การควบคุมโรคแอนแทรคโนสในพริกชี้ฟ้า (*Colletotrichum gloeosporioides*) โดยยีสต์ที่แยกได้จากผักและผลไม้

(Biological Control of Chilli Anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) by Yeasts Isolated from Fruits and Vegetables)

อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์* และจุรีมาศ วงศ์ศรีรัตน์*

*สาขาวิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา 1061 ถนนอิสรภาพ แขวงหิรัญรูจี เขตธนบุรี กรุงเทพฯ 10600

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบและเปรียบเทียบประสิทธิภาพการควบคุมโรคแอน-แทรคโนส (anthracnose) ในผลพริกชี้ฟ้าแดง (*Capsicum annuum* L. var. *acuminatum* Fingerh.) ที่เกิดจากรา *Colletotrichum gloeosporioid*es ด้วยยีสต์ปฏิปักษ์ 4 ชนิด ซึ่งแยกได้จากผักและผลไม้ในประเทศไทยได้แก่ *Pichia guilliermondii* R13 *Candida musae* R6 *Issatchenkia orientalis* ER1 และ *Candida quercitrusa* L2 รวมทั้งสังเกตปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีสต์และรา สำหรับการตรวจสอบประสิทธิภาพของยีสต์ในการควบคุมโรคใช้วิธีเพาะเชื้อร่วมกันระหว่างเซลล์ยีสต์และสปอร์ราบนจานเพาะเชื้อ PDA ที่เจาะหลุมตรงกลาง และตรวจสอบประสิทธิภาพการยับยั้งของยีสต์ต่อราบนผลพริกชี้ฟ้าแดง ผลการวิจัยพบว่ายีสต์ *P. guilliermondii* R13 มีประสิทธิภาพควบคุมการเจริญของราได้ดีเท่ากับ *I. orientalis* ER1 บนจานเพาะเชื้อ คือ ร้อยละ 85.84 โดยใช้เซลล์ยีสต์ปริมาณ 5×10^6 เซลล์/มิลลิลิตร ซึ่งมีประสิทธิภาพมากกว่า *C. musae* R6 และ *C. quercitrusa* L2 ตามลำดับ สำหรับการตรวจสอบประสิทธิภาพการยับยั้งบนผลพริกพบว่ายีสต์สายพันธุ์ R13 ให้ผลการยับยั้งร้อยละ 76.88 ซึ่งมากกว่ายีสต์สายพันธุ์ ER1 R6 และ L2 ผลการสังเกตปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีสต์ 2 ชนิด คือ R13 และ ER1 ต่อรา *C. gloeosporioid*es ภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่า เซลล์ยีสต์สายพันธุ์ R13 มีความสามารถในการเกาะติดกับเส้นใยราได้ดี สำหรับยีสต์สายพันธุ์ ER1 ไม่พบความสามารถในการเกาะติดกับเส้นใยรา ดังนั้นจึงมีแนวโน้มที่จะนำยีสต์สายพันธุ์ R13 และ ER1 มาใช้ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสในผลพริกชี้ฟ้าที่เกิดจาก *C. gloeosporioid*es ด้วยชีววิธี

คำสำคัญ: Anthracnose / *Colletotrichum gloeosporioide*s / *Pichia guilliermondii* / *Issatchenkia orientalis*

บทนำ

ประเทศไทยจัดเป็นประเทศเกษตรกรรม ซึ่งผลผลิตทางการเกษตรที่สำคัญของประเทศมีอยู่หลายชนิดที่สำคัญชนิดหนึ่งก็คือผลพริกสด โดยนอกจากจะผลิตเพื่อบริโภคภายในประเทศแล้วยังเป็นสินค้าส่งออกอีกด้วย มูลค่าการส่งออกของผลิตภัณฑ์จากพริกสูงขึ้นทุกปี พริกสดถูกส่งไปยังหลายประเทศใกล้เคียงเช่น สิงคโปร์และมาเลเซีย พริกแห้งชนิดเม็ด ชนิดป่น และบดถูกส่งออกในมูลค่าไม่น้อยกว่าพริกสด ประเทศที่รับซื้อพริกแห้งเป็นปริมาณมากได้แก่ ประเทศสหรัฐอเมริกา ออสเตรเลีย ไต้หวัน และมาเลเซีย ประเทศที่รับซื้อพริกแห้งป่นและบดได้แก่ ประเทศเนเธอร์แลนด์ สหรัฐอเมริกา ออสเตรเลีย และไต้หวัน (มณีฉัตร นิกรพันธ์, 2541) แต่เกษตรกรผู้ปลูกพริกมักประสบปัญหาในการปลูกพริก และถือว่าเป็นปัญหาที่สำคัญ คือ โรคแอนแทรคโนสในพริก ที่พบมากและทำความเสียหายร้ายแรงให้กับผลผลิตพริกเป็นจำนวนมาก โรคนี้พบในแหล่งที่มีการปลูกพริกทั่วไป ทำความเสียหายให้กับผลพริกโดยเฉพาะอย่างยิ่งในผลพริกที่แก่จัด ซึ่งทำให้ผลเน่าได้ในขณะที่ปลูกอยู่ในแปลง หรืออาการเน่าไม่แสดงในแปลงปลูกแต่จะเกิดอาการเน่าในโรงเก็บหรือในขณะขนส่ง ทำให้ผลผลิตที่กำลังจะทำการเก็บเกี่ยว ที่ทำการเก็บเกี่ยวแล้ว และผลผลิตที่กำลังขนส่งไปเพื่อจำหน่ายทั้งในประเทศและต่างประเทศได้รับความเสียหาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งผลผลิตที่ขนส่งไปจำหน่ายยังต่างประเทศได้รับความเสียหายเป็นอย่างมาก เนื่องจากในการขนส่งนั้นใช้เวลานานกว่า ทำให้เกษตรกรเสียรายได้ในส่วนนี้ไป หรืออาจทำให้เกษตรกรประสบกับปัญหาการขาดทุนได้ ผลพริกที่เป็นโรคแอนแทรคโนสเมื่อแห้งแล้วมีอาการหงิกงอและสีของพริกเปลี่ยนไปด้วย โรคนี้มีสาเหตุมาจากรากลุ่ม *Colletotrichum* spp. จำนวน 3 ชนิดได้แก่ *C. gloeosporioides C. capsici* และ *C. piperatum* (ลักษณา วรรณภีร์, 2536; Giatgong, 1980) ปัจจุบันได้มีการนำราหรือแบคทีเรียมาใช้ในการควบคุมโรคพืชแต่จุลินทรีย์เหล่านี้มักสร้างสารปฏิชีวนะในการยับยั้งเชื้อก่อโรคพืช ซึ่งอาจมีผลต่อผู้บริโภคที่แพ้สารปฏิชีวนะได้ จึงได้มีการค้นหาสายพันธุ์ยีสต์ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ไม่สร้างสารปฏิชีวนะ ดำรงชีวิตแบบผู้ย่อยสลาย และพบมากตามผิวของผัก ผลไม้ ใบไม้ หรือดอกไม้ จึงมีความปลอดภัยมากกว่าการใช้แบคทีเรียหรือรา (Arras et al., 1999; He et al., 2003)

ดังนั้นการวิจัยในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการนำสายพันธุ์ยีสต์ที่แยกได้จากผักและผลไม้ จำนวน 4 สายพันธุ์ ซึ่งได้ผ่านการตรวจสอบประสิทธิภาพการยับยั้งราได้ผลดีใน *C. capsici* (Chanchaichaovivat et al., 2007; 2008) มายับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่ก่อโรคแอนแทรคโนส ซึ่งอาจเป็นทางเลือกหนึ่งของเกษตรกรในการปราบศัตรูพืชที่ไม่ใช้สารเคมี ไม่เป็นพิษต่อเกษตรกรผู้ปลูกพริกเอง ลดปัญหาสารพิษตกค้างอยู่ที่ผลพริก และไม่ทำให้เกิดมลภาวะในสิ่งแวดล้อม

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การทดสอบประสิทธิภาพของยีสต์ที่แยกได้จากผักและผลไม้จำนวน 4 สายพันธุ์ ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคแอน-แทรคโนสบนจานเพาะเชื้อ

1.1 นำยีสต์ 4 สายพันธุ์ได้แก่ *Pichia guilliermondii* R13 *Candida musae* R6 *Issatchenkia orientalis* ER1 และ *Candida quercitrusa* L2 ที่คัดแยกได้จากผักและผลไม้ในประเทศไทย (Chanchaichaovivat et al., 2007; 2008) มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว YM (yeast malt broth) และเขย่าที่ 150-200 รอบ/นาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

1.2 นำอาหารเหลวที่เพาะเลี้ยงเซลล์ยีสต์แล้วมาปั่นที่ 3000 รอบ/นาที เพื่อแยกเซลล์ยีสต์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำเซลล์ยีสต์ที่แยกได้มาล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง

1.3 ศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนส (*C. gloeosporioides*) บนจานเพาะเชื้อโดยใช้คอร์กบอเรอร์ (cork borer) เจาะวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งให้มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร จากนั้นทำการลงเชื้อราและยีสต์ ซึ่งเชื้อราใช้ปริมาณสปอร์ที่ 5×10^4 สปอร์/มิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และยีสต์ใช้จำนวนเซลล์ที่ 5×10^4 5×10^6 5×10^8 และ 5×10^{10} เซลล์/มิลลิลิตร สังเกตการเจริญของรา และบันทึกเส้นผ่านศูนย์กลางของคอโลนีรา (เซ็นติเมตร) ในระยะเวลา 5วัน เพื่อคัดเลือกจำนวนเซลล์ยีสต์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสได้ดีที่สุดมาทดสอบบนผลพริกชี้ฟ้าต่อไป

2. การทดสอบประสิทธิภาพของยีสต์จำนวน 4 สายพันธุ์ ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสบนผลพริกชี้ฟ้าหลังการเก็บเกี่ยว

2.1 นำยีสต์จำนวน 4 สายพันธุ์ได้แก่ *P. guilliermondii* R13 *C. musae* R6 *I. orientalis* ER1 และ *C. quercitrusa* L2 มาทำการเพาะเลี้ยงและเก็บเซลล์เช่นเดียวกับในข้อ 1.1 และ 1.2

2.2 ศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนส *C. gloeosporioides* บนผลพริก โดยนำผลพริกสุกสีแดงจำนวน 30 ผล มาทำความสะอาดด้วยการแช่ในน้ำเกลือเข้มข้นร้อยละ 10 นาน 5 นาที แล้วนำไปจุ่มในเอธานอลเข้มข้นร้อยละ 70 นาน 1 นาที ทิ้งให้แห้งในตู้ปลอดเชื้อ จากนั้นทำรอยแผลบนผิวของผลพริกด้วยคอร์กบอเรอร์ที่ผ่านการเผาไฟฆ่าเชื้อมาแล้ว ให้มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิลิตร เพาะเชื้อราและยีสต์ โดยใช้ปริมาณสปอร์ราที่ 5×10^4 สปอร์/มิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และยีสต์ใช้จำนวนเซลล์ที่ให้ผลในการยับยั้งราได้ดีที่สุดในข้อ 1 มาทำการทดสอบ บันทึกเส้นผ่านศูนย์กลางของการเกิดโรค (เซ็นติเมตร) หลังจากการบ่มพริกเป็นเวลา 5 วัน

3. การตรวจสอบปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์ยีสต์จำนวน 2 สายพันธุ์ กับโครงสร้างเส้นใยของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนส ในน้ำสกัดจากผลพริกชี้ฟ้าแดง

3.1 นำผลพริกชี้ฟ้าแดงสะอาดมาบดคั้นกับน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ (อัตรส่วน 1: 1) จากนั้นกรองน้ำที่ได้ด้วยกระดาษกรอง Watman No.1 ที่เรียงซ้อนกัน 2 ชั้น นำน้ำพริกผสมกับน้ำกลั่นฆ่าเชื้ออีกครั้ง ให้ได้

3.2 ลงเชื้อรา *C. gloeosporioides* และยีสต์ *P. guilliermondii* R13 ในน้ำพริกชี้ฟ้าแดงที่เตรียมไว้ในหลอด โดยใช้จำนวนสปอร์ราที่ 5×10^4 สปอร์/มิลลิลิตร และยีสต์ใช้จำนวนเซลล์ที่ให้ผลในการยับยั้งราดีที่สุดในข้อ 1 ย้อมสีเซลล์ยีสต์และเส้นใยราด้วยแลคโตฟีนอลคอทอลบลู (lactophenol cotton blue) แล้วสังเกตปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์ยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์กับโครงสร้างเส้นใยด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10× 40× ที่เวลา 12 24 36 และ 48 ชั่วโมง ของการบ่มเชื้อ จากนั้นบันทึกภาพด้วยกล้องถ่ายภาพ

4. การวิเคราะห์ประสิทธิภาพของยีสต์ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนส โดยยีสต์ 4 สายพันธุ์

ประสิทธิภาพของยีสต์ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนส สามารถคำนวณได้จากร้อยละของการยับยั้งรา *C. gloeosporioides* ซึ่ง คำนวณได้จากสูตรดังนี้

(เส้นผ่านศูนย์กลางของราที่สภาวะควบคุม – เส้นผ่านศูนย์กลางของราในสภาพที่มียีสต์) × 100 / เส้นผ่านศูนย์กลางของราที่สภาวะควบคุม

5. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ประสิทธิภาพการควบคุมโรคแสดงค่าเป็นร้อยละ และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างตัวแปรโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (ONE-WAY-ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับ 0.05 (ใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 10)

ผลการศึกษา

การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของ *C. gloeosporioides* ซึ่งก่อให้โรคแอนแทรคโนสในผลผริกชี้ฟ้า ด้วยยีสต์ที่แยกได้จากผักและผลไม้ในประเทศไทยจำนวน 4 สายพันธุ์ บนจานเพาะเชื้อ ที่ผลพริกชี้ฟ้าหลังการเก็บเกี่ยว และการตรวจสอบปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์ยีสต์กับโครงสร้างเส้นใยราในน้ำสกัดจากผลพริกชี้ฟ้าแดง มีดังนี้

1. ประสิทธิภาพของยีสต์ที่แยกได้จากผักและผลไม้ 4 สายพันธุ์ ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในจานเพาะเชื้อ

จากการทดสอบความสามารถของยีสต์ 4 สายพันธุ์ ยับยั้งการเจริญของรา *C. gloeosporioides* โดยใช้จำนวนเซลล์ยีสต์ที่มีความเข้มข้นที่แตกต่างกัน พบว่ามีผลทำให้เส้นผ่านศูนย์กลางคอโลนีของรามีขนาดลดลงแตกต่างกันออกไปเมื่อเทียบกับเส้นผ่านศูนย์กลางของราในจานควบคุม (ไม่ได้แสดงผลในที่นี้) จำนวนเซลล์ยีสต์ที่ทำให้เส้นผ่านศูนย์กลางการเจริญของคอโลนีรามีขนาดลดลงได้มากที่สุดคือ 5×10^6 เซลล์/มิลลิลิตร (ตารางที่ 1) ยีสต์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของราได้ดีที่สุดคือ *P. guilliermondii* R13 และ *I. orientalis* ER1 ซึ่งจะให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งร้อยละ 85.84 เท่ากันที่จำนวนเซลล์ยีสต์เท่ากับ 5×10^6 เซลล์/มิลลิลิตร

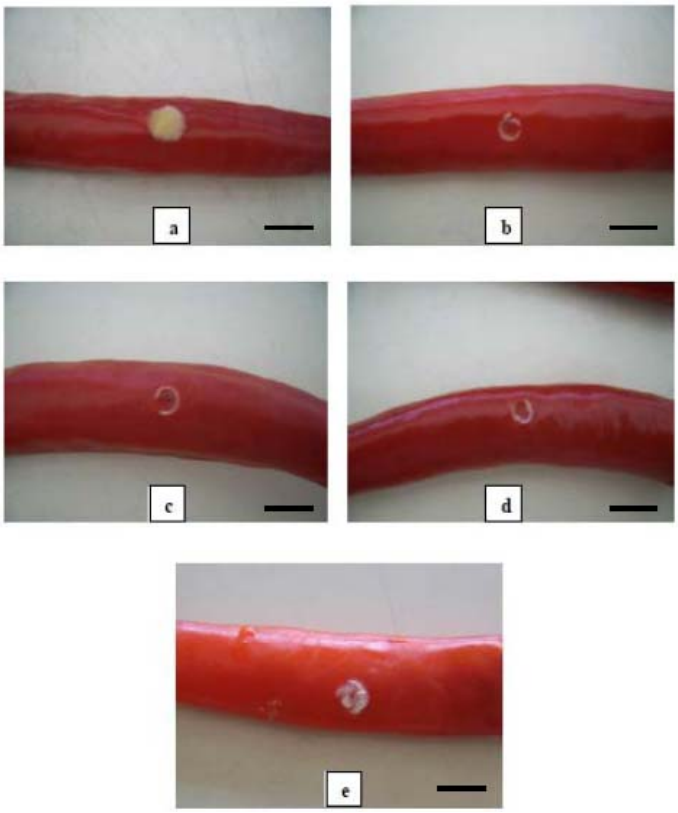
2. ประสิทธิภาพของยีสต์ที่แยกได้จากผักและผลไม้จำนวน 4 สายพันธุ์ ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสบนผลพริกชี้ฟ้าหลังการเก็บเกี่ยว

จากการทดสอบความสามารถของยีสต์ 4 สายพันธุ์ ยับยั้งการเจริญของรา *C. gloeospoioides* บนผลพริกชี้ฟ้าหลังการเก็บเกี่ยว ซึ่งจำนวนเซลล์ยีสต์ที่นำมาใช้ยับยั้งคือ 5×10^6 เซลล์/มิลลิลิตร (เป็นจำนวนเซลล์ที่ให้ประสิทธิภาพสูงที่สุดในการยับยั้งราก่อโรคแอนแทรคโนสบนจานเพาะเชื้อ) ผลการทดสอบพบว่ายีสต์แต่ละสายพันธุ์มีความสามารถในการลดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางการเจริญของราเมื่อเทียบกับเส้นผ่านศูนย์กลางของราในชุดควบคุมได้แตกต่างกัน (ภาพที่1) สายพันธุ์ยีสต์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของราได้ดีที่สุด คือ *P. guilliermondii* R13 โดยสามารถทำให้เส้นผ่านศูนย์กลางของคอโลนีราลดลงได้มากที่สุด (0.37 เซ็นติเมตร) และมีประสิทธิภาพการควบคุมโรคสูงสุดคือ ร้อยละ 76.88 รองลงมา คือ *I. orientalis* ER1 *C. quercitrusa* L2 และ *C. musae* R6 ซึ่งมีประสิทธิภาพการควบคุมโรคได้ร้อยละ 75.00 ร้อยละ 73.13 และร้อยละ 62.50 ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 1. ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของรา *C. gloeosporioides* โดยยีสต์ 4 สายพันธุ์ที่ปริมาณเซลล์ต่างๆ กัน

สายพันธุ์ยีสต์	ประสิทธิภาพการยับยั้งรา *C. gloeosporioides* (ร้อยละ)*			
	5×10^4	5×10^6	5×10^8	5×10^{10}
P. guilliermondii R13	19.03a	85.84a	76.25a	50.80a
C. musae R6	13.77c	79.83b	66.67c	38.80d
I. orientalis ER1	14.97b	85.84a	72.08b	46.80b
C. quercitrusa L2	12.55d	78.54c	62.50d	41.20c

*ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ โดยค่าเฉลี่ยในสดมภ์ (column) เดียวกันที่มีอักษรภาษาอังกฤษต่างกัน แสดงค่าประสิทธิภาพการยับยั้งราที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)



ภาพที่ 1. การเจริญของคอโลนีรา *C. gloeosporioides* บนผลพริกชี้ฟ้า ในภาพแสดงการเจริญของคอโลนีราบนผลพริกชี้ฟ้าที่เป็นตัวควบคุม (a) การเจริญของราบนผลพริกชี้ฟ้าที่ถูกยับยั้งโดยยีสต์ *I. orientalis* ER1 (b) *P. guilliermondii* R13 (c) *C. quercitrusa* L2 (d) และ*C. musae* R6 (e) เส้นตรงตามขวางแสดงความยาว 1 เซนติเมตร (ชุดควบคุมคือผลพริกชี้ฟ้าที่ใส่น้ำกลั่นฆ่าเชื้อแทนการใช้เซลล์ยีสต์)

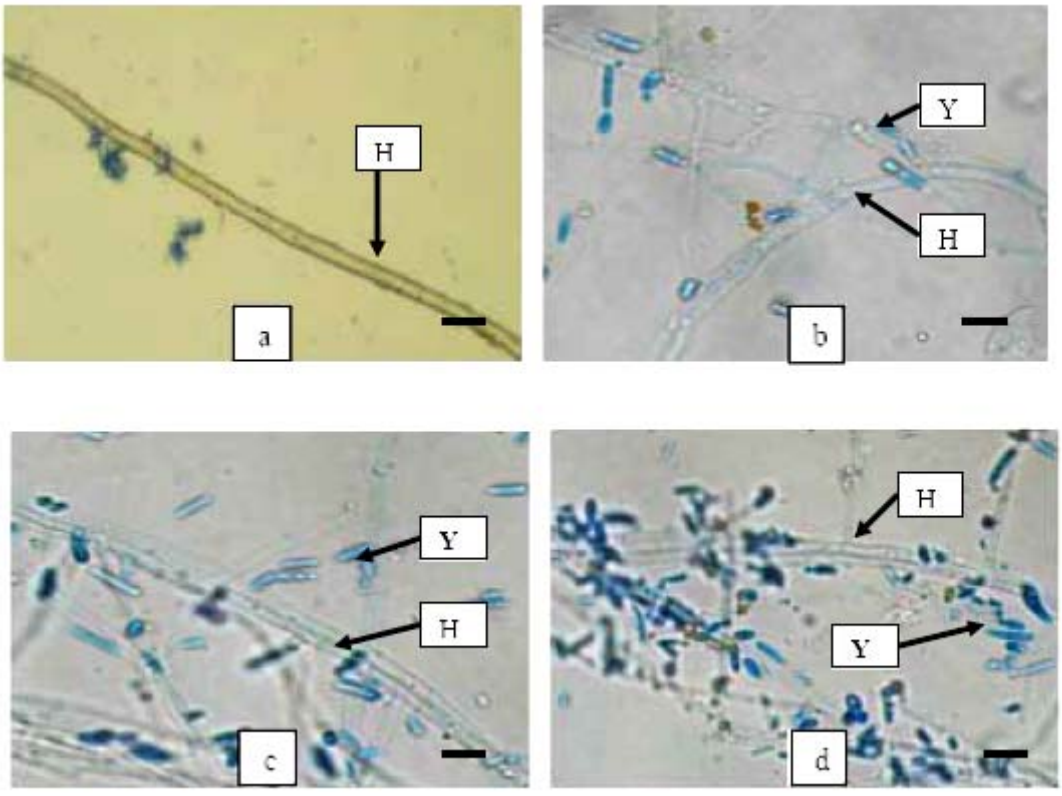
ตารางที่ 2. เส้นผ่านศูนย์กลางการเจริญของคอโลนีรา *C. gloeosporioides* บนผลพริกชี้ฟ้าในสภาวะที่ใส่ปริมาณเซลล์ยีสต์เท่ากับ 5×10^6 เซลล์/มิลลิลิตร และราเท่ากับ 5×10^4 สปอร์/มิลลิลิตร

สายพันธุ์ยีสต์	เส้นผ่านศูนย์กลางคอโลนีรา (ซม.)	ประสิทธิภาพการควบคุมโรค (ร้อยละ) *
P. guilliermondii R13	0.37	76.88a
C. musae R6	0.60	62.50d
I. orientalis ER1	0.40	75.00b
C. quercitrusa L2	0.43	73.13c
ชุดควบคุม	1.60	0

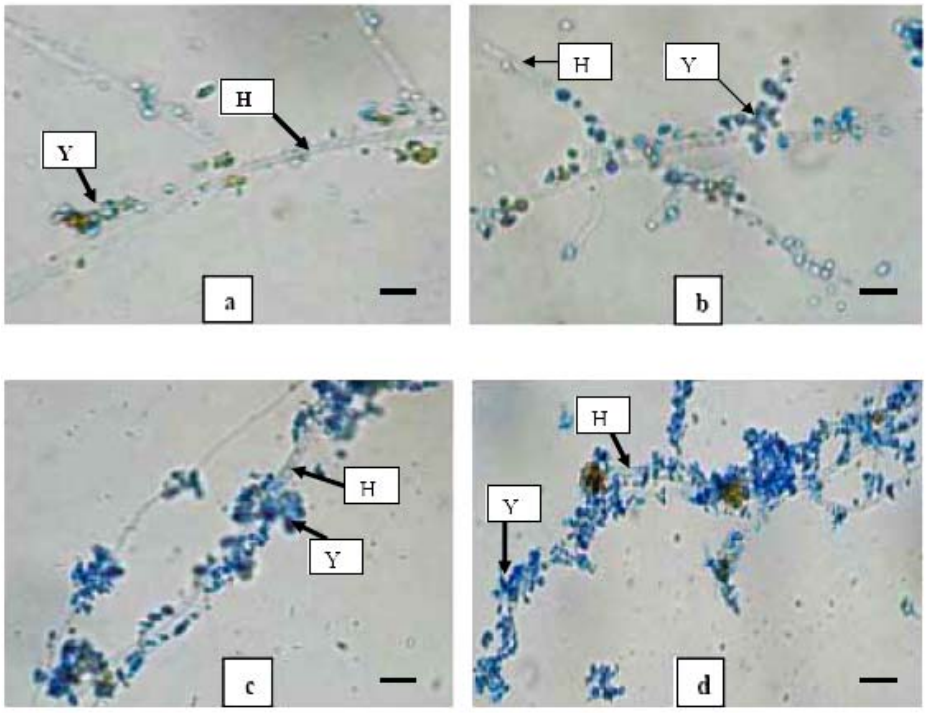
*ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ โดยค่าเฉลี่ยในสดมภ์เดียวกันที่มีอักษรภาษาอังกฤษต่างกัน แสดงค่าประสิทธิภาพการยับยั้งราที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) (ชุดควบคุมคือผลพริกชี้ฟ้าที่ใส่น้ำกลั่นฆ่าเชื้อแทนการใช้เซลล์ยีสต์)

3. ปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์ยีสต์ 2 สายพันธุ์กับเส้นใยของราก่อโรคแอนแทรคโนสในน้ำสกัดจากผลพริกชี้ฟ้าแดง

จากการตรวจสอบปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์ยีสต์กับโครงสร้างเส้นใยราในน้ำสกัดจากผลพริกชี้ฟ้าแดง ซึ่งจำนวนเซลล์และสายพันธุ์ของยีสต์ที่นำมาทดสอบเป็นสายพันธุ์และจำนวนเซลล์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการเจริญของคอโลนีราในจานเพาะเชื้อคือ *P. guilliermondii* R13 และ *I. orientalis* ER1 ที่จำนวนเซลล์ 5×10^6 เซลล์/มิลลิตร โดยพบว่าการเกาะกันระหว่างเซลล์ยีสต์ *I. orientalis* ER1 และ *P. guilliermondii* R13 กับโครงสร้างเส้นใยรา *C. gloeosporioides* จะเริ่มสังเกตเห็นการเกาะกันเมื่อบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนกระทั่งที่เวลา 48 ชั่วโมง จะพบเซลล์ยีสต์เกาะเป็นกลุ่มบนเส้นใยรา *C. gloeosporioides* โดยมีความหนาแน่นมากที่สุด (ภาพที่ 2 และ ภาพที่ 3)



ภาพที่ 2. การเกาะกันระหว่างเซลล์ยีสต์ *I. orientalis* ER1 กับโครงสร้างเส้นใยรา *C. gloeosporioides* โดยใช้ปริมาณเซลล์ยีสต์เท่ากับ 5×10^6 เซลล์/มิลลิตร บ่มเป็นเวลา 12 ชั่วโมง (a) เวลา 24 ชั่วโมง (b) เวลา 36 ชั่วโมง(c) และเวลา 48 ชั่วโมง (d) บันทึกภาพที่กำลังขยาย 400 เท่า (40×) Y คือ เซลล์ยีสต์ และ H คือ ไฮฟา (hypha) เส้นตรงตามขวางแสดงความยาว 5 ไมโครเมตร



ภาพที่ 3. การเกาะกันระหว่างเซลล์ยีสต์ *P. guilliermondii* R13 กับโครงสร้างเส้นใยรา *C. gloeosporioides* โดยใช้ปริมาณเซลล์ยีสต์เท่ากับ 5×10^{6}เซลล์/มิลลิลิตร บ่มเป็นเวลา 12 ชั่วโมง (a) เวลา 24 ชั่วโมง (b) เวลา 36 ชั่วโมง(c) และเวลา 48 ชั่วโมง (d) บันทึกภาพที่กำลังขยาย 400 เท่า (40X) Y คือ เซลล์ยีสต์ และH คือไฮฟา เส้นตรงตามขวางแสดงความยาว 5 ไมโครเมตร

อภิปรายผลการศึกษา

ความสัมพันธ์ระหว่างรูปร่างและโครงสร้างของรา *C. gloeosporioides* ต่อการเกิดโรคแอนแทรคโนสในผลพริก พบว่าราชนิดนี้สร้างอะเพรสซอเรียม (appressorium) ซึ่งเป็นโครงสร้างที่ช่วยแทงลงไปในเนื้อเยื่อพืช ทำให้เส้นใยของราชนิดนี้สามารถเจริญในส่วนเนื้อเยื่อพืชชั้นในได้ดี และสามารถสร้างสปอร์รูปรีจำนวนมากจากอะเซอวูลัส (acervulus) ทำให้โรคสามารถแพร่กระจายได้มากโดยลมและฝน ซึ่งการนำเมล็ดพริกที่มีสปอร์ราชนิดนี้อยู่ไปปลูกจะทำให้เกิดโรคแพร่กระจายไปได้อย่างรวดเร็ว สำหรับการเจริญของราชนิดนี้เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 28-33° ซ และมีความชื้นสูง (ประมาณร้อยละ 95) ซึ่งเป็นสภาวะของภูมิอากาศในเขตร้อนชื้น เช่น ประเทศไทย มาเลเซีย อินเดีย และในเขตอเมริกาใต้ (Mehrotra and Aggawal, 2003) อัตราการเจริญของยีสต์เมื่อเปรียบเทียบกับรา โดยทั่วไปยีสต์สามารถเจริญได้เร็วกว่ารามาก การขยายพันธุ์โดยการแตกหน่อของยีสต์ทำให้ยีสต์สามารถเพิ่มจำนวนครอบคลุมพื้นที่ได้เร็วกว่ารา และใช้อาหารจากสิ่งแวดล้อมได้อย่างรวดเร็ว ดังนั้นเมื่อยีสต์อยู่ในสภาพแวดล้อมเดียวกับราจะทำให้เกิดการแก่งแย่งอาหารกับรา (competition for nutrients) รวมทั้งยีสต์ *P. guilliermondii* R13 ที่นำมาศึกษาวิจัยในครั้งนี้ พบว่าสามารถสร้างเอนไซม์ที่สามารถย่อยผนังเซลล์ราได้คือ เอนไซม์ไคติเนส (chitinase) และบีตา-1,3-กลูแคเนส (β-1,3-glucanase) (Chanchaichaovivat et

(Chanchaichaovivat et al., 2007) เป็นพวกที่พบตามผิวพืช (epiphytic yeasts) และเป็นพวกแซโพรไฟต์ (saprophyte) จึงใช้สารอาหารจากเซลล์พืชที่ตายแล้ว โดยไม่เข้าทำลายเซลล์พืชที่ยังมีชีวิตอยู่ (Droby et al., 1989) และยีสต์ไม่สร้างสารปฏิชีวนะปลดปล่อยออกมาเหมือนกับที่พบในราและแบคทีเรีย ซึ่งอาจมีผลต่อสุขภาพของผู้บริโภคได้ ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีงานวิจัยที่พยายามศึกษาพัฒนาการใช้ยีสต์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคพืชแทนการใช้สารเคมี และเป็นอีกทางเลือกหนึ่งนอกจากการใช้แบคทีเรียและราในการควบคุมโรคพืช (Arras et al., 2002; Fravel, 2005; Druvefors, 2004) ซึ่งยีสต์หลายชนิดได้ถูกแยกจากผักและผลไม้จากหลายแหล่ง โดยมีผู้พบว่า *I. orientalis* สายพันธุ์ 16C2 และ 2C2 ที่แยกได้จากองุ่น (*Vitis vinifera* L. cv. Negroamaro) สามารถลดการเจริญของ *Aspergillus carbonarius* (Bainer) Thom. และ *Aspergillus niger* Tiegh. ได้ (Bleve et al., 2006) ยีสต์ชนิด *C. musae* isolate 18 สามารถควบคุมการเจริญของ *Botrytis cinerea* Fr. ที่ก่อโรคในสตรอเบอร์รี่ (strawberries, *Fragaria, x ananassa* Duch. cv. Sweet Charlie) (EI-Neshawy and Shetaia, 2003) และพบว่า *P. guilliermondii* หลายสายพันธุ์ มีความสามารถควบคุมโรคที่เกิดจากราหลายชนิดในผลส้ม องุ่น แอปเปิ้ล ลูกแพร์ (pear) และผลสตรอเบอร์รี่ (Droby et al., 1997; Arras et al., 1999; Lima et al., 1999) แต่ไม่พบรายงานการควบคุมรา *C. gloeosporioides* ในผลพริกชี้ฟ้า ซึ่งจากผลวิจัยในครั้งนี้ *P. guilliermondii* R13 มีประสิทธิภาพควบคุมรานี้ได้ดี (ร้อยละ 76.88) จึงมีโอกาสสูงที่จะถูกใช้เป็นจุลินทรีย์ควบคุมโรคแอนแทรคโนสในผลพริกชี้ฟ้าหลังการเก็บเกี่ยวโดยอาจใช้การสเปรย์ (spray) เซลล์ยีสต์ ใช้เคลือบบนผิวของ

โดยทั่วไปพืชที่เกิดรอยแผลเชื้อก่อโรคพืชจะสามารถเจริญเข้าภายในเนื้อเยื่อได้รวดเร็วขึ้นและใช้สารอาหารที่หลั่งออกมารอบๆ บาดแผลในการเจริญ ซึ่งในงานวิจัยนี้พบว่ารา *C. gloeosporioides* สามารถทำให้รอยแผลขยายตัวกว้างขึ้นมากอย่างเห็นได้ชัด เมื่อเปรียบเทียบกับรอยแผลที่มีการใส่ยีสต์ทั้ง 4 สายพันธุ์ลงไปด้วย จึงแสดงให้เห็นว่ามีการยับยั้งราเกิดขึ้น โดยที่ยีสต์ทั้ง 4 สายพันธุ์เป็นยีสต์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรคในผลพริก

สรุปผลการศึกษา

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งโรคแอนแทรคโนสในผลพริกชี้ฟ้าแดงที่เกิดจากรา *C. gloeosporioides* โดยยีสต์ 4 สายพันธุ์ คือ *P. guilliermondii* R13 *C. musae* R6 *I. orientalis* ER1 และ *C. quercitrusa* L2 พบว่ายีสต์สายพันธุ์ R13 และ ER1 ให้ผลการยับยั้งโรคได้มากกว่าอีก 2 สายพันธุ์ คือ R6 และ L2 โดยสายพันธุ์ R13 ให้ผลการยับยั้งได้ดีทั้งในการทดสอบบนจานเพาะเชื้อที่บรรจุอาหาร PDA และที่ผลพริกชี้ฟ้าแดง ซึ่งประสิทธิภาพการยับยั้งสูงสุดในผลพริกชี้ฟ้าแดงเท่ากับร้อยละ 76.88 รองลงมาคือ ER1ให้ผลการยับยั้งร้อยละ 75.00 และประสิทธิภาพของการยับยั้งโรคของยีสต์ทั้ง 4 สายพันธุ์ จะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์ที่ใช้ ซึ่งพบประสิทธิภาพการยับยั้งสูงสุดเมื่อใช้เซลล์ยีสต์เท่ากับ 5×10^{6}เซลล์/มิลลิลิตร

เอกสารอ้างอิง

มณีฉัตร นิกรพันธ์. (2541). **พริก**. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.

ลักษณา วรรณภีร์. (2536). **การผลิตการตลาดพริก : โรคแมลงศัตรูพริกและการป้องกันกำจัด.** กรมส่งเสริมการเกษตร.

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.

Arras, G., Scherm, B., and Migheli, Q. (2002). Improving biocontrol activity of *Pichia guillermondii* against post-harvest decay of oranges in commercial packing-houses by reduced concentrations of fungicides. **Biocontrol Science Technology** 12 (5): 547-553.

Bleve, G., Grieco, F., Cozzi, G., Logrieco, A., Visconti, A. (2006). Isolation of epiphytic yeasts with potential for biocontrol of *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* on grape. **International Journal Food of Microbiolgy** 108: 204–209.

Chanchaichaovivat, A., Ruenwongsa, P., 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.

Chanchaichaovivat, A., Ruenwongsa, P., Panijpan, B. (2008) . Screening and identification of yeast strains from fruits and vegetables: potential for biological control of postharvest chilli anthracnose (*Colletotrichum capsici*). **Biological Control** 43: 40-43.

Dänet, A. (2005). *Pollution database: Chlorine and inorganic compounds (as H+Cl).* Retrieved August 8, 2006, from Leonardo da Vinci Web site: http://pollution. unibuc.ro/?substance=51

Droby, S., Chalutz, E., Wilson, C.L., and Wisniewski, M. (1989). Characterization of the biocontrol activity of *Debaryomyces hansenii* in the control of *Penicillium digitatum* on grapefruit. **Canadian Journal of Microbiology** 35: 794-800.

Droby, S., Hofstein, R., Wilson, C.L, Wisniewski, M., Fridlender, B., et al. (1993). Pilot testing of *Pichia guilliermondii*: a biocontrol agent of postharvest diseases of citrus fruit. **Biological Control** 3: 47-52.

Droby, S., Wisniewski, M.E., Cohen, L., Weiss, B., Touitou, D., et al. (1997). Influence of CaCl2 on *Penicillium digitatum*, grape fruit peel tissue, and biocontrol activity of *Pichia guilliermondii*. **Phytopathology** 87: 310–315.

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

El-Neshawy, S., Shetaia, Y.M.H. (2003). Biocontrol capability of *Candida* spp. against Botrytis rot of strawberries with respect to fruit quality. **Acta Horticulturae** 604: 727–733.

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

Giatgong, P. (1980). **Host index of plant diseases in Thailand** (2nd ed.). Department of Agriculture, Ministry of Agriculture and Co-operatives, Bangkok, Thailand.

He, D., Zheng, X.D., Yin, Y.M., Sun, P., and Zhang, H.Y. (2003). Yeast application for controlling apple postharvest diseases associated with *Penicillium expansum*. **Botanica Bulletin Academia Sinic** 44: 211-216.

Janisiewicz, W.J., and Korsten, L. (2002). Biological control of postharvest diseases of fruits. **Annual Review of Phytopathology** 40: 411-441.

Lima, G., Arru, S., De Curtis, F., Arras, G., (1999). Influence of antagonist, host fruit and pathogen on the biological control of postharvest fungal diseases by yeasts. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology** 23: 223–229.

Mehrotra, R.S., Aggarwal, A. (2003). **Plant pathology** (2nd ed.). Tata McGraw-Hill, New Delhi.

Smith, R., Hartz, T., Aguiar, J., and Molinar, R. (1998). **Chile pepper production in California** (Reported No. 7244). U.S.A.: UC ANR

Wisniewski, M.E., Biles, C., Droby, S. (1990). The use of the yeast *Pichia guilliermondii* as a biocontrol agent: characterization of attachment to *Botrytis cinerea*. In: Wilson, C.L., Chalutz, E. (eds.). **Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables**. Workshop Proceedings. Agricultural Research Service document ARS-92. US Department of Agriculture, Washington, DC, pp. 167–183.