บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ราเป็นสาเหตุของโรคพืชส่วนใหญ่ทั่วโลก รวมถึงโรคพืชเศรษฐกิจในประเทศไทย โดยเฉพาะอย่างยิ่งราในสกุล *Fusarium, Colletotrichum, Alternaria* และ *Pestalotiopsis* เป็นสาเหตุที่ทำให้พืชเกิดโรคระหว่างการเจริญ ระหว่างการเก็บเกี่ยว หรือผลผลิตหลังการเก็บเกี่ยว (Strange, 2003; Sharma, Singh, & Singh, 2009) ราในสกุลดังกล่าว ได้แก่ *F. oxysporum* เป็นสาเหตุของโรคเหี่ยว (Fusarium wilt) ในพืชหลายชนิด เช่น กล้วยน้ำว้า (Dita, Walwijk, Buddenhagen, Souza Jr, & Kema, 2010) พริก (Suryanto, Potonah, & Munir, 2010) มะเขือเทศ (Rowe, 1980; Grattidge, 1982; Bost, 2001; Chantal et al., 2006) *C. gloeosporioides* ทำให้เกิดโรคแอนแทรคโนสในพืชหลายชนิด เช่น พริก (Gopinath, Radhakrishnan, & Jayaraj, 2006; Than, Prihastiti, Phoulivong, Taylor, & Hyde, 2008) มะม่วง (Gupta et al., 2010) สตรอเบอร์รี (Freeman, Horowitz, & Sharon, 2001; Freeman, Shalev, & Katan, 2002) และ *A. brassicicola* ก่อให้เกิดโรคใบจุดในพืชตระกูลกะหล่ำ เช่น บรอกโคลี กะหล่ำปลี กะหล่ำดอก ผักกาดขาวปลี (Junji, 2006; Lawrence et al., 2008) ส่วน *Pestalotiopsis* sp. ก่อให้เกิดโรคใบไหม้ในกล้วย (Photital, Lumyong, Lumyong, McKenzie, & Hyde, 2004)

ราสาเหตุโรคพืชดังกล่าวทำให้ผลิตผลทางการเกษตรเสียหาย ส่งผลให้มูลค่าทางการเกษตรลดลง และยังต้องเสียค่าใช้จ่ายในการควบคุมการระบาดของราสาเหตุโรคพืช (Gao, Liu, & Liu, 2004; Jin, Geng, Yu, Tao, & Hou, 2009) จากการควบคุมโรคพืชโดยใช้สารเคมี หรือการใช้สารเคมีที่มากเกินจำเป็น ส่งผลให้ราสาเหตุโรคพืชต้านทานต่อสารเคมี ก่อให้เกิดความยุ่งยากในการควบคุมราสาเหตุโรคพืช นอกจากนี้ยังพบว่าสารเคมีที่ใช้ยังส่งผลกระทบต่อมนุษย์ สัตว์ และสิ่งแวดล้อมอีกด้วย (Russel, 2005; Brent & Hollomon, 2007; Mondali et al., 2009; Wegulo, Zwingman, Breathnach, & Baenziger, 2011)

ในช่วงเริ่มแรกการศึกษาผลิตภัณฑ์จากราส่วนใหญ่จะเน้นไปที่การศึกษาราบก (Terrestrial fungi) แต่พบข้อจำกัดของคุณสมบัติทางเคมี และฤทธิ์ทางชีวภาพของผลิตภัณฑ์ที่ได้ซึ่งส่วนใหญ่มีผู้ศึกษาแล้ว (Cabrera, Roberti, Wright, & Seldes, 2002; Liu et al., 2006) ความสนใจในการศึกษาราแหล่งใหม่ ๆ เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ใหม่ ๆ จึงเริ่มขึ้น รวมถึงการศึกษาราในระบบนิเวศทางทะเล (Marine-derived fungi) (Faulkner, 1994) พบการศึกษาราในระบบนิเวศทางทะเล

ครั้งแรกในประเทศออสเตรเลียเมื่อ 50 ปีที่ผ่านมา (Cribb & Cribb, 1995) ในระยะหลังมีการศึกษาราในระบบนิเวศทางทะเล รวมถึงราในระบบนิเวศป่าชายเลนเพิ่มมากขึ้น ทำให้ทราบข้อมูลเกี่ยวกับราในระบบนิเวศทางทะเลเพิ่มขึ้นทั้งความรู้ด้านสรีรวิทยา นิเวศวิทยา อนุกรมวิธาน และราทะเลประยุกต์ (Abdel-Wahab, 2005) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าราจากระบบนิเวศป่าชายเลนเป็นหนึ่งในกลุ่มราชนิดใหม่ ๆ ที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีคุณสมบัติทางเคมี และฤทธิ์ทางชีวภาพแตกต่างจากสารที่ได้จากราบก (Davidson, 1995; Faulkner, 2001; Liu et al., 2006; Imhoff, Labes, & Wiese, 2011) ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากราในระบบนิเวศทางทะเลถูกนำมาประยุกต์ใช้ในด้านต่าง ๆ ทั้งด้านการแพทย์ ด้านสิ่งแวดล้อม ด้านอุตสาหกรรม ด้านอาหาร และยา (Blunt et al., 2008; Kansoh, Khattab, Abd-Elrazek, & Motawea, 2010) รวมถึงด้านการเกษตรในการควบคุมโรคพืช (Xiao et al., 2005; Chen, Pan, Tang, Chen, & Lin, 2009) และมีแนวโน้มสูงว่าราจากระบบนิเวศป่าชายเลนจะสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ รวมถึงสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืชที่มีประสิทธิภาพสูง เนื่องจากการดำรงชีวิตอยู่ในระบบเฉพาะ คืออยู่ภายใต้ความเค็ม ความดัน สารอาหาร การขึ้น-ลงของน้ำทะเล และอุณหภูมิที่หลากหลาย ซึ่งเป็นปัจจัยในการพัฒนาไปสู่กลไกในการสร้างสารออกฤทธิ์ที่แตกต่างจากราบก เพื่อให้สามารถแข่งขันกับจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ได้ (Kumaresan & Suryanarayanan, 2002; Sakayaroj, Jones, Chatmala, & Phongpaichit, 2004; Zhu, & Lin, 2006; Kosta, Jain, & Tiwari, 2008; Mabrouk, Kheiralla, Hamed, Youssry, & Aty, 2008; Tarman et al., 2011)

ในกระบวนการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของราบก หรือราทั่วไปในห้องปฏิบัติการต้องอาศัยหลายปัจจัยเป็นตัวกำหนด ได้แก่ อุณหภูมิ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน กรดอะมิโน ออกซิเจน และระยะเวลาในการบ่ม เป็นต้น (Noaman, Fattah, Khalcafa, & Zaky, 2004; Xiong, Turunen, Pastinen, Letsola, & Weymarn, 2004; Gogoi, Boruah, Saikia, & Bora, 2008; Cai, Yu, Zhang, & Zhou, 2011) และภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ราจะสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลากหลาย (Dobrestov, Dahm, & Qiu, 2006) ปัจจัยทางกายภาพดังกล่าวจึงน่าจะมีความสำคัญต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของราจากระบบนิเวศป่าชายเลนเช่นกัน

สภาวะต่าง ๆ ที่ใช้ในกระบวนการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของราในระบบนิเวศทางทะเล รวมถึงราจากป่าชายเลนที่มีรายงาน ได้แก่ ชนิดของอาหารเหลว ซึ่งส่วนใหญ่ที่มีรายงานเป็น Potato dextrose (PDB), Sabouraud dextrose (SDB) และอาหารที่มีส่วนประกอบของ Glucose, Peptone, Beef extract, Malt extract และ Yeast extract (Zhu & Lin, 2006; Huang, She, Lin, Vrijmoed, & Lin, 2007; Huang et al., 2008; Yan, Gao, Li, Li, & Wang, 2010; Abdel-Wahab, Asolkar, Inderbitzin, & Fenical, 2007; Chen, Lin, Wen, Vrijmoed, & Jones, 2003a; Huang et al.,

2011a; Bhimba, Franco, Jose, Mathew, & Joel, 2011) สภาวะทางกายภาพอื่น ๆ ที่มีรายงาน ได้แก่ ความเค็มของอาหารเหลว (Chen et al., 2003a; Zhu & Lin, 2006; Wen et al., 2009) ระยะเวลาในการเลี้ยงรา (Abdel-Wahab et al., 2007; Lin, Zhu, Fang, & Gu, 2008a; Bhimba et al., 2011) อุณหภูมิในการบ่ม (Rukachaisirikul, Rodglin, Phongpaichit, Buatong, & Sakayaroj, 2011; Lin, Zhu, Fang, Gu, & Zhu, 2008b; Chen et al., 2003a; Xu, Aly, Wray, & Proksch, 2011) ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเหลว (Huang et al., 2007; Isaka, Yangchum, Intamas, Kocharin, & Jones, 2009) เป็นต้น

จากรายงานส่วนใหญ่พบการใช้สภาวะในการเลี้ยงราจากระบบนิเวศทางทะเลให้ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย แต่การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในห้องปฏิบัติการกลับมีค่อนข้างน้อย และส่วนใหญ่ศึกษาในราสายพันธุ์เดียว เช่น การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Aspergillus ustus* MSF3 ที่อาศัยร่วมกับฟองน้ำทะเลโดยใช้สภาวะทางกายภาพ 6 ปัจจัย ในอาหารเหลว Sabouraud dextrose ได้แก่ ระยะเวลาในการบ่ม ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเหลว ความเค็มของอาหารเหลว แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และอิออน (Kiran et al., 2009) และการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารออกฤทธิ์จากราทะเล *Varicosporina ramulosa* ในอาหารเหลว โดยใช้ปัจจัยทางกายภาพ 5 ปัจจัย ได้แก่ ชนิดอาหารเหลว ระยะเวลาในการบ่ม อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเหลว และความเร็วรอบในการเขย่า (Mabrouk et al., 2008)

งานวิจัยนี้มุ่งศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืชของราในระบบนิเวศป่าชายเลนสองกลุ่ม คือ ราทะเลที่พบบนเศษไม้ในป่าชายเลน ได้แก่ ราทะเลสายพันธุ์ BUCS 004 สายพันธุ์ BUCS 032-2 และสายพันธุ์ BUSK 055-1 ราเอนโดไฟท์ที่แยกจากใบของพืชป่าชายเลน ได้แก่ ราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 121 สายพันธุ์ BUEN 830 และสายพันธุ์ BUEN 834 รวมทั้งสิ้น 6 สายพันธุ์ ให้ผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืชที่มีฤทธิ์ยับยั้งสูงขึ้น โดยศึกษาสภาวะทางกายภาพ 6 ปัจจัย ได้แก่ ความเค็มของอาหารเหลว ชนิดของอาหารเหลว ค่าความเป็นกรด- ด่างเริ่มต้นของอาหารเหลว ความเร็วรอบในการเขย่า อุณหภูมิ และระยะเวลาในการบ่ม ตามลำดับ เปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดจากราจากป่าชายเลนที่ผลิตในสภาวะตั้งต้น และภายหลังการเลี้ยงราจากป่าชายเลนในสภาวะเหมาะสมที่ได้จากการศึกษา จากนั้นขยายขนาดการหมักราจากป่าชายเลนที่มีฤทธิ์ยับยั้งสูงสุดจำนวน 2 สายพันธุ์ โดยใช้สภาวะเหมาะสมที่ได้จากการศึกษา และทำการศึกษาสารองค์ประกอบของสารสกัดจากราป่าชายเลนเบื้องต้นด้วยวิธี Thin layer chromatography (TLC) และศึกษาฤทธิ์ของสารองค์ประกอบแต่ละชนิดในการยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคพืช

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงราทะเลที่พบบนเศษไม้ในป่าชายเลน และราเอนโดไฟท์ที่แยกจากใบพืชป่าชายเลน ต่อการผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืช

2. ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากการใช้สภาวะเหมาะสมของราทะเลบนเศษไม้และราเอนโดไฟท์ที่แยกจากใบพืชป่าชายเลน แต่ละสายพันธุ์ในการผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืช เปรียบเทียบกับการใช้สภาวะตั้งต้นทั้งสองสภาวะ ได้แก่สภาวะที่ตั้งทิ้งไว้ และสภาวะที่เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที

3. ศึกษาสารองค์ประกอบของสารสกัดจากราป่าชายเลน และศึกษาความสามารถในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชของสารองค์ประกอบแต่ละชนิด

กรอบแนวคิดในการวิจัย

ราที่อาศัยอยู่ในสภาวะกดดันต่อการเจริญเช่น ราทะเลบนเศษไม้ และราเอนโดไฟท์จากพืชป่าชายเลน จะต้องปรับตัวเพื่อให้สามารถเจริญในสิ่งแวดล้อมที่จำกัด ด้วยเหตุนี้จึงทำให้ราดังกล่าวมีกลไกในการป้องกันตนเองจากสิ่งแวดล้อม กลไกหนึ่งที่สำคัญคือการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ หรือสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ซึ่งในระดับปฏิบัติการการที่จะให้ราแต่ละชนิด หรือแต่ละสายพันธุ์ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพ หรือผลิตในปริมาณมากจำเป็นต้องอาศัยสภาวะทางกายภาพต่าง ๆ ที่เหมาะสม ได้แก่ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ความเค็มของอาหารเหลว ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น และความเร็วรอบของการเขย่าที่เหมาะสม ในเบื้องต้นจึงจำเป็นต้องหาสภาวะเหมาะสม ที่ส่งผลให้ราจากระบบนิเวศป่าชายเลนแต่ละชนิด หรือแต่ละสายพันธุ์สามารถผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. ทราบสภาวะเหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืช ของราจากป่าชายเลนในอาหารเหลว

2. สามารถนำสภาวะที่เหมาะสมมาใช้เลี้ยงราจากป่าชายเลนให้ผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืชที่ดีในปริมาณสูง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ขอบเขตของการวิจัย

ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของราจากป่าชายเลนทั้งหมด 6 สายพันธุ์ โดยคัดเลือกราทะเล 3 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ BUCS 004, BUCS 032-2 และ BUSK 055-1 และราอนโดไฟท์จากพืชป่าชายเลน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ BUEN 121, BUEN 830 และ BUEN 834 เป็นตัวแทนในการศึกษาปัจจัยที่ศึกษา ได้แก่ ความเค็มของอาหารเหลว ชนิดของอาหารเหลว ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเหลว ความเร็วรอบในการเขย่า อุณหภูมิ และระยะเวลาในการเลี้ยงราจากระบบนิเวศป่าชายเลน ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพกับราสาเหตุโรคพืช 4 ชนิด ได้แก่ *A. brassicicola* DOAC 0436, *C. gloeosporioides* DOAC 0782, *F. oxysporum* DOAC 1808 และ *Pestalotiopsis* sp. DOAC 1098 เปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งที่ได้ระหว่างการศึกษาในสภาวะตั้งต้น และภายหลังจากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสม จากนั้นนำข้อมูลสภาวะที่เหมาะสมของราจากป่าชายเลนที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช จำนวน 2 สายพันธุ์ มาทดลองขยายขนาดการหมัก รวมถึงศึกษาสารองค์ประกอบ และประสิทธิภาพของสารองค์ประกอบแต่ละชนิดในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช

สถานที่ทำการศึกษา

ห้องปฏิบัติการราวิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

คำนิยามศัพท์เฉพาะ

ANOVA	=	Analysis of variance
DMRT	=	Duncan's multiple rang test
cm	=	Centimeter
GC	=	Gas chromatography
HCl	=	Hydrochloric acid
H_2O	=	Water
HPLC	=	High performance liquid chromatography
KH_2PO_4	=	Potassium hydrogen phosphate
L	=	Litter
LNB	=	Low nutrient broth
mg	=	Milligram
Mg_2SO_4	=	Magnesium sulfate
MIC	=	Minimal inhibitory concentration
ml	=	Milliliter
µg	=	Microgram
µl	=	Microlitter
NaCl	=	Sodium chloride
NaOH	=	Sodium hydroxide
PDA/DW	=	Potato dextrose agar prepared with distilled water
PDA/SW	=	Potato dextrose agar prepared with 15 ppt-seawater
PDB	=	Potato dextrose broth
ppt	=	Part per thousand
0.5xPDB	=	Half-strength of potato dextrose broth
SDB	=	Sabouraud dextrose agar
TLC	=	Thin layer chromatography
UV	=	Ultraviolet
YMB	=	Yeast malt broth

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University