

**USING HANDS-ON YEAST BIOLOGICAL CONTROL
FOR *COLLETOTRICHUM CAPSICI* TO TEACH ORGANISM
INTERRELATIONSHIP CONCEPTS AND TO ENCOURAGE
CRITICAL THINKING**



**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
(SCIENCE AND TECHNOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY**

2008

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การใช้บทปฏิบัติการเรื่องการควบคุมรา *COLLETOTRICHUM CAPSICI* โดยยีสต์ในการสอนโมทัศน์และความคิดเชิงวิพากษ์ของความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิต (USING HANDS-ON YEAST BIOLOGICAL CONTROL FOR *COLLETOTRICHUM CAPSICI* TO TEACH ORGANISM INTERRELATIONSHIP CONCEPTS AND TO ENCOURAGE CRITICAL THINKING)

อรุณ ชานชัยชาวีวัฒน์ 4637317 SCED/D

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: พินทิพ รื่นวงษา, Ph.D. (Biochemistry), วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด, Dr.Eng. (Fermentation Technology), ชื่นจิตต์ บุญเกิด, Ph.D. (Molecular Biology)

บทคัดย่อ

ในการคัดแยกยีสต์ปฏิภัยต่อรา *Colletotrichum capsici* ที่ทำให้เกิดโรคแอนแทรกโนสจากผลไม้และผักของไทยจำนวน 11 ชนิด พบยีสต์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมการเจริญของรา จำนวน 4 สายพันธุ์ คือ R13 R6 ER1 และ L2 ซึ่งมีประสิทธิภาพควบคุมโรคได้ 93.3% 83.1% 76.6% และ 66.4% จากการบ่งชี้ชนิดของยีสต์เหล่านี้ด้วยวิธีวิเคราะห์ลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอบริเวณ 26S rDNA และ ITS พร้อมด้วยลักษณะทางสรีรวิทยา และรูปร่างของเซลล์ พบว่า ยีสต์เหล่านี้ คือ *Pichia guilliermondii* *Candida musae* *Issatchenkia orientalis* และ *Candida quercitrusa* ตามลำดับ ซึ่ง *P. guilliermondii* สายพันธุ์ R13 สามารถลดการเกิดโรคในผลพริกให้เหลือเพียง 6.5% และพบว่ามีประสิทธิภาพดีกว่าการใช้น้ำคลอรีนที่มักใช้กันในการเก็บรักษาผลพริกหลังการเก็บเกี่ยว การทดลองนี้ได้ศึกษากลไกที่ยีสต์สายพันธุ์ R13 ลดการเกิดโรคจาก *C. capsici* ทั้งบนจานเพาะเชื้อและบนผลพริก จากการสังเกตด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่าเซลล์ยีสต์จะไปเกาะเส้นใยทำให้ลดการเจริญของราบนขนาดผลของผลพริก เมื่อเพิ่มสารอาหารกลูโคส ซูโครส และแหล่งไนโตรเจนบางชนิดลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำคั้นจากผลพริก พบว่าการงอกและความยาวของสปอร์รากยับยั้ง แสดงว่าการแย่งสารอาหารระหว่างยีสต์สายพันธุ์ R13 และ *C. capsici* เป็นกลไกหนึ่งในการควบคุมโรคของยีสต์ชนิดนี้ นอกจากนี้ยังพบว่ายีสต์สายพันธุ์ R13 สามารถสร้างเอนไซม์โคติเนสและเบต้า-กลูคาเนสได้ทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งและเหลว เอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้มีความสามารถในการทำงานสูงสุดในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนเตรียมจากผนังเซลล์ *C. capsici* ซึ่งจะมากกว่าในอาหารที่มีลามินารินและกลูโคส 2 และ 15 เท่า ตามลำดับ จากการศึกษาการทดลองนี้ไม่พบการสร้างสารพิษที่ออกซินของยีสต์สายพันธุ์ R13 ในสภาวะที่ใช้เลี้ยง การที่ยีสต์สายพันธุ์ R13 มีกลไกการยับยั้งการเจริญของ *C. capsici* ในหลายลักษณะอาจทำให้มีโอกาสสูงที่จะนำไปใช้ควบคุมการก่อโรคแอนแทรกโนสในผลพริก

ผลส่วนหนึ่งจากการทดลองใช้ยีสต์ควบคุมโรคแอนแทรกโนสในผลพริกได้นำมาสร้างเป็นบทปฏิบัติการสำหรับนักเรียนชั้น ม. 5 โดยได้นำมาบูรณาการเข้ากับหลักการเรียนการสอนแบบ experiential learning model หรือ การเรียนรู้จากประสบการณ์จริง ผลการทดลองพบว่ากลุ่มนักเรียนที่เรียนรู้จากประสบการณ์จริงสามารถสร้าง conceptual understanding ในเรื่องความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิตจากการทดลองทำปฏิบัติการเรื่องการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีที่พัฒนาขึ้น พร้อมทั้งมีทักษะความคิดเชิงวิพากษ์มากกว่ากลุ่มที่เรียนรู้จากการสอนด้วยวิธีดั้งเดิมแบบการบรรยาย ทั้งนี้ได้ประเมินจากความสามารถในการตอบและอธิบายปัญหาหลายเปิด การสัมภาษณ์ และความซับซ้อนของแผนผังโมทัศน์ที่นักเรียนสร้างขึ้น นอกจากนี้กลุ่มนักเรียนที่เรียนรู้จากประสบการณ์จริงยังได้นำความรู้จากการทำปฏิบัติการในชั้นเรียนไปออกแบบโครงงานวิทยาศาสตร์ซึ่งมีผลงานอยู่ในเกณฑ์ดีเยี่ยม นักเรียนมีทัศนคติที่ดีในแง่ที่ว่า การเรียนโดยลงมือทำเองช่วยให้เกิดการเรียนรู้ได้มากขึ้น นอกจากนี้เนื้อหายังส่งเสริมความสนใจเรื่องสิ่งแวดล้อม การเรียนรู้โดยวิธีดังกล่าวนี้ได้ช่วยส่งเสริมความคิดเชิงวิทยาศาสตร์และความคิดสร้างสรรค์ ซึ่งรูปแบบการสอนนี้เป็นอีกวิธีการหนึ่งที่สามารถนำไปใช้เพื่อส่งเสริมการเรียนรู้ของนักเรียนในวิชาชีววิทยาได้

USING HANDS-ON YEAST BIOLOGICAL CONTROL FOR *COLLETOTRICHUM CAPSICI* TO TEACH ORGANISM INTERRELATIONSHIP CONCEPTS AND TO ENCOURAGE CRITICAL THINKING.

ARUN CHANCHAICHOVIVAT 4637317 SCED/D

Ph.D. (SCIENCE AND TECHNOLOGY EDUCATION)

THESIS ADVISORS: PINTIP RUENWONGSA, Ph.D. (BIOCHEMISTRY), WATANALAI PANBANGRED, Dr.Eng. (FERMENTATION TECHNOLOGY), CHUENCHIT BOONCHIRD, Ph.D. (MOLECULAR BIOLOGY)

ABSTRACT

Yeasts antagonistic to *Colletotrichum capsici* were isolated from 11 species of Thai fruits and vegetables. Four antagonists (R13, R6, ER1, and L2) were found to inhibit *C. capsici* growth with biological control efficacies of 93.3%, 83.1%, 76.6%, and 66.4%, respectively. They were identified by using 26S rDNA and ITS region sequences together with physiological and morphological characteristics, and found to be *Pichia guilliermondii*, *Candida musae*, *Issatchenkia orientalis*, and *Candida quercitrusa*. The most effective strain, *P. guilliermondii* R13 reduced disease incidence in *C. capsici* infected chilli fruits to as low as 6.5%, and was more effective in preserving chilli fruits than conventional preservation with chlorinated water. The modes of action of *P. guilliermondii* strain R13 against *C. capsici* was examined both on agar plates and in chilli wounds. Light microscopy indicated that strain R13 attached to the fungal hyphae and that attachment was associated with restricted proliferation of *C. capsici* in chilli fruit wounds. Studies on competition for nutrients revealed that the suppression of spore germination and germ tube length of *C. capsici* by *P. guilliermondii* strain R13 was significantly diminished by glucose, sucrose, and some nitrate sources. Strain 13 also produced hydrolytic enzymes, including β -1,3-glucanase and chitinase, in both solid and liquid media. These enzymes showed highest activities when the *C. capsici* hyphal cell wall, rather than laminarin or glucose, was the sole carbon source. Unlike other strains tested, strain 13 did not produce a killer toxin when cultivated under similar conditions. Multiple modes of action may make strain R13 a good candidate for biological control of chilli anthracnose.

Results from this study were used to design hands-on biological control activities for 11th grade students based on the experiential learning model. Students in the experiential learning class showed higher conceptual understanding of organism interactions in biological control systems and were more critical about their roles in the environment compared to the traditional learning class. They were assessed for their abilities to give better explanations in open-ended questions and interviews, and to construct a more complex concept map. The students also applied their knowledge to design science projects, which were evaluated as 'superior' using the Rubric score. They had positive attitudes towards this hands-on activity, not only in their learning outcomes, but also in their environmental awareness. This advanced instructional method, using yeast biological control experiment, enhanced students' conceptual understanding and critical thinking skills. It could thus be used as an alternative teaching method to improve learning outcomes of students studying Biology.

KEY WORDS: BIOLOGICAL CONTROL/ YEAST ANTAGONISTS/ EXPERIENTIAL LEARNING/ CRITICAL THINKING/ CONCEPTUAL UNDERSTANDING

180 P.