ประสิทธิภาพของยีสต์ปฏิปักษ์ในการควบคุมทางชีววิธีต่อโรคผลองุ่นเน่าหลังการเก็บเกี่ยวที่เกิดจากเชื้อราสีเทา *Botrytis cinerea*

Efficacy of Antagonistic Yeasts on Biological Control of Gray Mold Rot of Post-Harvest Grape Caused by *Botrytis cinerea*

อนุเทพ ภาสุระ* และ ศศิภาส์ นุตวงษ์

Anuthep Pasura* and Sasipha Nuttawong

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

Department of Microbiology, Faculty of Science, Burapha University

Received : 12 June 2017

Accepted : 15 July 2017

Published online : 26 July 2017

บทคัดย่อ

โรคราสีเทาเป็นโรคก่อให้เกิดความเสียหายอย่างมากต่อองุ่น งานวิจัยนี้ทำการคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพของยีสต์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคราสีเทาของผลองุ่นที่เกิดจาก *Botrytis cinerea* จากการทดสอบยีสต์จำนวน 20 ไอโซเลตที่แยกได้จากผิวของผลองุ่นสุกพันธุ์คาร์ดินัล พบว่ายีสต์ไอโซเลต B-603 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *B. cinerea* ได้ 64.9±3.2 % ด้วยวิธี Dual culture ซึ่งสูงกว่ายีสต์ไอโซเลตอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อนำยีสต์ไอโซเลต B-603 ไปทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อรา *B. cinerea* บนผลองุ่นพันธุ์คาร์ดินัลพบว่าเซลล์แขวนลอยยีสต์ไอโซเลต B-603 ที่ความเข้มข้น 1×10^6, 1×10^7 และ1×10^8 เซลล์/มิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเกิดโรคราสีเทาบนผลองุ่นได้ 100 % เมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุม และเมื่อทำการนับจำนวนจุลินทรีย์ที่รอดชีวิตพบว่ายีสต์ปฏิปักษ์มีจำนวนเพิ่มขึ้นจากยีสต์ปฏิปักษ์ที่ใช้ 1×10^6 และ 1×10^7เซลล์/มิลลิลิตร ในขณะที่จำนวนยีสต์ปฏิปักษ์ลดจำนวนลงเมื่อใช้เซลล์แขวนลอยยีสต์ 1×10^8 เซลล์/มิลลิลิตร ในขณะที่ไม่พบเชื้อรา *B. cinerea* บนผลองุ่นที่ถูกควบคุมด้วยยีสต์ปฏิปักษ์

คำสำคัญ: โรคราสีเทา ยีสต์ปฏิปักษ์ *Botrytis cinerea* องุ่น

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

Abstract

Gray mold rot is a destructive disease to postharvest grape. Biological control is an alternative way to reduce the problems from using synthetic fungicides. This research aimed to study the effectiveness of antagonistic yeasts in controlling gray mold rot disease caused by *Botrytis cinerea* in postharvest grape. Twenty isolates of yeast were isolated from peel of grave cv. Cardinal. Among them, yeast isolate B-603 had significantly highest inhibitory effect 64.9±3.2% to *B. cinerea* in dual culture on PDA. Yeast isolate B-603 was tested for controlling *B. cinerea* in postharvest grape cv. Cardinal. It was found that isolate B-603 at 1×10^6, 1×10^7 and 1×10^8 cells/ml could completely control (100%) the gray mold disease compared to the control. For the numbers of antagonistic yeast and pathogen on the surface of grape berries, yeast isolate B-603 was increased their populations when it was applied at 1×10^6 and 1×10^7 cells/ml. However, the numbers of antagonistic yeast were decreased when using the concentration at 1×10^8 cells/ml. In addition, *B. cinerea* was not found on grape berries applying with all concentrations of antagonistic yeast isolate B-603.

Keywords: gray mold disease, antagonistic yeast, *Botrytis cinerea*, grape

บทนำ

องุ่น (*Vitis vinifera*) เป็นผลไม้เศรษฐกิจชนิดหนึ่งที่ปลูกเชิงการค้าในรูปของการทานผลสด ใช้ทำไวน์ และยังมีการปลูกในเชิงส่งเสริมการท่องเที่ยวในหลายพื้นที่ของประเทศไทย แต่องุ่นเป็นพืชที่ได้รับความเสียหายทางเศรษฐกิจจากโรคหลังการเก็บเกี่ยวสูงมาก โดยเฉพาะโรคราสีเทาที่เกิดจาก *Botrytis cinerea* (Jacometti *et al*., 2010) วิธีการควบคุมใช้สารกำจัดเชื้อราสังเคราะห์ เช่น benzimidazole และ dicarboximide อาจมีอันตรายต่อสุขภาพของทั้งเกษตรกรและผู้บริโภค และยังอาจทำให้เชื้อเกิดการดื้อยาอีกด้วย (Leroux, 2007) การควบคุมทางชีวภาพโดยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์จึงเป็นมาตรการทางเลือกที่มีความปลอดภัยโดยเฉพาะการใช้ยีสต์ปฏิปักษ์มีความน่าสนใจในการนำมาเป็นเชื้อปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคพืช เนื่องจากมีจุดเด่นที่เหนือกว่าจุลินทรีย์อื่นหลายประการ เช่น ยีสต์ปฏิปักษ์สามารถมีชีวิตอยู่ที่ผิวของผลิตผลที่แห้งได้เป็นระยะเวลานาน และสร้างสาร polysaccharides ออกมานอกเซลล์ เพื่อช่วยด้านความอยู่รอดของตัวเองในรูปของ การสร้าง biofilm ป้องกันการเจริญและการงอกของสปอร์เชื้อราชนิดอื่น ๆ และเข้าครอบครองพื้นที่บนผิวพืชทำให้ยีสต์ปฏิปักษ์ใช้อาหารได้อย่างรวดเร็วและเพิ่มจำนวนเร็วขึ้นและยังสามารถต้านทานต่อสารกำจัดศัตรูพืชอีกด้วย (Liu *et al*, 2010 : Liu *et al*., 2013) นอกจากนี้ยีสต์ปฏิปักษ์บางชนิดยังสร้างสารระเหยบางชนิดที่ออกฤทธิ์ในการทำลายเชื้อราก่อโรคอีกด้วย (Spadaro and Droby, 2016) จากคุณลักษณะดังกล่าว ยีสต์จึงเป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการนำมาใช้ในการควบคุมโรคหลังเก็บเกี่ยวได้ มีรายงานการวิจัยในการนำยีสต์ปฏิปักษ์หลายชนิดไปใช้ในการควบคุมโรคพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ เช่น มีรายงานว่ายีสต์ *Leucosporidium scottii* สายพันธุ์ At17 ที่แยกจากดินในเขตแอนตาร์ติกาเป็นยีสต์ปฏิปักษ์ที่ดีในการควบคุมทางชีวภาพโรคราสีฟ้าและราสีเทาของแอปเปิ้ลที่เกิดจากเชื้อรา *Penicillium expansum* และ *Botrytis cinerea* ตามลำดับ (Vero *et al*., 2013) และยีสต์ *Ulocladium oudemansii* ที่ได้รับการพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์เชิงการค้าชื่อว่า BOTRY-ZEN® มีประสิทธิภาพการควบคุมโรคช่อเน่าจากเชื้อ *Botrytis* ได้ดี (Calvo-Garrido *et al*., 2013) แต่ในสภาพอากาศร้อนชื้นในประเทศไทยการใช้ยีสต์

สายพันธุ์ที่กล่าวมา อาจจะไม่ได้ผลในการควบคุมโรคดีเท่าที่ควร ดังนั้น จึงทำการคัดแยกยีสต์ปฏิปักษ์ที่เป็นทรัพยากรจุลินทรีย์สายพันธุ์ท้องถิ่นของประเทศไทยเพื่อนำมาใช้ในการควบคุมโรคพืชโดยเฉพาะโรคราสีเทาในองุ่นซึ่งเป็นโรคพืชที่มีความสำคัญต่อการเพาะปลูกองุ่นและผลผลิตองุ่นหลังการเก็บเกี่ยวของประเทศไทย อันจะเป็นแนวทางหนึ่งในการลดการใช้สารเคมีที่ใช้ในการควบคุมโรคดังกล่าว

วิธีดำเนินการวิจัย

การแยกเชื้อราก่อโรค *Botrytis cinerea* จากผลองุ่น (ดัดแปลงจากวิธีของ Senthil *et al*. 2011)

ทำการแยกเชื้อราก่อโรคด้วยวิธี tissue transplanting จากผลองุ่นแดงพันธุ์คาร์ดินัลที่วางจำหน่ายในตลาดนัดวอนนภา จังหวัดชลบุรี โดยเป็นองุ่นแดงที่รับซื้อมาจากแหล่งปลูกจากพื้นที่จังหวัดราชบุรี (ติดต่อส่วนตัว) โดยเลือกผลองุ่นที่มีลักษณะของโรคผลเน่าจากราสีเทามีผลองุ่นหรือก้านองุ่นที่เกิดโรค (ลักษณะจำเพาะของอาการที่ผลองุ่น เริ่มต้นของผลองุ่นเกิดจุดสีน้ำตาลขึ้นบนผล ต่อมาแผลขยายขนาด เนื้อเยื่อนิ่ม มีของเหลวไหลออกมา) ทำการแยกเชื้อราสาเหตุจากอาการดังกล่าว โดยตัดชิ้นส่วนองุ่นบริเวณที่เป็นโรคเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 3×3 มิลลิเมตร จากนั้นนำชิ้นส่วนพืชไปวางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิห้อง (27±2 องศาเซลเซียส) นาน 3-4 วัน แยกเชื้อให้บริสุทธิ์ ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราที่แยกได้ตามคู่มือลักษณะสัณฐานวิทยาตามหลักการจัดจำแนกในหนังสือ Illustrated Genera of Imperfect Fungi ของ Barnett and Hunter (2006) และทำการทดสอบการเกิดโรคผลเน่าจากราสีเทาตามหลักการ Koch's Pastulate ซึ่งเชื้อราชนิดนี้มีความจำเพาะต่อการเกิดโรคราสีเทามากและยังไม่มีรายงานว่าโรคนี้เกิดจากเชื้อราอื่น จึงเชื่อมั่นว่าเป็นเชื้อรา *Botrytis cinerea* ผลการทดสอบการเกิดโรคราสีเทาขององุ่นจากเชื้อราที่แยกได้ โดยนำเชื้อราบริสุทธิ์สายพันธุ์ที่แยกได้มาเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน ทำสปอร์แขวนลอยเชื้อราก่อโรคความเข้มข้น 1×10^4 1×10^5 1×10^6 สปอร์/มิลลิลิตร จากนั้นนำช่อผลองุ่นจำนวน 10 ช่อ ๆ ละ 3 ผลที่ได้ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรด์ 2% เป็นเวลา 2 นาที ล้างด้วยน้ำประปา ผึ่งให้แห้งและใช้ปลายเข็มปลอดเชื้อแทงให้เกิดรอยแผลผลละ 1 รอย มาจุ่มในสปอร์แขวนลอยแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 100 มิลลิลิตรที่เตรียมไว้ในภาชนะปิดฝาและปราศจากเชื้อ เป็นเวลา 10 นาที โดยมีกรรมวิธีที่แช่ในน้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม ตรวจการเกิดโรคบนผลองุ่น

การแยกยีสต์ปฏิปักษ์จากเปลือกผิวของผลองุ่น (ดัดแปลงจากวิธีของ Pantelides *et al*. 2015)

นำตัวอย่างผลองุ่นพันธุ์คาร์ดินัล (*Vitis vinifera* cv. Cardinal) ที่วางจำหน่ายในตลาดนัดวอนนภา จังหวัดชลบุรี เป็นองุ่นแดงที่มีแหล่งปลูกจากพื้นที่จังหวัดราชบุรีที่แม่ค้าผลไม้รับซื้อมาจำหน่าย (ติดต่อส่วนตัว) โดยเลือกเก็บองุ่นตัวอย่างละประมาณ 10 พวง จำนวน 4 ตัวอย่างแล้วเลือกผลองุ่นสุกที่แสดงอาการสมบูรณ์ไม่เป็นโรคให้ได้จำนวน 20 ผล แช่ผลองุ่นในสารละลาย tween 20 ความเข้มข้น 0.02% ที่ปราศจากเชื้อ เขย่าที่อุณหภูมิห้องความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ทำเจือจางด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.85% แบบ 10-fold dilution ให้ได้ค่าความเจือจาง 10^{-2} – 10^{-5} นำสารละลายแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรไปเกลี่ยลงบนอาหาร Yeast Extract Peptone Dextrose Agar (YPDA) ที่มียาปฏิชีวนะ penicillin 13 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ละตัวอย่างสารละลายทำ 3 ซ้ำ บ่มจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (27±2 องศาเซลเซียส) นาน 24-72 ชั่วโมง เลือกโคโลนีของยีสต์ที่มีลักษณะแตกต่างกันที่เจริญบนอาหาร YPDA และทำให้บริสุทธิ์บนอาหาร YPDA เก็บเชื้อบริสุทธิ์ที่ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปทดสอบต่อไป

ทดสอบการเป็นยีสต์ปฏิปักษ์ด้วยวิธี dual culture **(ดัดแปลงจากวิธีของ** Pantelides *et al*. 2015)

เลี้ยงเชื้อรา *B. cinerea* ที่แยกได้จากรอยแผลโรคราสีเทาบนผลองุ่นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง (27±2 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 7 วัน ทำการทดลองโดยตัดปลายเส้นใยบริเวณขอบโคโลนีด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร นำชิ้นวุ้นเชื้อราที่ตัดมาวางตรงกลางจานอาหาร PDA ใหม่ นำยีสต์ที่แยกได้จากผิวองุ่นที่เลี้ยงบนอาหาร YPDA เป็นเวลา 48 ชั่วโมงมาขีดเป็นเส้นตรงสองเส้นห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 1.5 เซนติเมตรโดยใช้ลวดเขี่ยเชื้อ และให้เส้นใยของเชื้อราอยู่กึ่งกลางระหว่างรอยขีดของยีสต์ทั้งสอง ซึ่งรอยขีดของยีสต์ห่างจากขอบจานอาหาร PDA แต่ละด้าน 1.5 เซนติเมตร บ่มจานเพาะเชื้อในที่มืดอุณหภูมิห้อง (27±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ บันทึกการทดลองโดยสังเกตลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *B. cinerea* และวัดขนาดรัศมีของโคโลนีเชื้อราบนอาหาร ชุดควบคุมเป็นจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่เลี้ยงเฉพาะเชื้อรา *B. cinerea* เท่านั้น ทำการเลือกยีสต์ไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพการเป็นปฏิปักษ์ที่ดีที่สุดสำหรับการศึกษาขั้นต่อไปโดยใช้สูตรคำนวณเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญ (Percent inhibition of radial growth : PIRG)

$$\text{PIRG (\%)} = \frac{(R1-R2)\times 100}{R1} \quad \text{..... (1)}$$

R1 = ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคในชุดควบคุม *R2* = ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคในชุดทดสอบ

การทดสอบประสิทธิภาพยีสต์ในการควบคุมราสีเทาในองุ่น (ดัดแปลงจากวิธีของ Qin *et al*. 2015 **และ** Senthil *et al*. 2011)

เลือกช่อผลองุ่นพันธุ์คาร์ดินัลที่ใกล้สุกมีขนาดเท่ากันและไม่บอบช้ำหรือติดเชื้อมาทำการฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรด์ 2% เป็นเวลา 2 นาที ล้างด้วยน้ำประปา ผึ่งให้แห้ง ใช้เข็มปลอดเชื้อแทงที่ผลองุ่นแต่ละลูกให้ผลองุ่นเกิดจุดรอยแผลจำนวน 1 รอย/ลูก จากนั้นเตรียมเซลล์ยีสต์โดยการเลี้ยงยีสต์ไอโซเลต B-603 ที่คัดเลือกในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YPDB เป็นเวลา 36 ชั่วโมง เก็บเกี่ยวเซลล์ยีสต์โดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 3,500 g ล้างเซลล์ยีสต์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.85% จำนวน 3 ครั้ง เก็บตะกอนเซลล์มาทำเป็นเซลล์แขวนลอย ปรับความเข้มข้นโดยการนับด้วยเครื่อง haemacytometer ให้ได้เซลล์แขวนลอยของยีสต์ที่ความเข้มข้น 1×10^6, 1×10^7 หรือ 1×10^8 เซลล์/มิลลิลิตร แต่ละกรรมวิธีทดลอง นำผลองุ่น 1 ช่อ แต่ละช่อมีผลองุ่น 3 ลูกที่มีไม่แสดงอาการของโรคและมีขนาดผลใกล้เคียงกัน กำหนดให้ผลองุ่นแต่ละลูกเป็นแต่ละหน่วยการทดลอง แช่ในเซลล์แขวนลอยของยีสต์ที่ความเข้มข้นดังกล่าว เป็นเวลา 10 นาที ผึ่งให้แห้ง วางช่อผลองุ่นไว้ในกล่องพลาสติกที่มีฝาปิด หลังจากนั้น 1 วันนำช่อผลองุ่นดังกล่าวมาจุ่มในสปอร์แขวนลอยของเชื้อราก่อโรค *Botrytis cinerea* ความเข้มข้น 1×10^4 สปอร์/มิลลิลิตร ในภาชนะปิดที่มีปริมาตรสปอร์แขวนลอย 100 มิลลิลิตรเป็นเวลา 10 นาที โดยมีกรรมวิธีที่แช่ในน้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม โดยทำกรรมวิธีละสามซ้ำ ๆ ละ 10 ช่อ วางช่อผลองุ่นไว้ในกล่องพลาสติกที่มีฝาปิด บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน บันทึกพื้นที่การเกิดโรคแล้วแปลงเป็นความรุนแรงของโรค โดยให้ระดับคะแนนการเกิดโรคตั้งแต่ 0–5 โดยที่ 0 = ผลองุ่นไม่เน่า; 1 = ผลองุ่นเน่า 0-10%; 2= ผลองุ่นเน่า 11-25%; 3= ผลองุ่นเน่า 26-50%; 4 = ผลองุ่นเน่า 51-75% และ 5 ผลองุ่นเน่ามากกว่า 75% และคำนวณค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรค (Percent disease severity: DS) ได้จากสูตร

$$\text{DS (\%)} = \frac{\Sigma(Ci)}{N} \times 100 \quad \text{..... (2)}$$

โดยที่ C_i = จำนวนผลองุ่นที่เกิดโรค i = ระดับความรุนแรงของการเกิดโรคที่ระดับ 1 ถึงระดับ 5

N = จำนวนผลองุ่นทั้งหมดที่ทดสอบ

ทำการนับจำนวนยีสต์ปฏิปักษ์และเชื้อราก่อโรคบนผิวองุ่นหลังจากบ่ม 7 วัน โดยนำผลองุ่นจากแต่ละกรรมวิธีจำนวน 20 ผลแช่ใน Phosphate buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร (ดัดแปลงจาก Calvo-Garrido *et al*, 2013) นำไปเขย่าที่ 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นทำการเจือจางที่ความเข้มข้น 10^{-1} – 10^{-6} นำมาเกลี่ยลงบนอาหาร YPDA แต่ละกรรมวิธีทำ 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิห้อง (27±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 24-72 ชั่วโมงเพื่อหาปริมาณยีสต์ปฏิปักษ์ และเกลี่ยบนอาหาร PDA เพื่อหาปริมาณราก่อโรคหลังจากบ่ม 7 วัน รายงานปริมาณเชื้อเป็น LogCFU/ผลองุ่น

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้จากแต่ละการทดลองนำมาวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (analysis of variance; ANOVA) ข้อมูลที่บันทึกเป็นเปอร์เซ็นต์ต้องทำการแปลงค่าเป็น Arcsine (Arcsine transformation) ก่อนจึงนำมาวิเคราะห์ค่า ANOVA และหาความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test ที่ระดับ $P \leq 0.05$ โดยใช้โปรแกรมการวิเคราะห์ข้อมูลสำเร็จรูป SPSS version 22.0

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

ผลการแยกราก่อโรค *Botrytis cinerea* จากผลองุ่น

การแยกเชื้อราก่อโรคราสีเทาบนผลองุ่นสุก (ภาพที่ 1ก) ด้วยเทคนิค Tissue transplanting เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการมีความจำเพาะต่อโรคราสีเทาในองุ่น สามารถจำแนกได้เป็นเชื้อรา *B. cinerea* ในระยะแรกเชื้อรามีลักษณะโคโลนีสีขาว ต่อมาเปลี่ยนเป็นสีเทาและมีการสร้างเม็ดสเคลอโรเทีย (ภาพที่ 1 ข) การศึกษาใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าโคนีเดียไม่มีสี ลักษณะรูปไข่ (ovoid) เกาะกันเป็นกลุ่มเหมือนพวงองุ่น บนก้านสั้น ๆ ที่งอกออกมาจากก้าน conidiophore (ภาพที่ 1 ค) เมื่อทำการทดสอบการเกิดโรคตาม Koch's postulation พบว่าสามารถก่อให้เกิดโรคราสีเทาบนผลองุ่นได้เมื่อจุ่มผลองุ่นในสารละลายสปอร์เชื้อราตั้งแต่ 1×10^4 สปอร์/มิลลิลิตรขึ้นไป โดยที่ความเข้มข้นของสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *B. cinerea* ที่เพิ่มขึ้น มีผลต่อความรุนแรงของโรคอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จึงได้เลือกความเข้มข้นของสปอร์แขวนลอยที่ 1×10^4 สปอร์/มิลลิลิตรสำหรับการทดลองในขั้นต่อไป เนื่องจากมีความรุนแรงของโรคที่ก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจได้

ตารางที่ 1 ขนาดและเส้นผ่านศูนย์กลางรอยโรคและพื้นที่รอยโรคที่ใส่เชื้อ *B. cinerea* ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นของ *B. cinerea* (สปอร์/มิลลิลิตร)	ความรุนแรงของโรค (%)[1]
0	0.0±0.0[d]
1×10^4	36.1±18.3[c]
1×10^5	52.4±30.7[b]
1×10^6	77.3±15.0[a]

[1]ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อวิเคราะห์ด้วย Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ทางสถิติร้อยละ ($P < 0.05$)

ภาพที่ 1 ลักษณะโรคราสีเทาบนผลองุ่น (ก) ลักษณะลักษณะโคโลนีของ *Botrytis cinerea* บนอาหาร PDA (ข) ลักษณะของ *B. cinerea* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า แสดงลักษณะ conidiogenous cell ขนาดใหญ่ (ค) และลักษณะการยับยั้งการเจริญของยีสต์ไอโซเลต B-603 ต่อเชื้อราก่อโรคบนอาหาร PDA (ง)

การแยกยีสต์ปฏิปักษ์และทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อราก่อโรค

จากการทดลองสามารถแยกยีสต์จากเปลือกผิวของผลองุ่นด้วยวิธีเกลี่ยเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ YPDA ได้ยีสต์ที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกันจำนวน 20 ไอโซเลต เมื่อนำมาทำการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยราก่อโรค *Botrytis cinerea* โดยวิธี Dual culture บนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง (28 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน จากผลการทดลองในตารางที่ 2 พบว่ายีสต์บางสายพันธุ์ไม่ยับยั้งเชื้อราก่อโรค โดยพบว่ายีสต์ปฏิปักษ์ไอโซเลต B-603 (ภาพที่ 1 ง) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราก่อโรค *B. cinerea* ได้ดีที่สุดและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับยีสต์ไอโซเลตอื่น มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเท่ากับ 64.9±3.2 % การที่ยีสต์ไอโซเลต B-603 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยราก่อโรคในจานอาหารเลี้ยงเชื้อได้ดีที่สุดนั้นน่าจะเกิดจากกลไกที่สำคัญกลไกหนึ่งของยีสต์ปฏิปักษ์คือกลไกการแก่งแย่งสารอาหารและบริเวณพื้นที่อาศัยบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อจึงทำให้โคโลนีของราก่อโรคมีขนาดเล็กลงอย่างเห็นได้ชัดเจนหรือยีสต์ไอโซเลต B-603 อาจสร้าง killer toxin ออกมายับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรค *B. cinerea* โดยที่กลไกทั้งสองนี้มีความน่าสนใจที่จะเป็นกลไกหลักในการควบคุมเชื้อราก่อโรคในผลไม้หลังการเก็บเกี่ยว ส่วนการสร้างไบโอฟิล์ม (biofilm formation) อาจจะมีส่วนเกี่ยวข้องแต่ยังไม่เด่นชัดมากนักในการศึกษานี้ ในส่วนของสมมุติฐานกลไกการแก่งแย่งแข่งขันที่สังเกตได้จากผลการทดลองในการศึกษานี้สอดคล้องกับข้อมูลจากงานวิจัยอื่นที่สนับสนุนว่ายีสต์ปฏิปักษ์มีกลไกการควบคุมเชื้อราก่อโรคได้ เช่น ในกรณีของยีสต์ *Pichia anomala* ที่ใช้ในการควบคุมรา *B. cinerea* (Kwasiborski *et al*, 2014) ที่ได้อธิบายว่ายีสต์ดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการเจริญครอบครองพื้นที่และแข่งขันการใช้สารอาหารดีกว่ายีสต์ชนิดอื่น ๆ เช่นกัน ส่วนกลไกการสร้าง killer toxin นับว่ามีความน่าสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากมีรายงานผลการทดลองใช้ชีวภัณฑ์ยีสต์ปฏิปักษ์เชิงการค้าที่วางจำหน่ายในเครื่องหมายการค้า YieldPlus® ที่มียีสต์ *Candida albidus* YP เป็นจุลินทรีย์ในชีวภัณฑ์ที่นำมาใช้ในการควบคุมโรคผลเน่าของผลแพร์ที่เกิดจากเชื้อรา *B. cinerea* ในประเทศแถบลาตินอเมริกา ไม่มีคุณสมบัติในการสร้าง killer toxin แต่มีกลไกการสร้างสารระเหยเป็นหลัก (Lutz et al, 2013) ดังนั้น จึงน่าที่จะทำการศึกษาถึงกลไกการสร้าง killer toxin ของยีสต์ไอโซเลต B-603 หากพบว่าเป็นกลไกหลักในการควบคุมเชื้อราก่อโรค *B. cinerea* ที่อาจจะสามารถพัฒนาไปเป็นชีวภัณฑ์เชิงการค้าต่อไปได้

การทดสอบประสิทธิภาพของยีสต์ปฏิปักษ์ในการควบคุมราสีเทาบนผลองุ่น

เมื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพของยีสต์ไอโซเลต B-603 ที่คัดเลือกได้ในการยับยั้งการเจริญของรา *B. cinerea* ที่ก่อโรคเน่าในรอยแผลของผลองุ่น พบว่าผลองุ่นพันธุ์คาร์ดินัลที่มีการจุ่มยีสต์ปฏิปักษ์ไอโซเลต B-603 ทุกความเข้มข้น 1 วัน ก่อนทำการจุ่มเชื้อราก่อโรค สามารถยับยั้งการเกิดโรคราสีเทาในองุ่นได้ 100 % ส่วนผลองุ่นพันธุ์คาร์ดินัลในกรรมวิธีควบคุม (ไม่มียีสต์ปฏิปักษ์) พบว่าเกิดความรุนแรงของโรคบนผลองุ่นถึง 42.9% เมื่อบ่มเป็นเวลา 7 วัน ผลการทดลองจากงานวิจัยนี้พบว่ายีสต์ปฏิปักษ์ไอโซเลต B-603 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราก่อโรคได้ดีกว่าที่เคยมีในรายงานของ Nally *et al*. (2012) ที่ได้ศึกษาการใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ที่ความเข้มข้นยีสต์ที่ได้ 1×10^5, 1×10^6 และ 1×10^7 เซลล์/มิลลิลิตร ซึ่งในความเข้มข้นที่ 1×10^6 และ 1×10^7 เซลล์/มิลลิลิตร เมื่อดำเนินการทดลองเป็นเวลา 5 วัน สามารถลดการเกิดโรคราสีเทาจากเชื้อรา *Botrytis cinerea* ในองุ่นพันธุ์ Red Globe (*Vitis vinifera* cv. Red Globe) ได้ 65-88 % เช่นเดียวกับการทดลองของ Wang *et al*. (2010) ที่ได้ใช้ยีสต์ *Rhodosporidium paludigenum* ในระดับความเข้มข้นที่ 1×10^6, 1×10^7, 1×10^8 และ 1×10^9 เซลล์/มิลลิลิตรในการควบคุมราสีเทาในมะเขือเทศราชินี พบว่าสามารถลดการเกิดโรคของราสีเทาได้สูงสุดเพียง 41.3 % เมื่อใส่ยีสต์ที่ความเข้มข้น 1×10^9 เซลล์/มิลลิลิตร เมื่อทำการทดลองเป็นเวลา 5 วัน

ตารางที่ 2 การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Botrytis cinerea* ด้วยยีสต์ปฏิปักษ์ไอโซเลตต่าง ๆ ด้วยวิธี Dual culture บนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง (27±2 องศาเซลเซียส) นาน 7 วัน

ไอโซเลต	การยับยั้งการเจริญ (%)[1]	ไอโซเลต	การยับยั้งการเจริญ (%)[1]
B-101	0.0 ± 0.0^{e}	B-304	46.3 ± 3.2^{d}
B-102	0.0 ± 0.0^{e}	B-401	49.6 ± 5.2^{bcd}
B-103	0.0 ± 0.0^{e}	B-501	48.9 ± 1.9^{bcd}
B-104	0.0 ± 0.0^{e}	B-502	51.1 ± 1.9^{bc}
B-201	0.0 ± 0.0^{e}	B-601	53.0 ± 2.8^{b}
B-202	0.0 ± 0.0^{e}	B-602	46.3 ± 3.2^{d}
B-203	0.0 ± 0.0^{e}	B-603	64.9 ± 3.2^{a}
B-301	53.0 ± 2.8^{b}	B-604	48.1 ± 3.2^{cd}
B-302	45.6 ± 1.9^{d}	B-701	0.0 ± 0.0^{e}
B-303	46.3 ± 3.2^{d}	B-702	0.0 ± 0.0^{e}

[1]ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อวิเคราะห์ด้วย Duncan's multiple range test ($P \leq 0.05$)

ผลการนับปริมาณเชื้อราก่อโรคและยีสต์ปฏิปักษ์ไอโซเลต B-603 บนผิวของผลองุ่นพันธุ์คาร์ดินัลในการทดลองนี้ พบว่า ในกรรมวิธีทดลองที่มีการใช้ยีสต์ปฏิปักษ์ที่ความเข้มข้น 1×10^{6} และ1×10^{7} เซลล์/มิลลิลิตร มีจำนวนเซลล์ยีสต์เพิ่มจำนวนมากขึ้นเป็น 1.5×10^{8} และ1.4×10^{8} CFU/ผลองุ่น ตามลำดับ ส่วนกรรมวิธีทดลองใช้ยีสต์ที่ความเข้มข้น 1×10^{8} เซลล์/มิลลิลิตร มีจำนวนยีสต์บนผลองุ่นลดลงเป็น 3×10^{7}CFU/ผลองุ่น (ตารางที่ 2) แสดงให้เห็นว่ามีการเพิ่มจำนวนของยีสต์ปฏิปักษ์จากกรรมวิธีทดลองที่ใช้ยีสต์ในความเข้มข้นเซลล์ต่ำ ยีสต์สามารถเพิ่มจำนวนได้บนผิวของผลองุ่น ส่วนการใช้เซลล์ยีสต์ในปริมาณสูง ปริมาณเซลล์ยีสต์น่าจะเพิ่มจำนวนสูงสุดก่อนที่จะสิ้นสุดการทดลอง คือ 7 วัน จึงน่าจะมีการแก่งแย่งสารอาหารและพื้นที่ในการครอบครองระหว่างเซลล์ยีสต์ที่มีปริมาณมากบนผิวองุ่น จึงทำให้ปริมาณเซลล์ยีสต์ส่วนหนึ่งตายและลดจำนวนลงจากการมีปัจจัยที่จำเป็นต่อการเจริญไม่เพียงพอ อย่างไรก็ตาม ในทุกกรรมวิธีที่ใส่ยีสต์ไม่พบการเจริญของเชื้อราก่อโรคเลย

จากการหาปริมาณจุลินทรีย์ที่รอดชีวิตบนผิวของผลองุ่นพันธุ์คาร์ดินัลเมื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพยีสต์ปฏิปักษ์ไอโซเลต B-603 ในการควบคุม *B. cinerea* บนผลองุ่นพันธุ์คาร์ดินัลหลังจากจุ่มเชื้อนาน 7 วัน พบว่ามีเพียงยีสต์ปฏิปักษ์ที่รอด

ชีวิตและเจริญอยู่บนผิวองุ่น (ตารางที่ 3) ทั้งนี้อาจจะเกิดขึ้นเนื่องจากยีสต์ปฏิปักษ์ไอโซเลต B-603 มีความสามารถในการแก่งแย่งแข่งขันสูงมาก สามารถเจริญเพิ่มจำนวนได้รวดเร็วกว่าเชื้อราก่อโรคพืชหรือระหว่างที่เจริญได้ใช้สารอาหารไปก่อนที่สปอร์ของเชื้อราจะงอก โดยที่เมื่อจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดนี้เจริญอยู่ร่วมกันบนผิวองุ่น ยีสต์ปฏิปักษ์ไอโซเลต B-603 อาจจะมีความสามารถในใช้สารอาหารบนเปลือกผิวของผลองุ่นอย่างรวดเร็ว กลไกดังกล่าวนี้เคยมีรายงานในงานวิจัยการใช้ยีสต์ *Pichia guilliermondii* strain M8 ในการควบคุมโรคราสีเทาที่เกิดจากเชื้อ *B. cinerea* ในผลแอปเปิ้ลโดยใช้กลไกการแก่งแย่งแหล่งไนโตรเจนและคาร์บอนทำให้เกิดสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อราก่อโรค (Zhang *et al.*, 2011) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า *Rhodotorula glutinis* สามารถสร้างกรดโรโดโทรูลิก (rhodotorulic acid) ที่มีสมบัติเป็นสารไซเดอโรฟอร์ (siderophore) ซึ่งพบกลไกนี้ได้ในยีสต์สกุล *Rhodotorula* หลายชนิด ซึ่งสารนี้มีผลต่อการเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมราสีเทา (gray mold) บนผลแอปเปิ้ลหลังการเก็บเกี่ยวได้อย่างชัดเจน (Sansone *et al*., 2011) จากการศึกษานี้ได้แสดงให้เห็นว่ากลไกการแก่งแย่งสารอาหารและพื้นที่เป็นกลไกที่สำคัญและสามารถเกิดบนผิวของผลไม้หลายชนิด ในกรณีของการควบคุมเชื้อราสีเทาบนผลองุ่นพันธุ์คาร์ดินัลในการศึกษานี้น่าจะเกิดจากกลไกดังกล่าวเช่นเดียวกัน จึงควรที่จะมีการศึกษาในระดับลึกต่อไปถึงชนิดสารอาหารใดหรือปัจจัยการเจริญใดที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งโดยยีสต์ปฏิปักษ์จากการศึกษานี้

ตารางที่ 3 ความรุนแรงของโรคและปริมาณยีสต์และราบนผลองุ่นพันธุ์คาร์ดินัลเมื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพของยีสต์ปฏิปักษ์ไอโซเลต B-603 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในการควบคุมการเกิดโรคราสีเทาบนผลองุ่นที่ใช้เชื้อรา *Botrytis cinerea* ความเข้มข้น 1×10^4 โคนิเดีย/มิลลิลิตร บ่มเป็นเวลา 7 วัน

กรรมวิธีทดลอง		ความรุนแรงของโรค[1]	ปริมาณเชื้อบนผิวองุ่น (log CFU/ผลองุ่น)	
ความเข้มข้น *B. cinerea* (โคนิเดีย/มิลลิลิตร)	ความเข้มข้นยีสต์ไอโซเลต B-603 (เซลล์/มิลลิลิตร)	(%)	ยีสต์ไอโซเลต B-603[1]	*B. cinerea*[1]
1×10^4	0	42.9±18.0[a]	0.0±0.0[c]	4.5±0.2[a]
1×10^4	1×10^6	0.0±0.0[b]	8.2±0.1[a]	0.0±0.0[b]
1×10^4	1×10^7	0.0±0.0[b]	8.1±0.1[a]	0.0±0.0[b]
1×10^4	1×10^8	0.0±0.0[b]	7.5±0.2[b]	0.0±0.0[b]
1×10^4	1×10^8	0.0±0.0[b]	7.5±0.2[b]	0.0±0.0[b]

[1]ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์แสดงค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อวิเคราะห์ด้วย Duncan's multiple range test ($P\leq0.05$)

สรุปผลการวิจัย

จากการคัดเลือกยีสต์ปฏิปักษ์ที่แยกได้ผิวของผลองุ่นสุกพันธุ์คาร์ดินัลจำนวน 20 ไอโซเลตเพื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยราก่อโรค *B. cinerea* สาเหตุโรคราสีเทาขององุ่นด้วยวิธี Dual culture บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA พบว่ายีสต์ไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคได้ดีที่สุดคือ ยีสต์ไอโซเลต B-603 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราก่อโรคได้ 64.9±3.2% ด้วยวิธี dual culture บนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน เมื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพของยีสต์ไอโซเลต B-603 ในการยับยั้งการเกิดโรคราสีเทาในองุ่น พบว่าที่เซลล์แขวนลอยของยีสต์ความเข้มข้น 1×10^{6}, 1×10^{7} และ 1×10^{8} เซลล์/มิลลิลิตรสามารถยับยั้งการเกิดโรคราสีเทาในองุ่นได้อย่างสมบูรณ์ และเมื่อทำการนับจำนวนจุลินทรีย์ที่รอดชีวิตอยู่บนผิวของเปลือกผลองุ่น พบว่ายีสต์ปฏิปักษ์มีจำนวนเพิ่มขึ้นเมื่อใช้ยีสต์ปฏิปักษ์ในการควบคุมที่ความเข้มข้น 1×10^{6} และ1×10^{7}เซลล์/มิลลิลิตร แต่ยีสต์ปฏิปักษ์มีจำนวนลดลงเมื่อใช้เซลล์แขวนลอยยีสต์ที่ความเข้มข้น 1×10^{8}เซลล์/มิลลิลิตร ในขณะที่ไม่พบเชื้อรา *B. cinerea* บนผลองุ่นที่ถูกควบคุมด้วยยีสต์ปฏิปักษ์เลย ยีสต์ไอโซเลต B-603 จึงมีศักยภาพที่น่าจะนำไปพัฒนารูปแบบในการนำไปใช้ในการควบคุมโรคราสีเทาขององุ่นต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จได้จากการสนับสนุนทุนวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล ประจำปีงบประมาณ 2559 มหาวิทยาลัยบูรพา สัญญาเลขที่ 26/2559 และได้รับการอำนวยความสะดวกในการใช้พื้นที่และการสนับสนุนเครื่องมือวิทยาศาสตร์จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ผู้วิจัยจึงขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ ที่นี้

เอกสารอ้างอิง

Barnett, H.L. and Hunter, B.B. (2006).*Illustrated Genera of Imperfect Fungi.* 4th ed. The American Phytopathological Society. Minnesota, St. Paul.

Calvo-Garrido, C., Elmer, P.A.G., Vinas, I., Usall, J., Bartra, E., and Teixido, N. (2013). Biological control of botrytis bunch rot in organic wine grape with the yeast antagonist *Candida sake* CPA-1. *Plant Pathology*, *62*(3), 510-519.

Jaconmetti, M.A., Wratten, S.D., and Walter, M. (2010). Alternative to synthetic fungicides for *Botrytis cinerea* management in vineyard. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, *16*, 154-172.

Kwasiborski, A., Bajji, M., Renaut, J., Delaplace, P., and Jijakli, M.H. (2014). Identification of metabolic pathways expressed by *Pichia anomala* Kh6 in the presence of the pathogen *Botrytis cinerea* on apple: new possible targets for biocontrol improvement. *PLoS One, 9*(3), e91434.

Leroux P. (2007) Chemical Control of Botrytis and its Resistance to Chemical Fungicides. *In*: Elad Y., Williamson B., Tudzynski P., Delen N. (eds) *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Springer, Dordrecht.

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

Liu, P., Luo, L., Chao-an, L., (2013). Characterization of Competition for nutrients in the biocontrol of *Penicillium italicum* by *Kloeckera apiculate*, *Biological Control*, *67*, 157–162.

Lutz, M.C., Lopes, C.A., Rodriquez, M.E., Sosa, M.C., and Sangorrin, M.P. (2013). Efficacy and putative mode of action of native and commercial antagonistic yeasts against postharvest pathogens of pear. *International Journal of Food Microbiology*, *164*, 166-172.

Nally M.C., Peace, V.M., Maturano, Y.P., Munoz, C.J., Combina, M., Toro, M.E., Figueroa, L.I.C., and Vazquez, F. (2012). Biocontrol of *Botrytis cinerea* in table grapes by non-pathogenic indigenous *Saccharomyces cerevisiae* yeasts isolated from viticultural environments in Argentina. *Postharvest Biology and Technology*, *64*(1), 40-48.

Pantelides, L. S., Christou, O., Tsolakidon, M-D., Tsaltas, D. and Ioannou, N. (2015). Isolation, identification and *in vivo* screening of grapevine yeasts for the control of black aspergilli on grape. *Biological Control*, *88*, 46-53.

Qin, X., Xiao, H., Xue, C., Yu, Z., Yang, R., Cai, Z.and Si, L. (2015) Biocontrol of gray mold in grapes with the yeast *Hanseniaspora uvarum* alone and in combination with salicylic acid or sodium bicarbonate. *Postharvest Biology and Technology*, *100*, 160-167.

Sansone, G., Rezza, I., Fernandez, G., Calvente, V., Benuzzi, D., and Sanz, M.I. (2011). Inhibitors of polygalacturonase and laccase of *Botrytis cinerea* and their application to the control of this fungus. *International Biodeterioration and Biodegradation*, *65*, 243-247.

Senthil, R., Prabakar, K., Rajendran, I. and Karthikeyan, G. (2011). Efficacy of different biological control agents against major postharvest pathogens of grapes under room temperature storage conditions. *Phytopathologia Mediterranean*, *50*, 55-65.

Spadaro, D. and Droby, S. 2016. Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: the importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. *Trends in Food Science & Technology, 47*(39-49)

Vero, S., Garmendia, G., Gonzale, M.B., Bentancur, O., and Wisniewski, M. (2013). Evaluation of yeasts obtained from Antarctic soil samples as biocontrol agents for the management of postharvest diseases of apple. *FEMS Yeast Research*, *13*, 189-199.

Wang, Y., Yu, T., Xia, J., Yu, D., Wang, J. and Zheng, X. (2010). Biocontrol of postharvest gray mold of cherry tomatoes with the marine yeast *Rhodosporidium paludigenum*. *Biological Control*, *53,* 178-182.

Zhang, D., Spadaro, D., Garibaldi, A., and Gullino, L.M. (2011). Potential biocontrol activity of a *Pichia guilliermondii* against grey mold of apple and its possible modes of action. *Biological Control*, 57, 193-201.