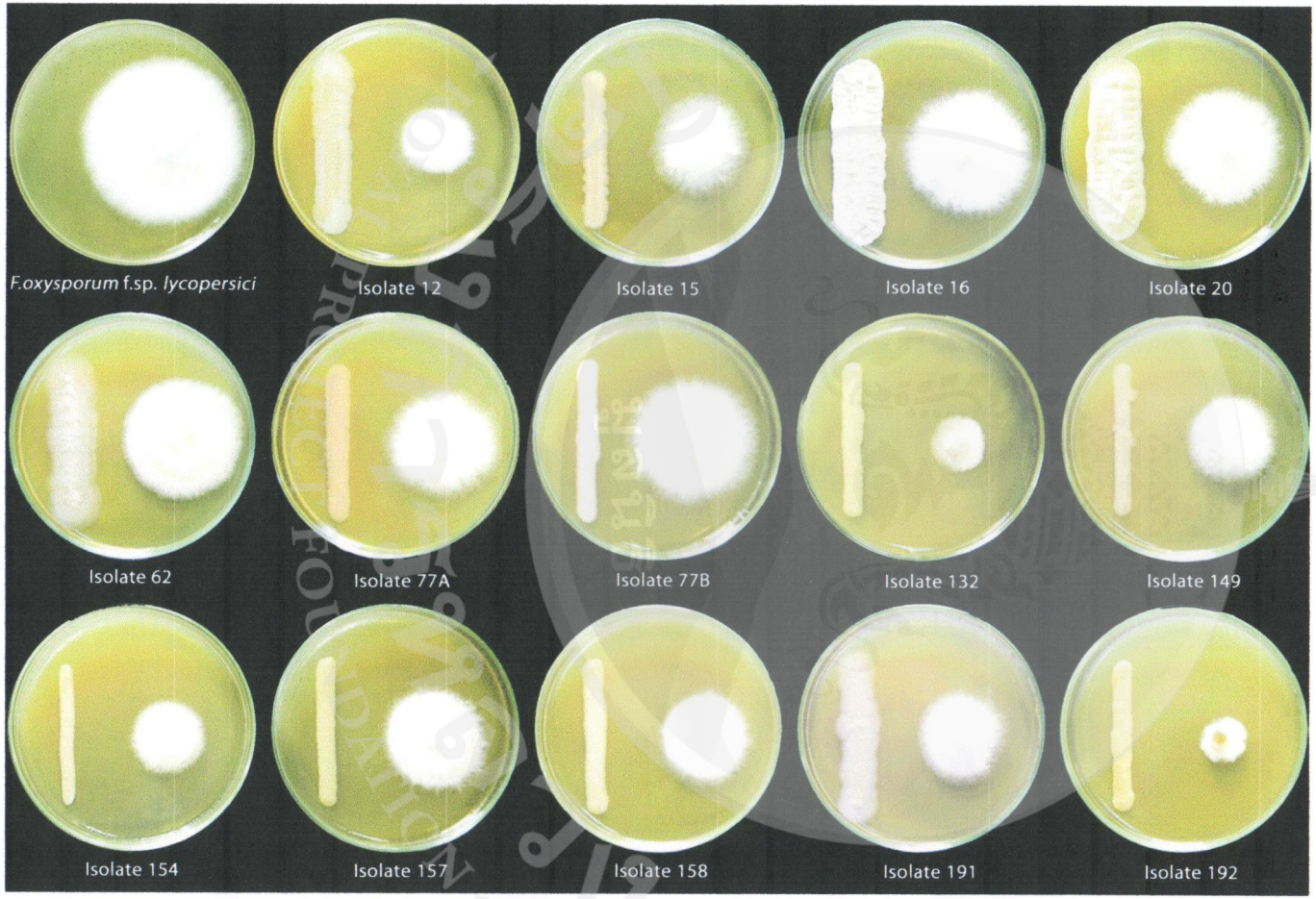
[2] ตัวอักษรเหมือนกันใน column เดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยวิธี CRD (Completely Randomized Design) ที่ความเชื่อมั่น 95% เปรียบเทียบโดยวิธี LSD (Least Significant Difference)



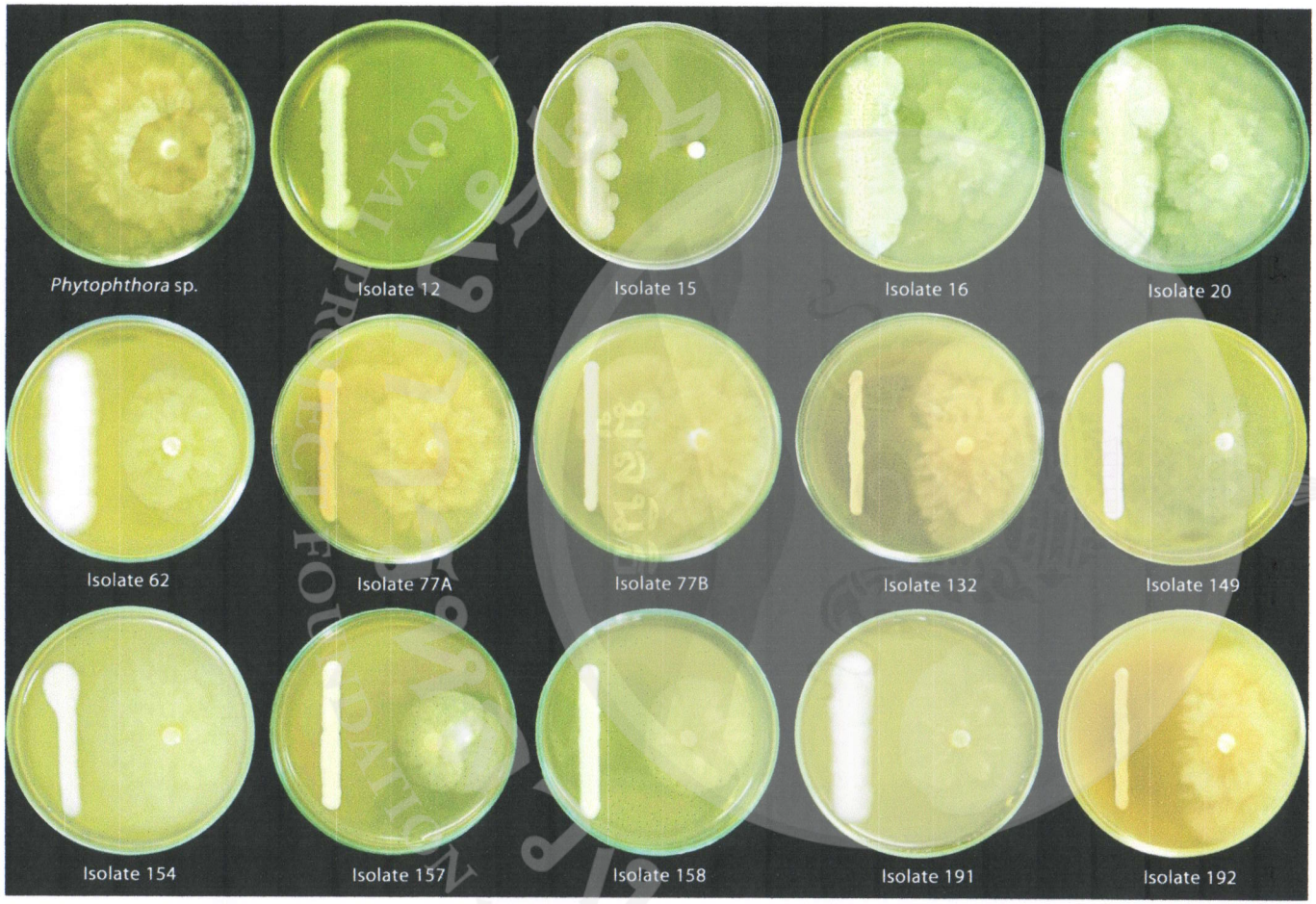
ภาพที่ 4.12 การทดสอบประสิทธิภาพของยีสต์ปฏิปักษ์ จำนวน 14 ไอโซเลท โดยวิธี dual culture บนอาหาร YMA ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Alternaria brassicicola* หลังการวางเชื้อ 14 วัน



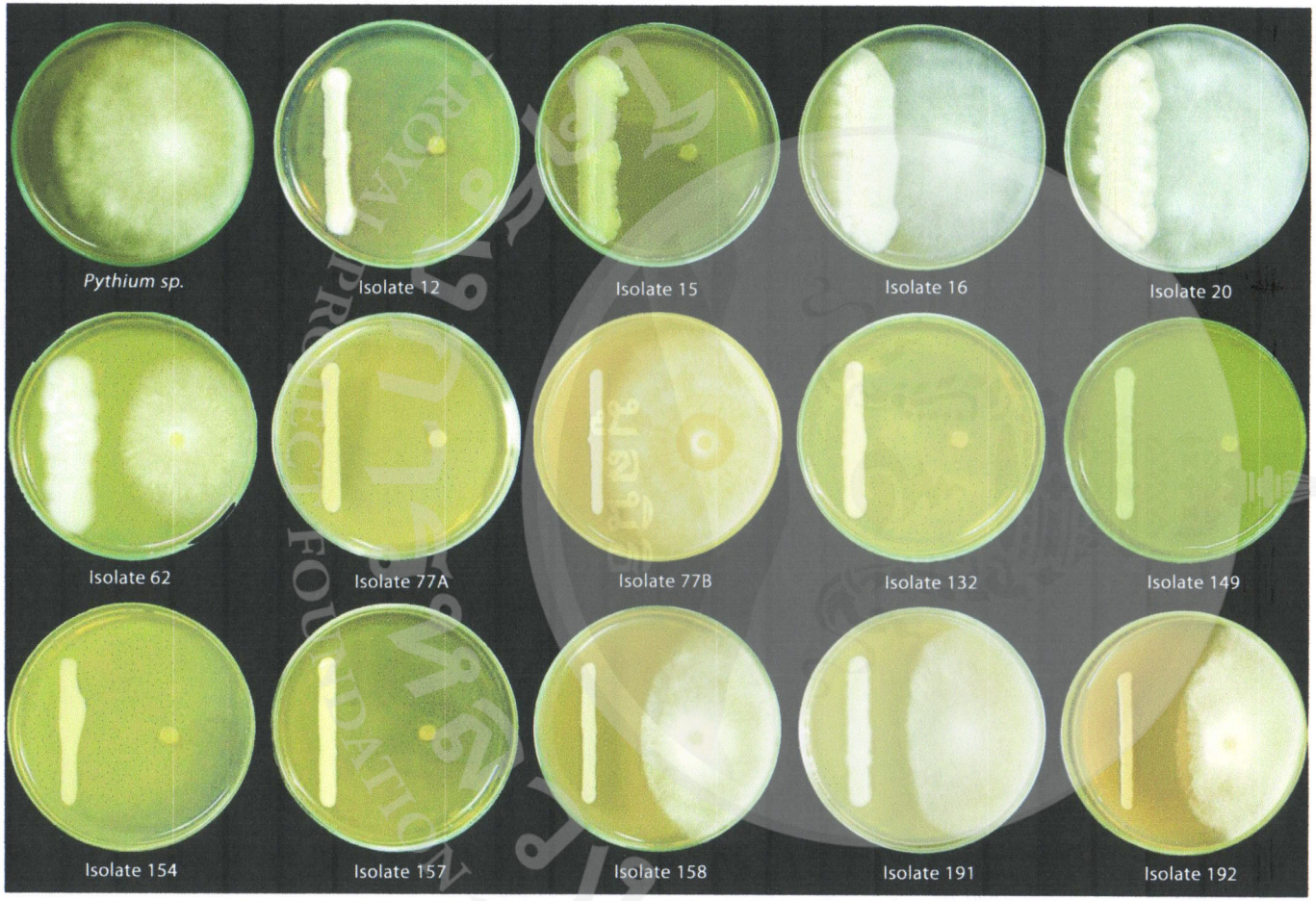
ภาพที่ 4.13 การทดสอบประสิทธิภาพของยีสต์ปฏิปักษ์ จำนวน 14 ไอโซเลท โดยวิธี dual culture บนอาหาร YMA ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum capsici* หลังการวางเชื้อ 14 วัน



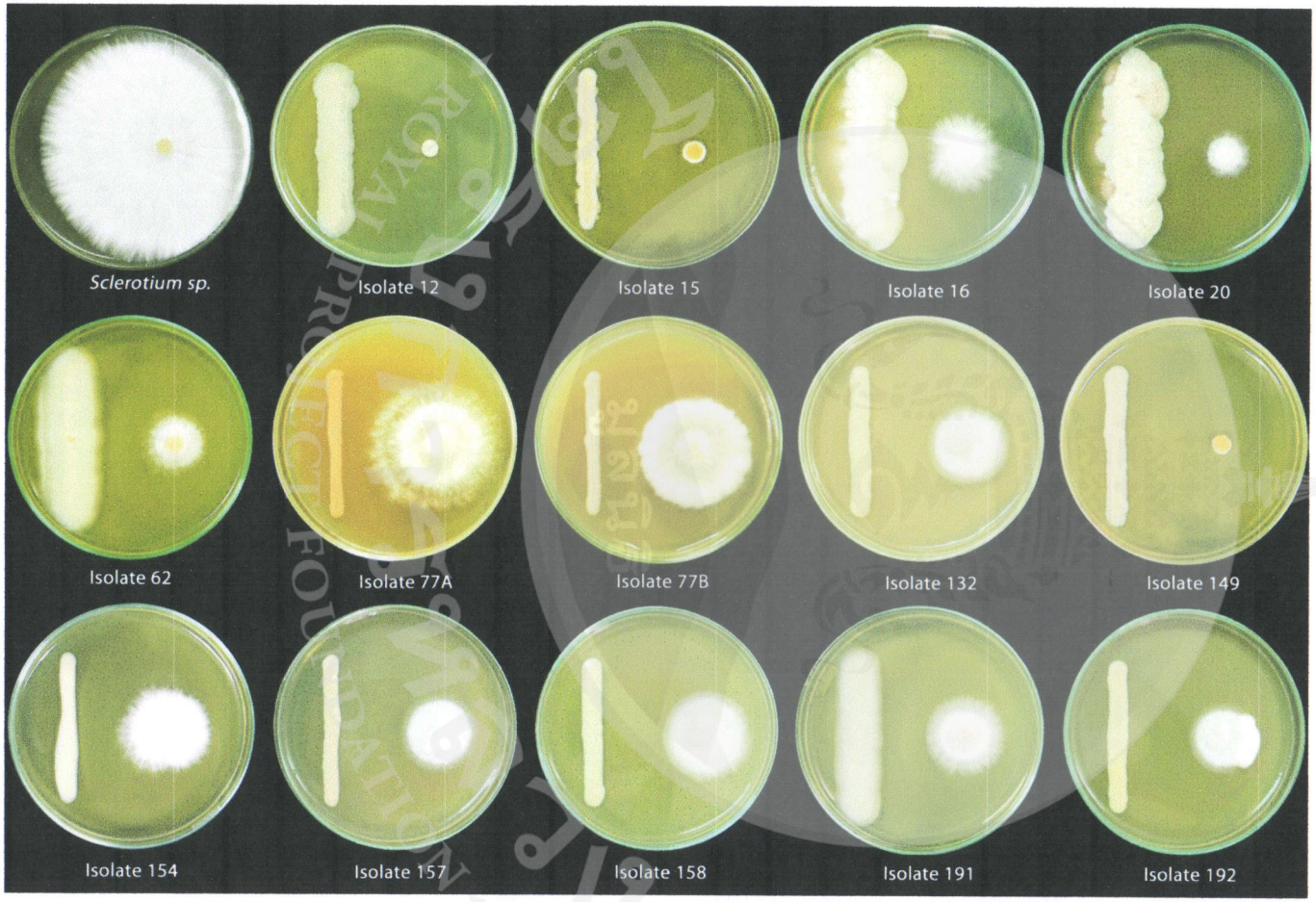
ภาพที่ 4.13 การทดสอบประสิทธิภาพของยีสต์ปฏิปักษ์ จำนวน 14 ไอโซเลท โดยวิธี dual culture บนอาหาร YMA ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* หลังการวางเชื้อ 14 วัน



ภาพที่ 4.14 การทดสอบประสิทธิภาพของยีสต์ปฏิปักษ์ จำนวน 14 ไอโซเลท โดยวิธี dual culture บนอาหาร YMA ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Phytophrhora* sp. หลังการวางเชื้อ 5 วัน



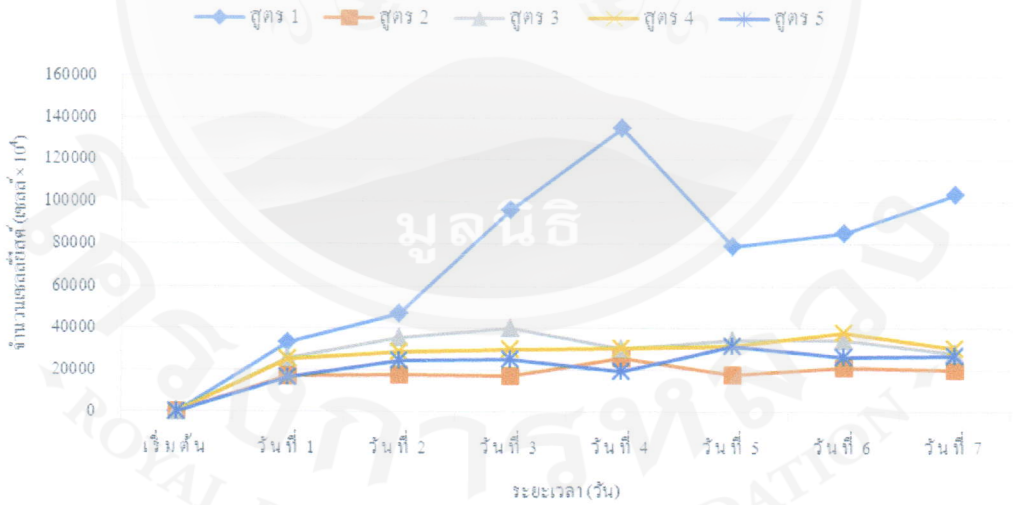
ภาพที่ 4.15 การทดสอบประสิทธิภาพของยีสต์ปฏิปักษ์ จำนวน 14 ไอโซเลท โดยวิธี dual culture บนอาหาร YMA ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Pythium* sp. หลังการวางเชื้อ 5 วัน



ภาพที่ 4.16 การทดสอบประสิทธิภาพของยีสต์ปฏิปักษ์ จำนวน 14 ไอโซเลท โดยวิธี dual culture บนอาหาร YMA ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Sclerotium* sp. หลังการวางเชื้อ 5 วัน

4.4 การศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์ปฏิปักษ์ที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มปริมาณยีสต์ในสภาพห้องปฏิบัติการ

จากการทดลองเลี้ยงเชื้อยีสต์ปฏิปักษ์ไอโซเลท 12, 77, 132, 149 และ 154 ในอาหารแต่ละชนิด ได้แก่ สูตร 1 YPD สูตร 2 กากน้ำตาลผสมข้าว สูตร 3 กากน้ำตาลผสมข้าวโพด สูตร 4 กากน้ำตาลผสมเศษผักละผลไม้ และสูตร 5 กากน้ำตาลผสมรำข้าว ด้วยใช้ความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์เริ่มต้นในช่วง 4.5–6.5 × 105 cell/ml และทำการการวัดการเพิ่มจำนวนเซลล์ของเชื้อยีสต์ปฏิปักษ์ทุกวัน จนครบ 7 วัน พบว่าไอโซเลท 12 สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดในอาหารสูตร 1 แตกต่างจากอาหารสูตรอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ (ภาพที่ 4.17 และตารางที่ 4.3) โดยพบว่ามีจำนวนเซลล์มากที่สุดในวันที่ 4 ของการทดลอง และลดต่ำลงหลังจากนั้น



ภาพที่ 4.17 กราฟแสดงการเพิ่มจำนวนของเชื้อยีสต์ไอโซเลท 12 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 สูตร

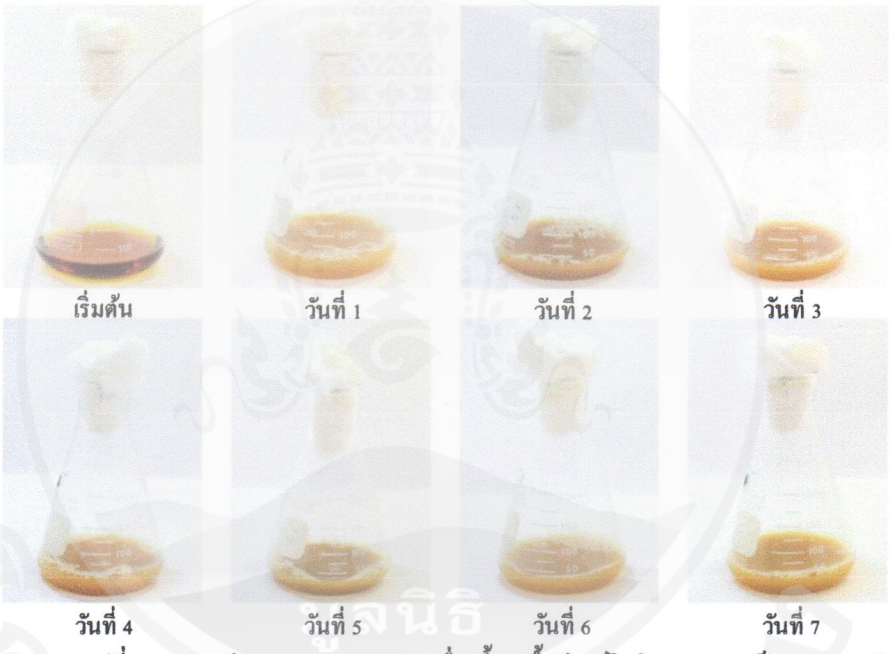
ตารางที่ 4.3 การเพิ่มจำนวนของเซลล์เชื้อยีสต์ไอโซเลท 12 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 สูตร เป็นเวลา 7 วัน

สูตรอาหาร	ปริมาณยีสต์ เริ่มแรก ($\times 10^4$)	ปริมาณยีสต์ วันที่ 1 ($\times 10^6$)	ปริมาณยีสต์ วันที่ 2 ($\times 10^6$)	ปริมาณยีสต์ วันที่ 3 ($\times 10^6$)	ปริมาณยีสต์ วันที่ 4 ($\times 10^6$)	ปริมาณยีสต์ วันที่ 5 ($\times 10^6$)	ปริมาณยีสต์ วันที่ 6 ($\times 10^6$)	ปริมาณยีสต์ วันที่ 7 ($\times 10^6$)	CV%
1 (YPD)	48.50Af	332.56Ae	469.22Ae	963.25Abc	1354.70Aa	785.56Ad	852.81Acd	1035.80Ab	11.42
2 (ข้าว)	53.00Ae	171.33Cd	180.22Ecd	171.58Cd	258.25BCa	178.14Dcd	213.67Cb	202.33Cbc	9.75
3 (ข้าวโพด)	58.00Ae	258.39Bd	357.25Bab	404.58Ba	302.33Bbcd	345.97Babc	345.78Babc	278.58BCcd	15.07
4 (ผัก ผลไม้)	53.20Ad	253.19Bc	287.83Cbc	300.94BCb	306.08Bb	313.83Cb	378.19Ba	302.92Bb	7.62
5 (รำข้าว)	54.25Ae	166.25Cd	245.83Db	254.03BCb	195.00Cc	315.25Ca	262.83Cb	270.75BCb	6.72
CV%	15.61	8.94	3.32	22.53	10.01	4.31	9.02	11.36	

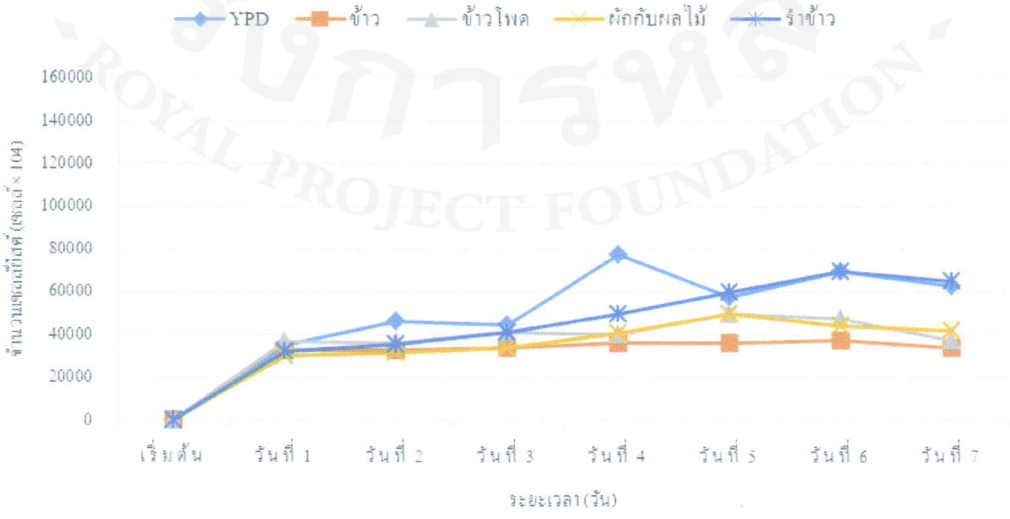
A–E: ตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยวิธี CRD (Completely Randomized Design) ที่ความเชื่อมั่น 95% เปรียบเทียบโดยวิธี LSD (Least Significant Difference)

a–f: ตัวอักษรเหมือนกันในแถวเดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยวิธี CRD (Completely Randomized Design) ที่ความเชื่อมั่น 95% เปรียบเทียบโดยวิธี LSD (Least Significant Difference)

ไอโซเลท 77 สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารทั้ง 5 สูตรโดยไม่แตกต่าง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่พบว่ามีจำนวนเซลล์มากที่สุดในวันที่ 4 ของการทดลองเมื่อเลี้ยงในอาหาร YPD (ภาพที่ 4.18, 4.19 และตารางที่ 4.4)



ภาพที่ 4.18 การเปลี่ยนแปลงสีของอาหารสูตร 1 เมื่อเลี้ยงเชื้อยีสต์ไอโซเลท 77 เป็นเวลา 7 วัน



ภาพที่ 4.19 กราฟแสดงการเพิ่มจำนวนของเชื้อยีสต์ไอโซเลท 77 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 สูตร

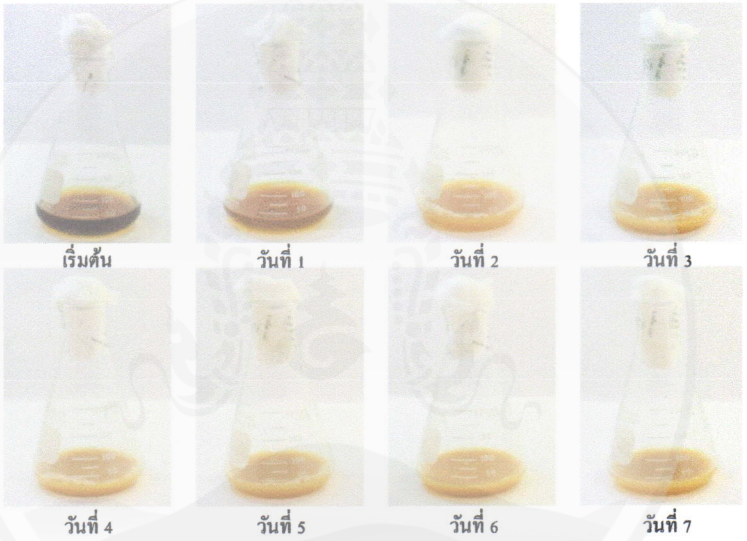
ตารางที่ 4.4 การเพิ่มจำนวนของเซลล์เชื้อยีสต์ไอโซเลท 77 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 สูตร เป็นเวลา 7 วัน

สูตรอาหาร	ปริมาณยีสต์ เริ่มแรก ($\times 10^4$)	ปริมาณยีสต์ วันที่ 1 ($\times 10^6$)	ปริมาณยีสต์ วันที่ 2 ($\times 10^6$)	ปริมาณยีสต์ วันที่ 3 ($\times 10^6$)	ปริมาณยีสต์ วันที่ 4 ($\times 10^6$)	ปริมาณยีสต์ วันที่ 5 ($\times 10^6$)	ปริมาณยีสต์ วันที่ 6 ($\times 10^6$)	ปริมาณยีสต์ วันที่ 7 ($\times 10^6$)	CV%
1 (YPD)	58.67Ag	347.17ABf	459.33Ae	445.50Ae	771.17Aa	572.75Ad	695.25Ab	624.83Ac	3.00
2 (ข้าว)	58.67Ad	323.83BCc	324.67CDc	336.00Bbc	358.42Dab	362.33Caa	374.17Da	335.42Dbc	4.45
3 (ข้าวโพด)	57.33Ae	364.08Ad	359.58Bd	412.33Ac	401.83Cc	495.00Ba	473.67Bb	373.00Cd	2.89
4 (ผัก ผลไม้)	55.67Af	299.58Ce	317.83Dde	339.75Bd	403.17Cc	497.42Ba	441.92Cb	416.67Bbc	4.63
5 (รำข้าว)	53.00Ag	318.92BCf	353.00BCf	411.17Ae	494.08Bd	598.42Ac	694.58Aa	646.92Ab	5.32
CV%	10.33	5.20	4.71	6.02	3.93	2.90	2.30	3.32	

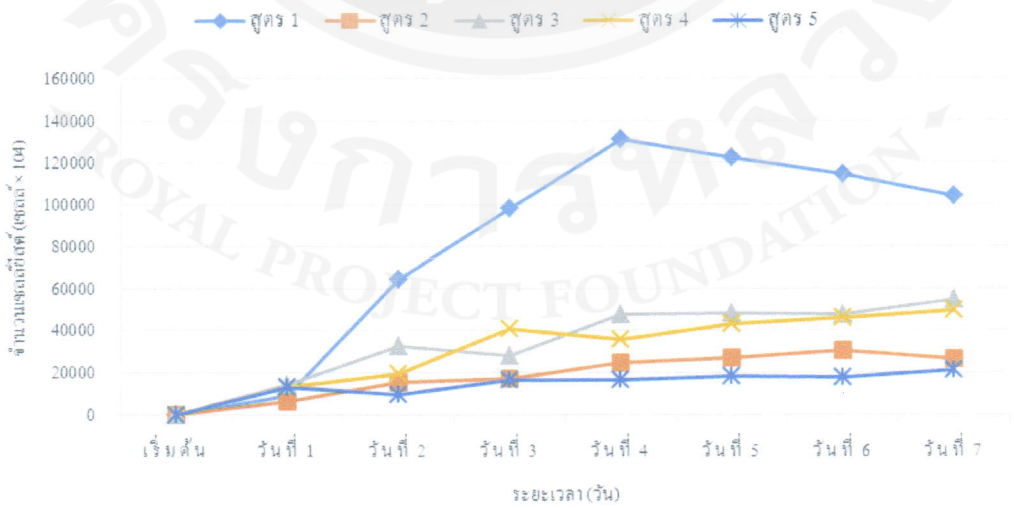
A–E: ตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยวิธี CRD (Completely Randomized Design) ที่ความเชื่อมั่น 95% เปรียบเทียบโดยวิธี LSD (Least Significant Difference)

a–f: ตัวอักษรเหมือนกันในแถวเดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยวิธี CRD (Completely Randomized Design) ที่ความเชื่อมั่น 95% เปรียบเทียบโดยวิธี LSD (Least Significant Difference)

ไอโซเลท 132 สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดในอาหารสูตร 1 แตกต่างจากอาหารสูตรอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ (ภาพที่ 4.20, 4.21 และตารางที่ 4.5) โดยพบว่ามีจำนวนเซลล์มากที่สุดในวันที่ 4 ของการทดลอง และลดต่ำลงเล็กน้อยหลังจากนั้น



ภาพที่ 4.20 การเปลี่ยนแปลงสีของอาหารสูตร 1 เมื่อเลี้ยงเชื้อยีสต์ไอโซเลท 132 เป็นเวลา 7 วัน



ภาพที่ 4.21 กราฟแสดงการเพิ่มจำนวนของเชื้อยีสต์ไอโซเลท 132 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 สูตร

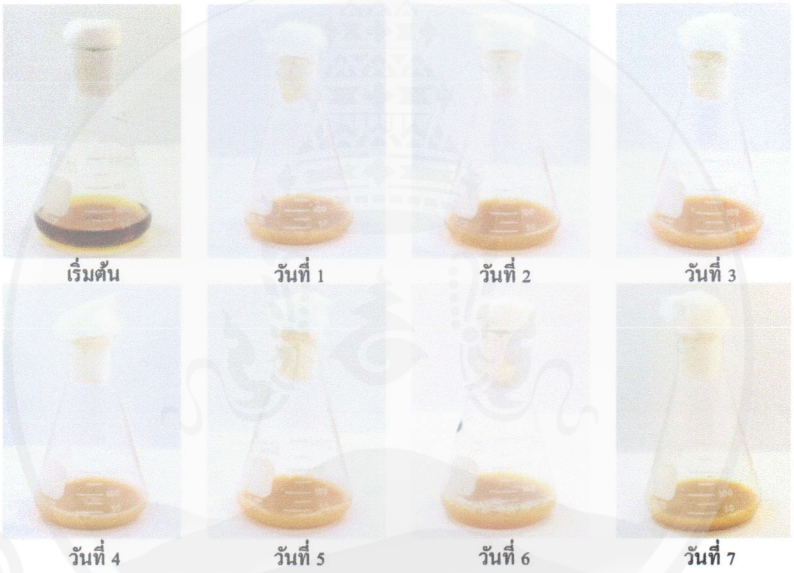
ตารางที่ 4.4 การเพิ่มจำนวนของเซลล์เชื้อยีสต์ไอโซเลท 132 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 สูตร เป็นเวลา 7 วัน

สูตรอาหาร	ปริมาณยีสต์ เริ่มแรก ($\times 10^4$)	ปริมาณยีสต์ วันที่ 1 ($\times 10^6$)	ปริมาณยีสต์ วันที่ 2 ($\times 10^6$)	ปริมาณยีสต์ วันที่ 3 ($\times 10^6$)	ปริมาณยีสต์ วันที่ 4 ($\times 10^6$)	ปริมาณยีสต์ วันที่ 5 ($\times 10^6$)	ปริมาณยีสต์ วันที่ 6 ($\times 10^6$)	ปริมาณยีสต์ วันที่ 7 ($\times 10^6$)	CV%
1 (YPD)	56.00Af	93.58Bf	642.08Ae	986.50Ad	1314.10Aa	1229.20Aab	1145.10Abc	1040.30Acd	8.20
2 (ข้าว)	57.00Ae	63.75Ce	155.67Dd	169.42Dd	246.00Dc	268.75Cb	305.17Ca	261.83Dbc	6.49
3 (ข้าวโพด)	58.33Af	144.00Ae	328.50Bc	282.58Cd	478.50Bb	480.75Bb	475.75Bb	548.33Ba	2.81
4 (ผัก ผลไม้)	55.33Ag	133.42Af	195.75Ce	406.92Bc	354.92Cd	433.42Bbc	461.17Bb	491.92Ca	5.59
5 (รำข้าว)	53.67Af	130.75Ae	95.50Ed	167.75Dc	167.67Ec	181.25Db	176.58Dbc	213.33Ea	5.14
CV%	8.02	6.56	3.54	4.35	4.32	8.9	13.30	3.67	

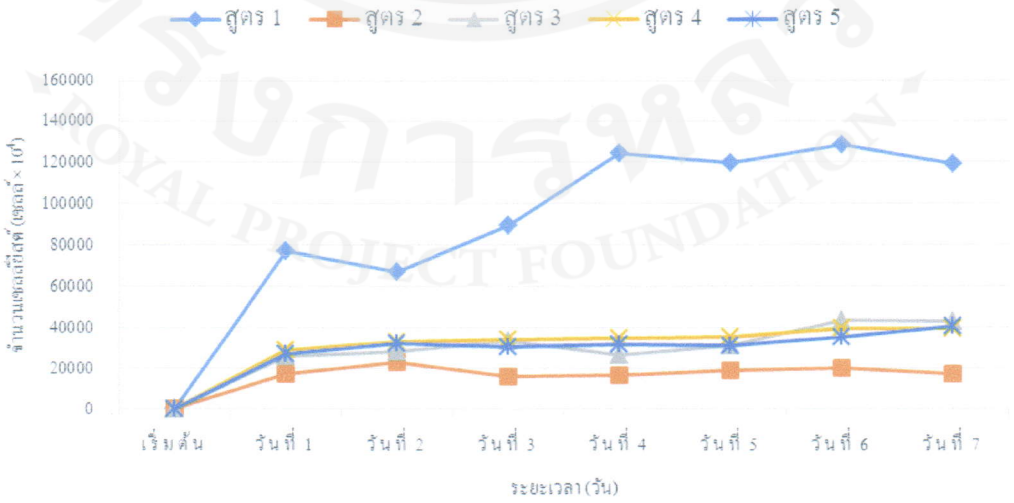
A–E: ตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยวิธี CRD (Completely Randomized Design) ที่ความเชื่อมั่น 95% เปรียบเทียบโดยวิธี LSD (Least Significant Difference)

a–f: ตัวอักษรเหมือนกันในแถวเดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยวิธี CRD (Completely Randomized Design) ที่ความเชื่อมั่น 95% เปรียบเทียบโดยวิธี LSD (Least Significant Difference)

ไอโซเลท 149 สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดในอาหารสูตร 1 แตกต่างจากอาหารสูตรอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ (ภาพที่ 4.22, 4.23 และตารางที่ 4.5) โดยพบว่ามีจำนวนเซลล์มากที่สุดในวันที่ 4 ของการทดลอง



ภาพที่ 4.22 การเปลี่ยนแปลงสีของอาหารสูตร 1 เมื่อเลี้ยงเชื้อยีสต์ไอโซเลท 149 เป็นเวลา 7 วัน



ภาพที่ 4.23 กราฟแสดงการเพิ่มจำนวนของเชื้อยีสต์ไอโซเลท 149 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 สูตร

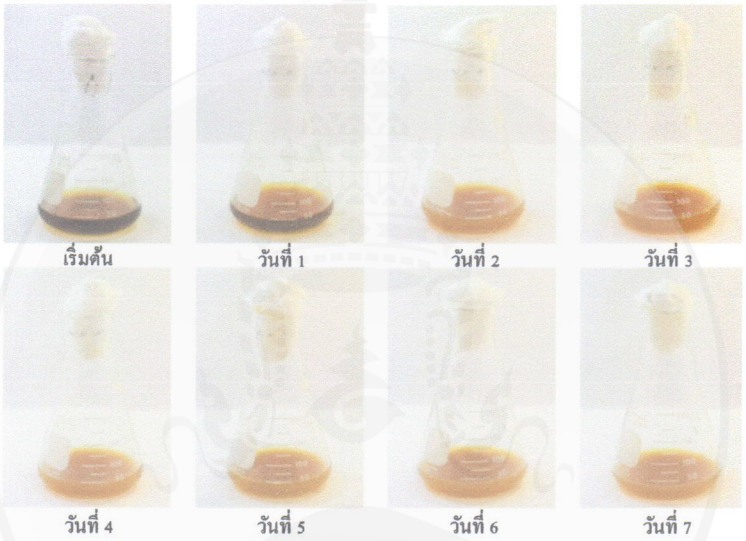
ตารางที่ 4.5 การเพิ่มจำนวนของเซลล์เชื้อยีสต์ไอโซเลท 149 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 สูตร เป็นเวลา 7 วัน

สูตรอาหาร	ปริมาณยีสต์ เริ่มแรก ($\times 10^4$)	ปริมาณยีสต์ วันที่ 1 ($\times 10^6$)	ปริมาณยีสต์ วันที่ 2 ($\times 10^6$)	ปริมาณยีสต์ วันที่ 3 ($\times 10^6$)	ปริมาณยีสต์ วันที่ 4 ($\times 10^6$)	ปริมาณยีสต์ วันที่ 5 ($\times 10^6$)	ปริมาณยีสต์ วันที่ 6 ($\times 10^6$)	ปริมาณยีสต์ วันที่ 7 ($\times 10^6$)	CV%
1 (YPD)	54.00Af	771.75Ad	670.67Ae	891.42Ac	1236.90Aab	1192.00Ab	1280.90Aa	1188.30Ab	3.88
2 (ข้าว)	52.00Ad	171.08Dc	226.83Da	159.58Dc	164.58Dc	188.75Db	198.00Db	171.83Dc	5.03
3 (ข้าวโพด)	49.67Af	256.25Ce	282.50Cd	331.33BCb	266.17Ce	311.83Cc	436.00Ba	427.08Ba	3.04
4 (ผัก ผลไม้)	56.33Ad	286.33Bc	329.75Bb	337.67Bb	347.92Bb	352.75Bb	390.75BCa	394.33Ca	4.44
5 (รำข้าว)	49.67Af	268.17BCe	325.00Bc	302.33Ccd	315.67Bc	311.83Cde	353.00Cb	403.83Ca	4.82
CV%	8.88	3.48	4.41	4.36	5.82	3.77	5.87	1.83	

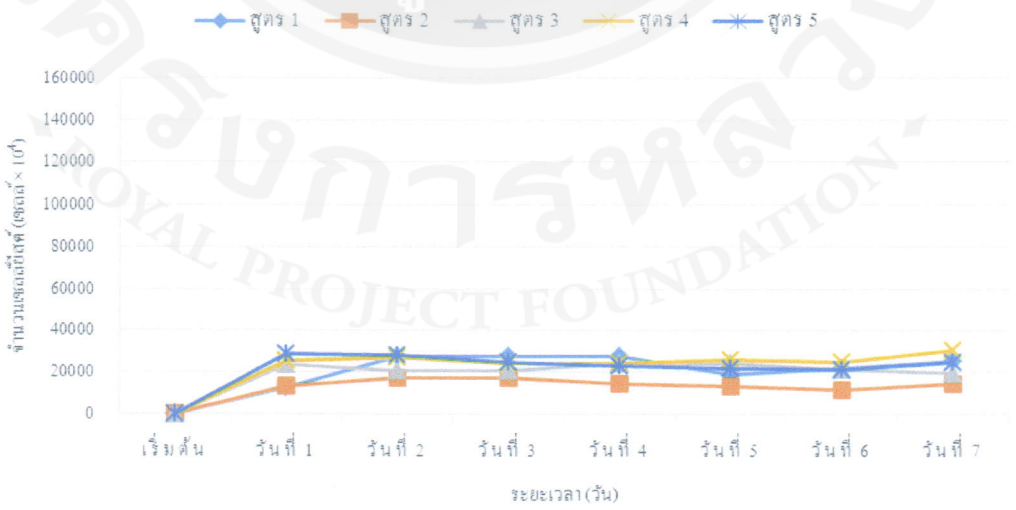
A–E: ตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยวิธี CRD (Completely Randomized Design) ที่ความเชื่อมั่น 95% เปรียบเทียบโดยวิธี LSD (Least Significant Difference)

a–f: ตัวอักษรเหมือนกันในแถวเดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยวิธี CRD (Completely Randomized Design) ที่ความเชื่อมั่น 95% เปรียบเทียบโดยวิธี LSD (Least Significant Difference)

ไอโซเลท 154 สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารทั้ง 5 สูตร และมีจำนวนเซลล์ยีสต์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 4.24, 4.25 และตารางที่ 4.6)



ภาพที่ 4.24 การเปลี่ยนแปลงสีของอาหารสูตร 1 เมื่อเลี้ยงเชื้อยีสต์ไอโซเลท 154 เป็นเวลา 7 วัน



ภาพที่ 4.25 กราฟแสดงการเพิ่มจำนวนของเชื้อยีสต์ไอโซเลท 154 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 สูตร

ตารางที่ 4.6 การเพิ่มจำนวนของเซลล์เชื้อยีสต์ไอโซเลท 149 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 สูตร เป็นเวลา 7 วัน

สูตรอาหาร	ปริมาณยีสต์ เริ่มแรก ($\times 10^6$)	ปริมาณยีสต์ วันที่ 1 ($\times 10^6$)	ปริมาณยีสต์ วันที่ 2 ($\times 10^6$)	ปริมาณยีสต์ วันที่ 3 ($\times 10^6$)	ปริมาณยีสต์ วันที่ 4 ($\times 10^6$)	ปริมาณยีสต์ วันที่ 5 ($\times 10^6$)	ปริมาณยีสต์ วันที่ 6 ($\times 10^6$)	ปริมาณยีสต์ วันที่ 7 ($\times 10^6$)	CV%
1 (YPD)	51.00Bd	127.58Cc	276.58Aa	275.58Aa	277.00Aa	189.08Cb	218.67ABb	250.75Ba	8.21
2 (ข้าว)	56.00Ad	134.42Cbc	172.25Ca	174.42Da	143.33Cb	130.92Dbc	111.42Cc	143.25Db	11.25
3 (ข้าวโพด)	57.00Ad	232.42Bab	205.58Bbc	207.42Cbc	240.42Ba	242.08ABa	209.50Bbc	196.67Cc	7.80
4 (ผัก ผลไม้)	56.33Ad	250.50Bbc	269.67Ab	238.83Bc	240.75Bc	258.33Abc	244.33Abc	303.67Aa	7.05
5 (รำข้าว)	54.33ABf	287.75Aa	283.33Aa	245.17Bbc	231.58Bcd	216.83BCde	210.25Be	247.92Bb	3.89
CV%	4.72	9.09	6.34	5.94	7.85	8.44	7.41	5.28	

A–E: ตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยวิธี CRD (Completely Randomized Design) ที่ความเชื่อมั่น 95% เปรียบเทียบโดยวิธี LSD (Least Significant Difference)

a–f: ตัวอักษรเหมือนกันในแถวเดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยวิธี CRD (Completely Randomized Design) ที่ความเชื่อมั่น 95% เปรียบเทียบโดยวิธี LSD (Least Significant Difference)

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

การแยกเชื้อยีสต์จากผิวผลไม้ที่ไม่แสดงอาการของโรค 26 ชนิด พบว่าสามารถแยกเชื้อยีสต์ได้ทั้งหมด 203 ไอโซเลท และนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชบางชนิดคือ *Alternariabrassicicola*, *Colletotrichumcapsici*, *Fusariumoxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Phytophthora* sp., *Pythium* sp. และ*Sclerotium* sp.ในเบื้องต้นโดยวิธี Dual culture technique พบเชื้อยีสต์ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคข้างต้นรวม 14 ไอโซเลท คือไอโซเลท12, 15, 16, 20, 62, 77A, 77B, 132, 149, 154, 157, 158, 191 และ 192 จากนั้นจึงนำเชื้อยีสต์ปฏิปักษ์ทั้ง 14 ไอโซเลท มาทำการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชพบว่าเชื้อยีสต์ไอโซเลท 20, 15, 62, 191, 154, 192, 158, 77A และ 132 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. brassicola*สูงที่สุด เชื้อยีสต์ไอโซเลท 192, 15, 132 และ 12 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. capsici*สูงที่สุดเชื้อยีสต์ไอโซเลท 132, 192,m 158, 191 และ 154 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F.oxysporum* f. sp. *lycopersici*สูงที่สุดเชื้อยีสต์ไอโซเลท 12, 157 และ 15 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Phytophthora* sp. สูงที่สุดเชื้อยีสต์ไอโซเลท 77A, 132, 149, 154 และ 15 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pythium*sp. สูงที่สุด และ เชื้อยีสต์ไอโซเลท 149, 15 และ 12 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Sclerotium* sp. สูงที่สุด

ศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์ปฏิปักษ์ที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มปริมาณยีสต์ในสภาพห้องปฏิบัติการโดยใช้อาหาร 5 สูตรคือ สูตร 1 คือ YPD สูตร 2 คือกากน้ำตาลผสมข้าว สูตร 3 คือกากน้ำตาลผสมข้าวโพด สูตร 4 คือกากน้ำตาลผสมเศษผักละผลไม้ และสูตร 5 คือกากน้ำตาลผสมรำข้าว พบว่าสูตรที่ 2-4 ซึ่งใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนนั้นทำให้ยีสต์มีการเพิ่มปริมาณเซลล์ได้น้อยกว่าอาหารสูตรที่ 1 ซึ่งมีน้ำตาล Dextrose เป็นส่วนประกอบ อีกทั้งยังมี Yeast Extract และ Peptone ซึ่งคาดว่าจะเป็นแหล่งอาหารที่ยีสต์สามารถนำไปใช้ในการสร้างผนังเซลล์และเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ดีกว่า แต่อย่างไรก็ตามหากมองในด้านต้นทุนที่สูงกว่าในการใช้ YPD ซึ่งอาหารอีก 4 สูตรอาจเป็นทางเลือกที่สามารถใช้ทดแทนกันได้เพื่อลดต้นทุนในการผลิต แต่เพิ่มปริมาณการผลิตให้มากขึ้น

และเพิ่มจำนวนเซลล์ยิสต์ตั้งต้นให้มากขึ้นด้วยเช่นกัน ซึ่งผลของการศึกษาครั้งนี้สามารถนำไปใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาการใช้เชื้อยีสต์เพื่อการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีต่อไป

มูลนิธิโครงการหลวง ROYAL PROJECT FOUNDATION

เอกสารอ้างอิง

เกษม สร้อยทอง. 2532. การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี.คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 362 หน้า.

จิระเดช แจ่มสว่าง. 2534. การควบคุมโรคพืช และแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 185 หน้า.

นงลักษณ์ สุวรรณพานิช และปรีชา สุวรรณพานิช. 2541. จุลชีววิทยาทั่วไป. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ

นิตยา สุวรรณรัตน์. 2534. โรคพืชที่เกิดจากเชื้อราชั้นต่ำ. *ใน*: ประสาทพร สมิตมาน (บรรณาธิการ), โรคพืชวิทยา. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. หน้า 73–76.

บงกชวรรณ สุตะพาหะ. 2550. การตรวจพิสูจน์เชื้อราก่อโรคทางห้องปฏิบัติการ. เชียงใหม่: โครงการตำรา คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

พัฒนา สนธิรัตน์ วิรัช ชูบำรุง ประไพศรี พิทักษ์ไพรวัน และปิยะ เกียรติก้อง. 2526. เชื้อรา *Alternaria* ที่เป็นสาเหตุโรคของพืชผักใบจุดบางชนิด. วารสารโรคพืช 3(4): 154–167.

วิจัย รักวิทยาศาสตร์. 2551. ราวิทยาเบื้องต้น. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน. 351 หน้า.

สันทัด ศิริอนันต์ไพบูลย์. 2544. เทคโนโลยีชีวภาพใกล้ตัว. สถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วท.), กรุงเทพฯ. 171 หน้า.

อรพรรณ วิเศษสังข์ และจุมพล สาระนาค. 2531. โรคใบจุดของพืชตระกูลกะหล่ำและการป้องกันกำจัด. วารสารโรคพืช 8(3–4): 131–136.

Agrios, G.N. 2005. Plant Pathology. 5th edition., Elsevier Academic Press, San Diego, USA.

Alexopoulos, C.S. and Mins, C.W. 1979. Introductory to Mycology 3rd edition. John Wiley & Sons. N.Y., Chichester, Toronto Singapore. 632 pp.

Andrews J.H., Buck J.W. 2002. Adhesion of yeasts to leaf surfaces. *In*: Lindow S.E., Hecht-Poinar E.I., Elliott V.J. (Eds), Phyllosphere microbiology. American Phytopathological Society, St. Paul, pp 53–68.

Arras, G., Nicolussi, P. and Ligios, C. 1999. Non-toxicity of some antifungal yeasts (*Pichia guilliermondiii*, *Rhodotorula glutinis* and *Candida oleophila*) in laboratory animals. Annali di Microbiologiaed Enzimologia 49: 125–131.

Baker, K. and Cook, R. 1974. Biological control of plant pathogens. W.H. Freeman Company, San Francisco, USA, 433 pp.

Barkai-Golan, R., 2001. Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables. Development and Control. 1st edition., Elsevier Science B.V., Amsterdam, 418 pp.

Blakeman, J.P. 1985. Ecological Succession of Leaf Surface Microorganisms in Relation to Biological Control. *In*: Windels E.C. and Lindow, S.E. (Eds) Biological Control on the Phylloplane. American Phytopathological Society.St.Paul, Minnesota, USA, pp 6–30.

Brock, T.D. 1984. Biotechnology. A Textbook of Industrial Microbiology. Science Tech, Madison.

Buck J.W. 2002. *In vitro* antagonism of *Botrytis cinerea* by phylloplane yeasts. Canadian Journal of Botany. 80: 885–891.

Buck J.W, Lachance M.A and Traquair J.A. 1998. Mycoflora of peach bark: population dynamics and composition. Canadian Journal of Botany. 76: 345–354.

Castoria, R, De. Curtis, F., Lima, G., Caputo, L., Pacifico, S and De. Cicco, V. 2001 *Aureobasidium pullulans* (LS-30) an antagonist of postharvest pathogens of fruits: study on its modes of action Postharvest Biology and Technol ogy 22: 7–17.

Chanchaichaovivat, A., Ruenwongsa, P and Panijpan, B. 2007. Screening and identification of yeasts strains from fruits and vegetables: potential for biological control of postharvest chilli anthracnose (*Colletotrichum capsici*). Biological Control 42: 326–335.

Droby S and Chalutz E 1994. Mode of action of biocontrol agents of postharvest disease. *In*: Wilson, C.L and Wisniewski, M.E. (Eds.), Biological Control of Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables–Theory and Practice. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 63–75.

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

Druvefors, U. 2004. Yeast biocontrol of grain spoilage mold. Doctoral dissertation, Swedish University of Agricultural Sciences. Retrieved January 17, 2005, from Epsilon Dissertations and Graduate Theses Archive Web site: http://diss-epsilon.slu.se/archive/00000552/.

Druvefors, U., N. Jonsson, M.E. Boysen, and J. Schnurer. 2002. Efficacy of the biocontrol yeast *Pichia anomala* during long-term storage of moist feed grain under different oxygen and carbon dioxide regimens. FEMS Yeast Research 3: 389–394.

El-Ghaouth, A., Wilson, C.L. and Wisniewski, M. 1995. Sugar analogs as potential fungicides for postharvest pathogens of apple and peach. Plant Disease 79: 254–258.

El-Ghaouth A., Smilanick J.L. and Wilson C.L. 2000a Enhancement of the performance of Candida saitona by the addition of glycolchitosan for the control of postharvest decay of apple and citrus fruit. Postharvest Biology and Technology 19: 103–110.

El-Ghaouth A., Smilanick J.L., Wisniewski, M. and Wilson C.L. 2000b Improved control of apple and citrus fruit decay with the combination of Candida saitona and 2deoxy-d-glucose. Plant Disease 84: 249–253

El-Mehalawy, A.A., Hassanein, N.M., Khater, H.M., Karam El-Din, E.A. and Youssef, Y.A. 2004 Influence of maize root colonization by the rhizosphere actinomycetes and yeast fungi on plant growth and on the biological control of late wilt disease International Journal of Agriculture and Biology. 6: 599–605.

El-Neshawy, S.M. 1998. Efficacy of *Candida oliophila* 128 in preventing *Penicillium expensum* infection on apricot fruit. Acta Hort. 485: 141–147.

El-Tarabily, K.A. and Sivasithamparam, K. 2006. Potential of yeasts as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. Mycoscience 47: 25–35.

Fell. J.W. and C.P. Kurtzman. 1996. Yeast. pp. 103 – 108. *In* G.S. Hall (ed). Methods for the Examination of Organismal Diversity in Soils and Sediments. CAB International Printed, UK.

Fravel, D.R. 2005. Commercialization and implementation of biocontrol. Annual Review of Phytopathology 43: 337–359.

Giatgong, P. 1980. Host index of plant diseases in Thailand. Department of Agriculture. Ministry of agriculture and cooperative, Bangkok. 118 pp.

Halasz, A. and R. Lasztity. 1991. Use of Yeast Biomass in Food Production. CRC Press, Forida.

Hallewin, G.D., G Arras, R. Dessi, A. Dettori and M. Schirra. 1999. Citrus green mold control in stored star ruby grapefruit by the use of abiocontol yeast under curing conditions *In*

L.Michalczuk and W. Plocharski, (Eds) Effect of Pre and Post Harvest Factor on Storage of Fruit. Proceeding of International Symposium, Warshaw, Poland, pp111–115.

Höfte M., Poppe L., Druvefors U., Schnürer J., De Cal A., Melgarejo P., Stèpien V. and Jijakli M.H. 2004 Modes of action of *Candida* sake CPA-1, Pantoea agglomerans CPA-2, *Epicoccum nigrum* 282 and *Pichia anomala* J121, effective antagonists of postharvest pathogens. *In*: International Workshop Disease Biocontrol in Food Production: development of biocontrol agents of fungal diseases for commercial applications in food production systems, Seville, Spain, March 24–27 2004, p 27.

Igarashi, Y., Ogawa M., Sato Y., Saito N.and Yoshida R., 2000. Fistupyrone, a novel inhibitor of the infection of Chinese cabbage by *Alternaria brassicicola*, from *Streptomyces* sp. TP-A0569. Journal of Antibiotics 53: 1117–1122.

Ingold, C.T. 1975. The Biology of Fungi. The Arichor Press Ltd. Great Britain.

Isaac, s. and D. Jenning. 1995. Microbial Culture. Bios Scientific Publishers, Oxford.

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

Jomduang, J. and Sardsud, V. 2006. Postharvest application of the yeast *Issatchenkia orientalis* for the Control of anthracnose of mango. Proceedings of 44th Kasetsart University Annual Conference : Plants, Bangkok (Thailand), pp. 96–103.

Kloepper, J.W., Leong, J. Teintze M. and Schroth M.N. 1980. *Pseudomonas siderophores*-A mechanism explaining disease suppressive soils. Current Microbiology 4: 317–320.

Kooman I., McGrath S.P.and Giller I. 1990. Mycorrhizal infection of clover is delayed in soils contaminated with heavy metals from past sewage sludge applications. Soil Biology and Biochemistry 22: 871–873.

Lachance, M.A. 1990. Yeast selection in nature. pp. 21 – 42. In C.J. Panchal (ed). Yeast Strain Selection. Marcel Dekker, New York.

Larran, S., Perello, A., Simon, M.R. and Moreno, V 2002. Isolation and analysis of endophytic microorganisms in wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 18: 683–686.

Matile, P.H., H. Moor and C.F. Robinow. 1969. Yeast cytology. pp. 219 – 302. *In* A.H. Rose and J.S. Harrison. The Yeasts. Vol. 1. Biolpgy of Yeasts. 1st edition. Academic Press, London.

McLaughlin, R.J., Wilson, C.L., Droby, S., Ben-Arie, R. and Chalutz, E. 1992. Biological of postharvest diseases of grape, peach and apple with the yeasts *Kloeckera apiculata* and *Candida guilliermondii*. Plant Disease. 76: 470–473.

McLaughlin, R.J., Wisniewski, M.E., Wilson, C.L. and Chalutz, E. 1990 Effect of inoculum concentration and salt solutions on biological control of postharvest diseases of apple with *Candida* sp Phytopathology 80: 456–461.

Nakase, T. 2001. What is Yeasts? Lecture note for the Workshop on Yeasts: Classification, Identification, Preservation and Application. 9 – 13 July, 2001. Kasetsart University, Bangkok, Thailand.

Nassar, A.H., El-Tarabily, K.A. and Sivasithamparam, K. 2005 Promotion of plant growth by an auxin-producing isolate of the yeast *Williopsis saturnus* endophytic in maize (*Zea mays* L.) roots. Biology and Fertillity of Soils 42: 97–108.

Phaff, H.J. and Starmer, W.T. 1987. Yeasts associated with plants, insects and soil. *In*: Rose, A.H., Harrison, J.S. (Eds.) , The yeasts, Vol. 1, 2nd edition., Academic Press, New York, pp 123–180.

Phaff, H.J. 1990. Isolation of yeasts from natural sources. pp.53 – 76. *In* D.P. Labeda (ed). Isolation of Biotechnological Organisms from Nature. Mc Graw. Hill Publishing Company, New York.

Phaff, H.J., M.W. Miller and E.M. Mrak. 1996. The Life of Yeasts: Their Nature, Activity, Ecology and Relation to Mankind. Harvard University Press, Cambridge.

Saligkarias, I.D., Gravanis, F.T. and Epton, H.A.S., 2002. Biological control of *Botrytis cinerea* on tomato plants by the use of epiphytic yeasts *Candida guilliermondii* strains 101 and US 7 and *Candida oleophila* strain I-182. I. *In vivo* studies. Biological Control 25, 143–150.

Smith, J.E. 1996. Biotechnology. 3rd edition. Combridge University Press, Cambridge.

Soll, R. David. 2002. Mixed Mycotic Infection. *In*: Kim A. Brogden and Janet M. Guhmiller (Eds.) Polymicrovial Diseases. The American Society For Microbiology, Washingtan, pp. 335–356.

Somsiri, S. 1997. Yeasts for the control of fruit rot of mango. Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok

Spencer, J.F.T. and D.M. Spencer. 1997. Ecology: where yeasts live. pp. 31 – 58. *In* J.F.T. Spencer and D.M. Spencer (eds). Yeasts in Natural and Artificial Habitats. Springer – Verlag, Berlin Hedelberg.

Stanbury, D.F., A. Whitaker and S.J. Hall. 1999. Principles of Fermentation Technology. 2nd edition. Butter Worth, Heinemann Bodmin.

Stevens, C., Khan V.A., Lu J.Y., Wilson C.L., Pusey P.L., Lgwegbe E.C.K., Kabwe K., Mafolo Y., Liu J., Chalutz E., and Droby S. 1997. Integration of ultraviolet (UV-C) light with yeast treatment for control of postharvest storage rot of fruits and vegetables. Biological Control 10: 98–103.

Urquhart, E.J. and Punja, Z.K. 2002 Hydrolytic enzymes and antifungal compounds produced by Tilletiopsis species, phyllosphere yeasts that are antagonists of powdery mildew fungi Canadia Journal of Microbiology 48: 219–229.

Vero S., Mondino P., Burgaeno J., Soubes M. and Wisniewski M. 2002. Characterization of biological activity of two yeast strains from Uruguay against blue mold of apple. Postharvest Biology and Technology. 26: 91–98.

Walker, G.M. 1998. Yeast Physiology and Biotechnology. John Wiley and Sons, Wesr Sussex.

Webster, J. 1980. Introduction to fungi. Cambridge University Press, London. 699 pages.

Wisniewski, M.E., Biles, C., Droby, S., McLaughlin, R., Wilson, C.L. and Chalutz, E. 1991 Mode of action of the postharvest biocontrol yeast, *Pichia guilliermondii*. 1. Characterization of attachment to *Botrytis cinerea* Physiology and Molecular Plant Pathology 39: 245–258.

Yarrow. 1998. Mathods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. pp. 77 – 100. In C.P. Kurtzman and J.W. Fell (eds). The Yeast, A Taxonomic Study. 4th edition. Elsevier, Amsterdam.