การใช้ยีสต์ควบคุมโรคพืช

อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์

สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา กรุงเทพฯ 10600
E-mail: arun_46@hotmail.com

รับบทความ: 15 เมษายน 2553 ยอมรับตีพิมพ์ : 12 พฤษภาคม 2553

บทคัดย่อ

ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญในด้านอุตสาหกรรม การแพทย์ เกษตรกรรม และ สิ่งแวดล้อม การใช้ยีสต์ในทางเกษตรกรรมรูปแบบหนึ่ง คือ การนำยีสต์มาใช้ควบคุมโรคพืช ซึ่งต้องคำนึงถึงภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมในการควบคุมจุลินทรีย์โรคพืชโดยไม่แพร่กระจายไปเกิดโรคในพืชชนิดอื่น ๆ การใช้ยีสต์ควบคุมโรคพืชอาจใช้ร่วมกับจุลินทรีย์ต่างชนิดกันหรือปรับปรุงพันธุ์ยีสต์ให้ควบคุมโรคพืชได้ดีขึ้น นอกจากนี้การใช้ยีสต์ควบคุมโรคพืชยังเป็นการลดการใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะต่าง ๆ ที่นำมาใช้ในทางเกษตรกรรม

คำสำคัญ: ยีสต์ โรคพืช การควบคุมโดยชีววิธี เกษตรกรรม การปรับปรุงพันธุ์

Using of Yeast for Biological Control

Arun Chanchaichaovivat

Program Study of Microbiology, Faulty of Science and Technology, Bansomdejchaopraya Rajabhat University, Bangkok
E-mail: arun_46@hotmail.com

Abstract

Yeast is an important microorganism that uses in industry, medicine, agriculture and environment. A method to use the yeast in agriculture is to control the plant diseases. The appropriate environment for using yeast to control plant pathogens, not disperse to induce other plant diseases has been concerned. The plant disease control may use with other microbes, and the yeast improvement for high efficiency to control plant disease is a method used to control plant diseases. In addition, the control of plant diseases using yeasts uses to reduce the chemical and antibiotics in agricultures.

Keywords: yeast, plant disease, biological control, agriculture, strain improvement

บทนำ:

ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่มนุษย์นำมาใช้ประโยชน์มากกว่าพันปีโดยฌฉพาะทางด้านอาหาร และผลิตเอทานอลเชื้อเพลิง นอกจากนั้นยีสต์ได้ถูกนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ เพิ่มมากขึ้น เช่น นำมาใช้เป็นเซลล์ต้นแบบการวิจัยเซลล์ยูคาริโอต โดยเฉพาะการวิจัยค้นคว้าทางด้านการแพทย์ เป็นเซลล์ผู้ให้อาศัย (host) สำหรับยีนที่สนใจจากมนุษย์หรือสัตว์เพื่อใช้เป็นแหล่งผลิตสารที่มีคุณค่า

ยีสต์บางชนิดใช้ในการบำบัดมลพิษในสิ่งแวดล้อม (bioremediation) และการผลิตเอนไซม์ที่หลั่งออกมานอกเซลล์ (extracellular enzyme) ในปัจจุบันยีสต์เริ่มมีบทบาทเพิ่มมากขึ้นทางด้านการเกษตร ได้แก่ การนำมาใช้ควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี (biological control) นอกเหนือจากการใช้รา (mold) และแบคทีเรีย (bacteria) ข้อดีของการใช้ยีสต์ควบคุมโรคพืชคือ ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่มักไม่สร้างสารปฏิชีวนะ (antibiotic) ซึ่งอาจมีผลต่อผู้บริโภคที่มีภูมิคุ้มกันไว (hypersensitivity) ทำให้เกิดอาการแพ้ซึ่งอาจรุนแรงถึงเสียชีวิตดังเช่นที่พบในการใช้รา หรือแบคทีเรีย

กลไกการควบคุมโรคพืชโดยยีสต์

ยีสต์มีความสามารถในการควบคุมหรือยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคพืชได้หลายวิธี ซึ่งจากการวิจัยที่ผ่านมาข้อมูลแสดงกลไกการควบคุมโรคของยีสต์สามารถแบ่งได้ ดังนี้

1. การเจริญแก่งแย่งอาหารและพื้นที่กับเชื้อก่อโรคพืช (competition for nutrients and space)

โรคพืชส่วนหนึ่งเกิดจากเชื้อรา เช่น *Botrytis cinerea Penicillium digitatum* และ *Rhizopus stolonifer* (ตาราง 1) ซึ่งการเจริญของยีสต์โดยปกติแล้วจะเจริญได้เร็วกว่ารา และเจริญครอบคลุมพื้นที่ของพืชได้เร็วกว่า ดังนั้นสารอาหารบริเวณผิวของพืชจึงไม่เหลือให้กับราในการเจริญขยายพันธุ์ ยีสต์ที่ประสบความสำเร็จในการแก่งแย่งอาหารกับราก่อโรค เช่น *Pichia guilliermondii Cryptococous laurentii* และ *Sporobolomyecs roseus* (ตาราง 1) ซึ่งยีสต์ส่วนใหญ่ที่ใช้ในการควบคุมโรคพืชสามารถคัดแยกได้จากผิวของพืช ยีสต์เหล่านี้ดำรงชีวิตอยู่ร่วมกับพืชแบบพึ่งพา (commensalism) หรือเป็นผู้ย่อยสลาย (saprophytism) โดยไม่เข้าทำลายเซลล์พืช รวมทั้งยีสต์สามารถเจริญปกคลุมรอยแผลของพืชทำให้เส้นใยราไม่สามารถชอนไชลงในเนื้อเยื่อพืชได้ (Janisiewicz et al., 2000)

ตาราง 1 สายพันธุ์ยีสต์ที่ใช้ควบคุมโรคพืช (Druvefors, 2004)

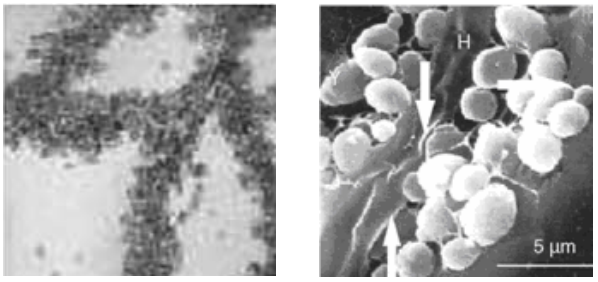
สายพันธุ์ยีสต์	ชนิดของพืช	ราก่อโรคพืช
Cryptococcus albidus	bean, tomato, strawberry, *in vitro*	*Bortytis cinerea; Penicillim glabrum*
Cryptococcus laurentii	apples	*Penicillium expansum; B. cinerea*
Debaromyces hansenii	oranges, apples, grapefruit	*P. digitatum*
Filobasidium floriforme	apples	*B. cinerea*
Kluyveromyces marxianus	*in vitro*	*P. glabrum*
Metschnikowia pulcherrina	*in vitro*, apple	*P. glabrum* *P. expansum* *B. cinerea*
Pichia burtonii	seed	*Penicillium verrucosum*
Pichia guilliermondii	tomato, soy bean, grapefruit, apple	*B. cinerea ; Aspergillus flavus ; P. digitatum*
Pichia membranaefaciens	grapevine	*B. cinerea*
Rhodotorula glutinis	bean and tomato plants, apples	*B. cinerea* *P.expasum*
Saccharomyces cerevisiae	*Pinus sylvestris, in vitro*	*Wood decaying fungi, Alternaria alternate*
Sporidiobolus salmonicolour	apples	*B. cinerea*
Yarrowwia lipolytica	apples	*B. cinerea*

2. ภาวะปฏิปักษ์ (Antagonism)

ยีสต์บางชนิด เช่น *Pichia guilliermondii* และ *Candida oleophila* สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์รา (Chalutz and Droby, 1998) ที่พบมากได้แก่ บีตา-1, 3-กลูแคเนส (β-1, 3-glucanase) และเอนไซม์ไคติเนส (chitinase) การทำงานของเอนไซม์ย่อยสลายโครงสร้างของผนังเซลล์รานี้สามารถสังเกตได้จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (scanning electron microscope, SEM) โดยจะพบการเกาะติดของเซลล์ยีสต์กับเส้นใยราที่ไม่หลุดออกจากกันได้โดยง่าย และมักพบการเสียหายของเส้นใยราบริเวณการเกาะติดนี้เสมอ (ภาพที่ 1) นอกจากนี้ยีสต์บางสายพันธุ์สามารถสร้างสารคิลเลอร์ท็อกซิน (killer toxin) ที่มีผลในการทำลายฟังไจต่างชนิดได้ เช่น ยีสต์ *Pichia anomala Pichia burtonii Debaromyces hansenii* และ *Saccharomyces cerevisiae* (Druvefors, 2004) เป็นต้น

3. การชักนำให้พืชเกิดความต้านทาน (induced resistance in the host tissue)

เซลล์ยีสต์หลายชนิดเมื่ออยู่รวมกับพืชจะมีบทบาทในการชักนำการสร้างสารของพืชที่มีฤทธิ์ในการต้านทานเชื้อก่อโรค กระบวนการกระตุ้นสารต้านทานของพืชโดยยีสต์จะมีลักษณะเป็นวิถี (pathway) ที่ซับซ้อน เช่น การใช้ยีสต์กระตุ้นให้เกิดการสร้างสารเอธิลีน (ethylene) ในผลอ่อนที่มีผลต่อเนื่องให้เกิดการสร้างเอนไซม์ฟีนิลอะลานีนแอมโมเนียมไลเอส (phenyl alaninammoniumlyase) ขึ้นมา (Wisniewski et al., 1991) และเอนไซม์นี้เป็นเอนไซม์ที่สำคัญในกระบวนการสังเคราะห์กลุ่มสารยับยั้งเชื้อก่อโรค ได้แก่ สารฟีนอล (phenol) ไฟโตอะเล็กซิน (phytoalexin) และลิกนิน (lignin) กลุ่มสารไฟโตอะเล็กซินที่มีบทบาทในการป้องกันการบุกรุกของเชื้อก่อโรคพืช ได้แก่ สโคพาโรน (scoparon) และสโคโพเลทิน (scopoletin) นอกจากนี้จากการวิจัยเมื่อใช้ *Saccharomyecs roseus* และ *Cryptococcus laurentii* เคลือบผิว หรือพื้นที่ผิวของผลแอปเปิ้ล พบว่าจะทำให้สปอร์โคนิเดียของราก่อโรค *Botrytis cinerea* เกาะติดกับพืชหรืองอกเส้นใยได้น้อยลง เนื่องจากยีสต์มีกลไกส่งเสริมการสร้างสารยับยั้งราบิวทิลอะซีเตท (bulylacetate) ซึ่งเป็นสารหอมระเหย (volatile aroma) ที่ผลิตโดยผลแอปเปิ้ล (Filonow, 2001) และเซลล์ยีสต์ที่เจริญอยู่บริเวณรอยแผลของพืช สามารถกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ทำลายเชื้อก่อโรคได้ที่สำคัญคือ บีตา-1, 3-กลูแคเนส โคติเนส และเพอร์ออกซิเดส (peroxidase) (Ippolito et al., 2000)



(a) (b)

ภาพที่ 1 การเกาะติดของเซลล์ยีสต์ *Pichia membranefaciens* (Y) กับเส้นใยรา *Moniliniafructicola* (H) ที่ก่อให้เกิดโรคเน่าในผลแอปเปิ้ล (a, กำลังขยาย 100×) และร่องรอยความเสียหายของเส้นใยรา (ลูกศร) จากการทำลายของยีสต์ (b, ภาพจาก SEM) (Chan and Tian, 2005)

การผลิตเซลล์ยีสต์เพื่อใช้ควบคุมโรคพืช

การผลิตเซลล์ยีสต์ในระดับการค้าเพื่อใช้ทดแทนสารเคมีกำจัดศัตรูพืชนั้นพบว่าจำนวนเซลล์ยีสต์มีผลต่อประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อก่อโรคพืชค่อนข้างมาก (Hofstein et al., 1994) ดังนั้นจึงต้องพยายามหาวิธีการเพาะเลี้ยงยีสต์ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเซลล์ในระดับใหญ่ ซึ่งปัจจัยที่ต้องคำนึงถึงคือ ชนิดของสารอาหารหลักในการเพาะเลี้ยง ได้แก่ แหล่งคาร์บอน (carbon source) และแหล่งไนโตรเจน (nitrogen source) ที่สามารถสนับสนุนการเจริญเพื่อผลิตมวลเซลล์ (cell mass) ให้ได้มากที่สุด อย่างไรก็ตามต้องคำนึงถึงต้นทุนของสารอาหารที่นำมาใช้เพาะเลี้ยงด้วย ซึ่งวัตถุดิบที่ใช้เป็นแหล่งสารอาหารไม่ควรมีราคาแพงหรือหายาก สารอาหารที่ใช้เลี้ยงยีสต์ได้ผลดี เช่น สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ซูโครส (sucrose) และโมลาส (molasses) (Costa et al., 2001) เป็นต้น

การเพิ่มประสิทธิภาพของเซลล์ยีสต์ในการควบคุมโรคพืชและการยืดอายุในการเก็บผลิตภัณฑ์ยีสต์ให้นานขึ้นนับว่าเป็นสิ่งสำคัญมากต่อการนำยีสต์ไปใช้งาน และการนำออกขายในเชิงการค้า เทคนิคที่นิยมใช้ได้แก่ การผสมสารตัวช่วยลงในผลิตภัณฑ์เซลล์ยีสต์เพื่อส่งเสริมประสิทธิภาพการยับยั้งโรคและป้องกันเซลล์ยีสต์ไม่ให้ตายได้ง่าย (Janisiewicz et al., 1998) สารที่นำมาช่วยเสริมการทำงาน

ของยีสต์ ได้แก่ เกลือแคลเซียม (calcium salts) กลีเซอรอล (glycerol) ทรีฮาโลส (trehalose) โซเดียมอัลจิเนท (sodium alginate) คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (carboxymethylcellulose) และไคโตซาน (chitosan) โดยเฉพาะไคโตซานมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของราได้ดี และถูกใช้เพื่อยับยั้งราก่อโรคในผลไม้หลายชนิด เช่น สตอเบอรี (strawbery) แอปเปิ้ล (apple) ลูกแพร์ (pear) เป็นต้น (El-Ghaouth el al., 1992; 2000) นอกจากนี้ การใช้สารเคลือบผลไม้ เช่น แว็กซ์ (wax) หรือ เรซิน (resin) ที่ผลิตได้จากแมลงมาใช้ร่วมกับเซลล์ยีสต์เพื่อป้องกันผิวของผลไม้จากการทำลายของราก่อโรค พบว่าทำให้การอยู่รอดของยีสต์ที่เจริญบนผิวของผลไม้มีชีวิตอยู่ได้นานขึ้น และทำให้ผลการยับยั้งโรคดียิ่งขึ้น (Chalutz and Droby, 1998)

ผลิตภัณฑ์เซลล์ยีสต์ควรเก็บไว้ได้ไม่น้อยกว่า 6 เดือน โดยทั่วไปควรใช้ได้ 2 ปี การเก็บยีสต์ไว้ที่อุณหภูมิต่ำ จะช่วยรักษาการอยู่รอดของยีสต์ได้ (Pusey, 1994) และควรป้องกันเซลล์ยีสต์โดยการเคลือบเซลล์ด้วยนมพร่องมันเนย (skin milk) เข้มข้นร้อยละ 10 หรือนมพร่องมันเนยกับเพปโทน (peptone) เข้มข้นร้อยละ 1 จะให้ผลการเก็บรักษาเซลล์ยีสต์ได้ดี นอกจากนี้อาจใช้แลคโตส (lactose) กลูโคส (glucose) ฟรักโทส (fructose) หรือซูโครส (sucrose) แทนได้ด้วย (Abadias et al., 2001a) อย่างไรก็ตามพบว่าการทำให้เซลล์แห้งโดยใช้ความเย็นจัด (freeze-dried cells) จะทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของยีสต์ลดลง (Abadias et al., 2001b)

การปรับปรุงพันธุ์ยีสต์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการควบคุมโรค

ในบางสภาวะแวดล้อมของการนำยีสต์มาใช้งานอาจมีข้อจำกัดในการควบคุมเชื้อก่อโรคพืชอยู่บ้าง กล่าวคือยีสต์ที่ใช้อาจมีประสิทธิภาพในการยับยั้งโรคได้ไม่เพียงพอหรือมีประสิทธิภาพไม่คงที่ ดังนั้นจึงได้มีความพยายามเพิ่มความสามารถของยีสต์ในสภาวะการใช้งานจริงโดยการปรับปรุงสายพันธุ์ยีสต์ให้ดีขึ้น เช่น การทำให้เซลล์ยีสต์เกิดการกลาย (mutagenesis) โดยใช้รังสี หรือใช้เคมีก่อการกลาย (mutagen) การกระตุ้นการทำงานด้วยสารยับยั้ง หรือใช้สารปฏิชีวนะ (antibiotics) การสร้างลูกผสมโดยเทคนิคหลอมรวมโพรโทพลาสต์ (protoplast fusion) หรือการถ่ายทอดยีน (genetic transformation) โดยการใช้เทคนิคพันธุวิศวกรรม (genetic engineering) ที่พบว่าช่วยเสริมความสามารถของยีสต์จากธรรมชาติได้ เช่น การถ่ายยีนควบคุมการสร้างเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อก่อโรค เช่น เอนไซม์ โปรตีเอส (proteases) กลูแคเนส และไคติเนส เข้าสู่เซลล์ยีสต์ที่ไม่สามารถสร้างเอนไซม์เหล่านี้ได้ (Chenin et al., 1997; De la Cruz et al., 1995) การใส่ยีนควบคุมการสร้างสารต่อต้านราเซอโครพินเอ (cercropin A) ใน *Saccharomyces cerevisiae* เพื่อควบคุมการงอกของสปอร์ *Colletotrichum coccodes* และควบคุมการเน่าเสียในผลมะเขือเทศ โดยสารนี้จะไม่มีผลต่อสิ่งมีชีวิตอื่น จึงนับว่าเป็นวิธีที่ปลอดภัยในการควบคุมโรค (Jones and Prusky, 2002) นอกจากนี้การเพิ่มประสิทธิภาพของยีสต์ให้สามารถขนส่งสารและใช้สารที่เป็นปัจจัยควบคุมการเจริญของเชื้อก่อโรคได้ดีกว่า เช่น การให้แหล่งไนโตรเจน และแหล่งคาร์บอนที่ยีสต์สามารถนำไปใช้ได้ ก็จะทำให้เพิ่มความสามารถในการแก่งแย่งสารอาหารของยีสต์ต่อเชื้อโรคพืชให้มากขึ้น เช่น การถ่ายทอดยีนควบคุมการสร้างเอนไซม์อะไมเลสในตำแหน่งโพรโมเตอร์ (promoter) ที่เหมาะสม ก็จะทำให้เซลล์ยีสต์ผลิตเอนไซม์อะไมเลสสำหรับย่อยแป้งได้ (Janisiewicz, 1998)

การควบคุมติดตามสายพันธุ์ยีสต์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืชเมื่อถูกนำไปใช้จริงในพื้นที่การเกษตรหรือสถานที่เก็บพืชหลังการเก็บเกี่ยวเป็นอีกสิ่งหนึ่งที่มีความสำคัญในด้านการวิจัยศึกษาความสามารถที่แท้จริงของยีสต์เมื่ออยู่ในสิ่งแวดล้อม วิธีที่ใช้ได้ผลดีคือการใส่ยีนติดตาม (gene marker) ที่สามารถตรวจสอบได้ง่าย เช่น การใส่ยีนโปรตีนเรืองแสงสีเขียว (green fluorescent protein genes) การถ่ายยีนบีตากลูคูโรนิเดส (β-glucuronidase gene) หรือยีนฮีสติดีนออกโซโทรป (histidine auxotroph genes) ใน *Candida oleophila* (Nigro et al., 1999; Chand-Goyal et al., 1998) โดยสายพันธุ์ยีสต์ที่ได้รับการถ่ายทอดยีนติดตาม ควรมีประสิทธิภาพการควบคุมโรคพืชเทียบเท่ากับสายพันธุ์ปกติ (wild-type)

การจัดสภาวะแวดล้อมให้เหมาะสมกับการควบคุมโรค

นอกจากการจัดสภาวะของสถานที่เก็บผลผลิตพืช เช่น การควบคุมอุณหภูมิ ความชื้น และปริมาณอากาศ ให้มีความเหมาะสมเพื่อรักษาคุณภาพของพืชผลแล้ว อาจต้องมีการเสริมสารอาหารเพื่อสนับสนุนการทำงาน

ของยีสต์ควบคุมโรคพืชด้วย เพื่อให้ประสิทธิภาพของการควบคุมโรคได้ผลมากยิ่งขึ้นซึ่งสามารถทำได้โดยการเพิ่มสารอาหารที่ส่งเสริมการเจริญองยีสต์ แต่เชื้อก่อโรคไม่สามารถนำไปใช้ได้ ได้แก่ สารประกอบไนโตรเจน ตัวอย่างที่ใช้คือ แอล-แอสพาราจีน (L-asparagine) และแอลโพรลีน (L-proline) ในการควบคุมรา *Penicillium expansum* บนผลแอปเปิ้ล (Janisiewicz et al., 1992) และการให้แอล-กลูตามีน (L-glutamine) กับยีสต์ *Mitschnikowia pulcherrima* ในการเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งราก่อโรค *Botrytis cinerea* นอกจากนี้การใช้สารอะนาล็อค (analogue) ของน้ำตาลที่ยีสต์สามารถใช้ได้มาควบคุมโรคแต่มีผลยับยั้งการเจริญของราก่อโรค ที่ได้ผลเป็นที่น่าพอใจ คือ 2-ดีออกซี-ดี-กลูโคส (2-deoxy-D-glucose) โดยนำมาใช้ในการควบคุมราก่อโรคเน่าที่เกิดจากรา *Penicillium expansum* ของผลแอปเปิ้ล พีช (peach) และส้ม ซึ่งยีสต์สามารถทนต่อความเป็นพิษของสารอะนาล็อคนี้ได้ เช่น ยีสต์ *Candida saitoata* เป็นต้น (El-Ghaouth et al., 1997) และการใส่สารอาหารจำเป็นให้กับยีสต์ที่ใช้ควบคุมโรคพืชก็สามารถส่งเสริมการสร้างกลุ่มเอนไซม์ที่ย่อยผนังเซลล์ราได้อีกด้วย (Wisniewski et al., 1991)

เทคนิคการนำยีสต์ไปใช้ควบคุมโรคพืช

ในบางครั้งการใช้ยีสต์เพียงปัจจัยเดียวในการควบคุมโรคพืชอาจไม่เพียงพอเนื่องจากยีสต์ที่ใช้มีความสามารถในการควบคุมโรคค่อนข้างแคบ (narrow range of activity) หรือสายพันธุ์ยีสต์ที่ใช้มีความจำเพาะต่อชนิดของเชื้อก่อโรคในสภาวะใดสภาวะหนึ่งเท่านั้น ดังนั้นการเพิ่มความสามารถของยีสต์ให้ควบคุมโรคพืชได้กว้างขึ้นและทำงานในสภาวะต่างๆ ได้มากขึ้น (Lima et al., 1999; Wilson et al., 1993) จึงมีความจำเป็นในการนำยีสต์มาใช้ในระดับการค้า ซึ่งสามารถทำได้ดังนี้

1. การใช้ยีสต์ร่วมกับจุลินทรีย์ชนิดอื่นควบคุมโรคพืช

การใช้ยีสต์ร่วมกับจุลินทรีย์อื่นควรคำนึงถึงความสามารถในการเจริญอยู่ร่วมกันได้บนพืชโดยไม่เป็นปฏิปักษ์ต่อกัน ข้อดีของการใช้วิธีนี้คือการที่จุลินทรีย์แต่ละชนิดมี ลักษณะทางพันธุกรรมและมีกลไกในการควบคุมโรคพืชต่างกัน จึงช่วยเสริมสร้างความสามารถซึ่งกันและกันในการยับยั้งโรคพืชที่อาจเกิดจากเชื้อหลายชนิด หรืออยู่ในสภาวะการใช้งานต่าง ๆ โดยไม่ต้องอาศัยการปรับปรุงพันธุ์ด้วยเทคนิคพันธุวิศวกรรมในการถ่ายทอดยีนเข้าสู่เซลล์จุลินทรีย์ชนิดใดชนิดหนึ่ง (Janisiewicz, 1998) ตัวอย่างของความสำเร็จในการใช้จุลินทรีย์ผสมแบบนี้ เช่น การใช้ยีสต์ *Saccharomyecs roseus* ร่วมกับแบคทีเรีย *Pseudomonas syringae* ในการควบคุมรา *Penicillium expansum* ที่ก่อโรคในพืชหลายชนิด (Janisiewicz and Bors, 1995)

2. การใช้ยีสต์ควบคุมโรคพืชก่อนการเก็บเกี่ยว

ในบางครั้งการติดเชื้อของพืชอาจเกิดขึ้นก่อนการเก็บเกี่ยว ดังนั้นการใช้ยีสต์ควบคุมผลไม้หลังการเก็บเกี่ยวอาจได้ผลไม่ดีนัก จึงจำเป็นต้องใช้ยีสต์พ่น (spray) ป้องกันโรคในระยะก่อนการเก็บเกี่ยว ซึ่งสายพันธุ์ยีสต์ที่ใช้ควรมีความสามารถทนต่อสภาวะในแปลงเพาะปลูกได้ดี เช่น ทนต่อรังสีอัลตราไวโอเลต (UV ray) ทนต่อสภาวะที่มีสารอาหารต่ำ ทนอุณหภูมิสูง หรือสภาพแห้งแล้งได้ ตัวอย่างเช่น การใช้ *Candida sake* สายพันธุ์ที่ทนความแห้งในการควบคุมโรคราสีน้ำเงิน (blue mold) บนผลแอปเปิ้ลก่อนการเก็บเกี่ยว (Teixidó et al., 1998) นอกจากนี้อาจใช้จุลินทรีย์ผสม เช่น การใช้ยีสต์ *Aureobasidium pullulans* และแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ในการควบคุมรา *Penicillium expansum* และ *Botrytis cinerea* บนผลแอปเปิ้ลพบว่าได้ผลดีเทียบเท่ากับสารเคมีกันรา (Leibinger et al., 1997)

3. การใช้ยีสต์ร่วมกับวิธีอื่น

วิธีหนึ่งที่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพของการใช้ยีสต์ควบคุมโรคพืชคือการใช้วิธีการต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นวิธีทางกายภาพ ทางเคมี หรือทางชีวภาพ มาช่วยเสริมความสามารถของยีสต์ วิธีทางชีวภาพที่นำมาช่วยได้กล่าวแล้วในข้างต้นคือการใช้จุลินทรีย์ชนิดอื่นทำงานร่วมกับยีสต์ในการควบคุมโรค สำหรับวิธีการทางกายภาพที่แนะนำให้ใช้ได้แก่ การใช้อุณหภูมิต่ำที่เหมาะสมกับการเก็บรักษาพืช เช่น ที่อุณหภูมิในช่วง 7 - 15^{o}ซ โดยที่ยีสต์ยังคงมีประสิทธิภาพการควบคุมโรคได้ ซึ่งที่อุณหภูมิต่ำมักไม่เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อก่อโรคพืช (Spadaro et al., 2002a) นอกจากนี้ควรมีการควบคุมความชื้น (humidity) การถ่ายเทอากาศให้เซลล์ยีสต์และพืชสามารถอยู่รอดได้ การใช้ความร้อน (เช่น การลวก) การฉายรังสีอัลตราไวโอเลต

ให้กับพืชร่วมกับการใช้ยีสต์ทำให้ช่วยลดการเกิดโรคได้มาก (Barkai-Golan and Phillips, 1991; Chalutz et al., 1992) วิธีการทางเคมีที่ศึกษาวิจัยแล้วพบว่าได้ผลดีคือ การใช้สารเคมีที่ไม่เป็นอันตรายร่วมกับการใช้ยีสต์ เช่น การใช้แคลเซียมคลอไรด์ (calcium chloride) ร่วมกับยีสต์ในการควบคุมรา *Penicillium expansum* บนผลแอปเปิ้ล (Janisiewicz, 1998) การใช้โซเดียมไบคาร์บอเนต (sodium bicarbonate) หรือผงฟูร่วมกับยีสต์ *Pantoea agglomerans* ในการควบคุมราเขียว (Teixidó et al, 2001) และการใช้เอทานอลร่วมกับยีสต์ *Metschnikowia pulcherrima* (Spadaro et al., 2002b) นอกจากนี้อาจใช้สารสกัดจากพืชหรือสัตว์ที่สามารถควบคุมโรคพืชในการใช้งานร่วมกับยีสต์ได้อีกด้วย (Aharoni et al., 1993)

บทสรุป

การใช้ยีสต์ควบคุมโรคพืชเป็นชีววิธีอีกทางเลือกหนึ่งที่หลีกเลี่ยงการใช้สารเคมีกับเกษตรกรรม ถึงแม้ว่ายีสต์จะไม่สร้างสารปฏิชีวนะในกลไกการควบคุมโรคดังเช่นที่พบในราหรือแบคทีเรียก็ตาม แต่ยีสต์ก็สามารถสร้างเอนไซม์หลายชนิดที่หลั่งออกมานอกเซลล์ทำลายเชื้อก่อโรคได้ และยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่เจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว จึงสามารถแพร่กระจายครอบคลุมผิวพืชได้เร็ว จึงทำให้เชื้อก่อโรคบุกรุกเข้าทำลายเนื้อเยื่อพืชได้ยาก นอกจากนี้ได้มีการวิจัยจำนวนมากที่สนับสนุนกลไกการกระตุ้นระบบคุ้มกันของพืชโดยยีสต์ ซึ่งพบว่ามีสารหลายชนิดที่พืชสร้างขึ้นเมื่อใช้ยีสต์ที่ไม่ได้ก่อโรคกับพืชใส่ลงในรอยแผลเพื่อกระตุ้นวิถีการสร้างสารภูมิคุ้มกัน อย่างไรก็ตามการใช้ยีสต์ในสภาวะการณ์จริงอาจมีข้อจำกัดอยู่บ้างในเรื่องของการอยู่รอดของยีสต์บนพืชและการเก็บรักษายีสต์เพื่อให้ใช้งานได้นาน ซึ่งต้องอาศัยการควบคุมสภาวะแวดล้อมของการเก็บผลผลิตที่สนับสนุนการมีชีวิตรอดของยีสต์ หรือการใช้อุณหภูมิต่ำช่วยในการเก็บรักษายีสต์ การใช้ยีสต์ควบคุมโรคก่อนการเก็บเกี่ยวจะควบคุมสภาวะแวดล้อมได้ยากกว่าสภาวะหลังการเก็บเกี่ยว จึงต้องอาศัยเทคนิคต่างๆ เข้ามาช่วย เช่น การคัดเลือกยีสต์ที่ทนต่อสภาพแวดล้อมในแปลงเพาะปลูกได้ การใช้จุลินทรีย์ชนิดอื่นทำงานร่วมกับยีสต์ การปรับปรุงพันธุ์ยีสต์ให้มีความสามารถควบคุมโรคได้มากขึ้น ดังนั้นจะเห็นได้ว่าเทคนิคการใช้ยีสต์ควบคุมโรคพืชจำเป็นต้องใช้เวลาในการพัฒนาวิจัยต่อไปอีกระยะหนึ่งเพื่อให้เกิดความสะดวกต่อการใช้งานและเป็นวิธีที่ได้ผลอย่างแท้จริง

เอกสารอ้างอิง

Abadias, M., Benabarre, A., Teixidó, N., Usall, J., and Viñas, I. (2001a). Effect of freeze drying and protectants on viability of the biocontrol yeast *Candida sake.* **Int. J. Food Microbiol.**, 65, 3, 173-182.

Abadias, M., Teixidó, N., Usall, J., Benabarre, A., and Viñas, I. (2001b). Viability, efficacy, and storage stability of freeze-dried biocontrol agent *Candida sake* using different protective and rehydration media. **J. Food Protection**, 64, 6, 856-861.

Aharoni, Y., Copel, A., and Fallik, E. (1993). Hinokitiol (b-thujaplicin), for postharvest decay control on “Galia” melons. **New Zealand J. Crop Horti. Sci**., 21, 165-169.

Barkai-Golan, R., and Phillips, D. J. (1991). Postharvest heat treatment of fresh fruits and vegetables for decay control. **Plant Disease**, 75, 1085-1089.

Chalutz, E., Droby, S., Wilson, C.L., and Wisniewski, M.E. (1992). UV-induced resistance to postharvest diseases of citrus fruit. **J. Photochem. Photobiol. B: Biology**, 15, 367.

Chalutz, E., and Droby, S. (1998). **Biological control of postharvest diseases.** In G.J. Boland and L.D. Kuykendall (Eds.), **Plant-microbe interactions and biological control** (pp. 157-170). New York: Marcell Dekker.

Chan, Z., and Tian, S. (2005). Interaction of antagonistic yeasts against postharvest pathogens of apple fruit and possible mode of action. **Postharvest Biol. Technol.**, 36, 215-223.

Chand-Goyal, T., Eckert J.W., Droby, S., and Atkinson, K. (1998). A method for studying the population dynamics of *Candida oleophila* on oranges in

the grove, using a selective isolation medium and PCR technique. **J. Microbiol. Res.**, 153, 3, 265-270.

Chernin, L.S., De La Fuente, L., Sobolev, V., Haran, S., Vorgias, C.E., Oppenheim, A.B., and Chet, I. (1997). Molecular cloning, structural analysis, and expression in *Escherichia coli* of a chitinase gene from *Enterobacter agglomerans*. **Appl. Environ. Microbiol.**, 63, 834-839.

Costa, E., Teixidó, N., Usall, J., Atares, E., and Viñas I. (2001). Production of the biocontrol agent Pantoea agglomerans strain CPA-2 using commercial products and by-products. **Appl. Microbiol. Biotechnol.,** 56, 367-371.

De La Cruz, J., Pintor-Toro, J.A., Benitez, T., Llobell, A., and Romero, L.C. (1995). A novel endo-1,3-glucanase, BGN 13.1, involved in the mycoparasitism of *Trichoderma harzianum*. **J. Bacteriol.**, 177, 6937-6945.

Druvefors, U. (2004). **Yeast biocontrol of grain spoilage mold**. (Doctoral dissertation, Swedish University of Agricultural Science, 2004). Retrieved January 17, 2009, from Epsilon Dissertations and Graduate Theses Archive Web site: http://diss-epsilon.slu.se/archive/00000552/

El-Ghaouth, A., Arul, J., Grenier, J., and Asselin, A. (1992). Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruits. **Phytopathol.**, 82, 398-402.

El-Ghaouth, A., Smilanick, J.L., Brown, G.E., Ippolito, A., Wisniewski, M., and Wilson, C.L. (2000a). Application of *Candida saitoana* and glycol chitosan for the control of postharvest diseases of apple and citrus fruit under semi-commercial conditions. **Plant Disease**, 84, 243-248.

El-Ghaouth, A., Wilson, C.L., and Wisniewski, M. (1997). Antifungal activity of 2-deoxy-D-glucose on *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum*, and *Rhizopus stolonifer*. Ultrastructural and cytochemical aspect. **Phytopathology**, 88, 772-779.

Filonow, A.B. (2001). Butyl acetate and yeasts interact in adhesion and germination of *Botrytis cinerea* conidia *in vitro* and in fungal decay of Golden Delicious apple. **J. Chem. Ecol.**, 27, 831-44.

Hofstein, R., Friedlender, B., Chalutz, E., and Droby, S. (1994). **Large scale production and pilot testing of biocontrol agents of postharvest diseases**. In: Wilson, C.L., Wisniewski, M. (Eds.), Biological Control of Postharvest Diseases – Theory and Practice. CRC Press Inc., Boca Raton, FL, USA, pp. 89-100.

Janisiewicz, W.J., Usall, J., and Bors, B. (1992). Nutritional enhancement of biocontrol of blue mold on apples. **Phytopathology**, 82, 1364–1370.

Janisiewicz, W.J., and Bors, R. (1995). Development of a microbial community of bacterial and yeast antagonists to control wound-invading postharvest pathogens. **Appl. Environ. Microbiol.**, 61, 3261-3267.

Janisiewicz, W.J. (1998). Biocontrol of postharvest diseases of temperate fruits – Challenges and opportunities. In: Boland, G.J., Kuykendall, L.D. (Eds.), **Plant-Microbe Interactions and Biological Control.** Marcel Dekker, New York, USA, pp. 171-198.

Janisiewicz, W.J., Conway, W.S., Glenn, D.M., and Sams, C.E. (1998). Integrating biological control and calcium treatment for controlling postharvest decay of apples. **HortScience**, 33, 1, 105-109.

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.

Jones, R.W., and Prusky, D. (2002). Expression of Antifungal Peptide in *Saccharomyces*: a new approach for biological control of the post harvest disease caused by *Colletotrichum coccodes*. **Phytopathology**, 91, 33-37

Leibinger, W., Breuker, B., Hahn, M., and Mengden, K. (1997). Control of postharvest pathogens and colonization of the apple surface by antagonistic microorganisms in the field. **Phytopathology,** 87, 1103-1110.

Lima, G., Arru, S., De Curtis, F., and Arras, G. (1999). Influence of antagonist, host fruit and pathogen on the biological control of postharvest fungal diseases by yeasts. **J. Indust. Microbiol. Biotechnol.**, 23*,* 223-229.

Mcguire, R.G. (2000). Population dynamics of postharvest decay antagonists growing epiphytically and within wounds on grapefruit. **Phytopathol.**, 90, 1217-1223.

Nigro, F., Finetti Sialer, M.M., and Gallitelli, D. (1999). Transformation of *Metschnikowia pulcherrima* 320, biocontrol agent of storage rot, with the green fluorescent protein gene. **J. Plant Pathol.**, 81, 3, 205-208.

Piano, S., Cerchio, F., Migheli, Q., and Gullino, M.L. (1998). **Effetto di diverse sostanze sull'attività dell'antagonista *Metschnikowia pulcherrima* 4.4 contro *Botrytis cinerea* e sulla sua sopravvivenza sulle mele.** Atti Giornate Fitopatologiche, 3-7 maggio 1998, 495-500.

Pusey, P.L. (1994). **Enhancement of biocontrol agents for postharvest diseases and their integration with other control strategies**. In: Wilson, C.L., Wisniewski, M.E. (Eds.), Biological Control of Postharvest Diseases. Theory and Practice. CRC Press, Boca Raton, WV, USA, pp. 77-88.

Spadaro, D., Piano, S., Duverney, C., Gullino, M.L. (2002b). **Use of microorganisms, heat treatment, and natural compounds against *Botrytis* rot on apple**. Proc. 2nd International Conference on the alternative control methods against plant pests and diseases, Lille, France, 4-7 March 2002, 446-453.

Spadaro, D., Vola, R., Piano, S., and Gullino, M.L. (2002a). Mechanisms of action and efficacy of four isolates of the yeast *Metschnikowia pulcherrima* active against postharvest pathogens on apples. **Postharvest Biol. Technol.**, 24, 123-134.

Teixidó, N., Viñas, I., Usall, J., and Magan, N. (1998). Control of blue mold of apples by preharvest application of *Candida sake* grown in media with different water activity. **Phytopathol.,** 88, 960-964.

Teixidó, N., Usall, J., Palou, L., Asensio, A., Nunes, C., Viñas, I. (2001). Improving control of green and blue molds of oranges by combining *Pantoea agglomerans* (CPA-2) and sodium bicarbonate. **Eu. J. Plant Pathol.,** 107, 7, 685-694.

Wisniewski, M., Biles, C., Droby, S., McLaughlin, R., Wilson, C., and Chalutz, E. (1991). Mode of action of the postharvest biocontrol yeast, *Pichia guilliermondii*. I. Characterization of attachment to *Botrytis cinerea*. **Physiol. Mol. Plant Pathol.,** 39*,* 245-258.