



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การปรับปรุงสถานะในการสร้างสารต้านราก่อโรคพืชของราจากสิ่งแวดล้อมทางทะเล

**Optimization of fungi from marine environments
for production of antifungal compounds against fungal phytopathogens**

อภิรดี ปิณฑนภากย์ และ สุภารัตน์ สวนจิตร

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้

จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๕๕

มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 2559A10802174

สัญญาเลขที่ 92/2559

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การปรับปรุงสถานะในการสร้างสารต้านราที่ออกฤทธิ์ของราจากสิ่งแวดล้อมทางทะเล

Optimization of fungi from marine environments

for production of antifungal compounds against fungal phytopathogens

อภิรดี ปลั้ยนภากาศย์ และ สุดารัตน์ สวนจิตร

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่อง “การปรับปรุงสถานะในการสร้างสารต้านราก่อโรคพืชของราจากสิ่งแวดล้อมทางทะเล” ดำเนินการสำเร็จสมบูรณ์ได้ ด้วยทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนจากรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 92/2559 ผู้วิจัยขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้ และขอขอบคุณคุณจิราภรณ์ ชนากุลปรกรณ์ ผู้ช่วยวิจัยและนิสิตปริญญาโท คุณนันทิพัฒน์ สุริยะวงศ์และคุณวิมลรัตน์ สะอาดดี ผู้ช่วยวิจัย ที่ช่วยให้งานวิจัยสำเร็จได้ด้วยดี

บทคัดย่อ

ศึกษาสภาวะเหมาะสมของราจากสิ่งแวดล้อมทางทะเล ในการสร้างสารยับยั้งราก่อโรคพืช 4 ชนิด คือ *Colletotrichum gloeosporioides* DOAC 0782, *Alternaria brassicicola* DOAC 0436, *Fusarium oxysporum* DOAC 1808 และ *Pestalotiopsis* sp. DOAC 1098 ของราทะเลและราเอนโดไฟท์ จากป่าชายเลนจำนวน 5 สายพันธุ์ เริ่มจากการทดสอบยืนยันฤทธิ์ของสารสกัดในการยับยั้งราก่อโรคพืชด้วยการเลี้ยงราในสภาวะตั้งต้นในอาหารเหลว PDB บ่มโดยใช้สภาวะตั้งต้นสองสภาวะ คือ ตั้งทิ้งไว้ และเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที ผลการศึกษาด้วยวิธี disc diffusion พบว่าสารสกัดเอธิลอะซิเตตจากน้ำเลี้ยงเชื้อราป่าชายเลนทุกสายพันธุ์สามารถยับยั้งราก่อโรคพืชได้ สารสกัดที่ได้จากสภาวะที่มีการเขย่าส่วนใหญ่มีฤทธิ์ยับยั้งดีกว่าผลของสารสกัดที่ตั้งทิ้งไว้

ทำการหาสภาวะเหมาะสมของราทะเลและราเอนโดไฟท์ ต่อการผลิตสารยับยั้งราก่อโรคพืช ที่ดีโดยใช้สภาวะตั้งต้นที่เขย่า 150 รอบ/นาที ในอาหารเหลว PDB เป็นหลักและปรับสภาวะทางกายภาพอื่นๆ ได้แก่ ผลของความเค็ม ตามด้วยชนิดของอาหารเหลว ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น ความเร็วในการเขย่า อุณหภูมิ และระยะเวลาในการเลี้ยงตามลำดับ ครั้งละ 1 สภาวะ เลือกสภาวะที่ดีที่สุดไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้งราก่อโรคพืชที่มีประสิทธิภาพของราทะเล คือ ความเค็ม 15-20 ppt อาหาร PDB และ YMB ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6 เขย่าที่ 100-150 รอบ/นาที บ่มที่ 25-28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน และสภาวะเหมาะสมของราเอนโดไฟท์คือ ความเค็ม 0-10 ppt อาหาร PDB YMB และ SDB ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 5-6 เขย่าที่ 100-150 รอบ/นาที บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-7 วัน พบฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคพืชสูงสุด จากสารสกัดของราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 ฤทธิ์ยับยั้งสูงสุดรองลงมาเป็นสารสกัดของราเอนโดไฟท์ สายพันธุ์ BUEN 830 แต่สารสกัดราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 834 มีฤทธิ์ยับยั้งเพิ่มขึ้นสูงสุดคือ 10 เท่า หลังปรับสภาวะเทียบกับการเลี้ยงแบบตั้งทิ้งไว้

ผลผลิตของราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 และราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830 ที่เลี้ยงในอาหารเหลวปริมาตร 50 มิลลิลิตร และ 200 x 5 มิลลิลิตร ไม่แตกต่างกัน แต่เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งราของสารสกัดพบว่าสารสกัดของราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 ที่ได้ภายหลังจากการขยายขนาดการหมัก มีฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคพืชทุกชนิดยกเว้น *Pestalotiopsis* sp. โดยเพิ่มขึ้นประมาณ 0.2-0.4 เท่า

ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดต่อการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชที่ได้ ภายหลังจากการขยายขนาดการหมักของราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 ในการยับยั้ง *C. gloeosporioides* และ *A. brassicicola* เท่ากับ 1024 และ 2048 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนสารสกัดจากราเอนโดไฟท์ สายพันธุ์ BUEN 830 มีค่า MIC ในการยับยั้งราก่อโรคพืชทุกชนิด ≥ 4096 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

คำสำคัญ: สภาวะเหมาะสม/ ราจากป่าชายเลน/ เอนโดไฟท์/ราก่อโรคพืช/ สารยับยั้งรา/ สารสกัด

Abstract

Five marine derived fungi; mangrove fungi and marine endophyte, were studied for their optimal condition to produce antifungal agents against four phytopathogenic fungi; *Colletotrichum gloeosporioides* DOAC 0782, *Alternaria brassicicola* DOAC 0436, *Fusarium oxysporum* DOAC 1808 and *Pestalotiopsis* sp. DOAC 1098. Before optimization, the antifungal potential of the ethyl acetate extracts prepared from fungal cultures in PDB were confirmed. The cultures were under static and shaking at 150 rpm. The ethyl acetate extracts of culture filtrate were tested for antifungal activity by disc diffusion. The antifungal activities were obtained from all extracts, confirmed the antifungal activity of all fungi. The extracts from shaking condition exhibited higher inhibition activity than from the static condition.

Optimization process for the maximum antifungal production was carried out stepwise in liquid medium under various cultural conditions began with salinity and then followed by type of medium, initial pH, shaking rate, temperature, and incubation time. After each optimizing step, the ethyl acetate extracts were tested for antifungal activity by disc diffusion method and the best condition was selected for using in the next step. After final optimization, strong antifungal activities against all phytopathogens were observed. The maximum antifungal activity was obtained after the marine fungi were fermented in 15-20 ppt, PDB and YMB, initial pH 6 after shaking at 100-150 rpm at 25-28 °C for 7 days. For endophytic fungi, the optimization conditions were fermentation in 0-10 ppt either in PDB, YMB or SDB, initial pH 5-6, shaking rate 100-150 rpm at 28 °C for 4-7 days. The highest antifungal activity against all phytopathogens fungi was shown in the marine fungus BUSK 055-1 - broth extracts, followed by the endophytic fungus BUEN 830-broth extracts. The highest optimization was in the extract from endophytic fungus BUEN 834. Ten-fold increasing after optimization compared to static condition was recorded.

The yield of crude extract from 50 ml (Miniscale) and 200 x 5 ml (Scale up) broth culture under optimization were not different but the antifungal activity of the marine fungus BUSK 055-1 - broth extract against all fungi increased 0.2-0.4 times, except *Pestalotiopsis* sp.

The extracts from marine fungus BUSK 055-1 showed the minimum inhibitory concentration (MIC) by agar dilution technique against *C. gloeosporioides* and *A. brassicicola*, were 1024 and 2048 $\mu\text{g/ml}$, respectively. The MIC of the endophytic fungus BUEN 830-broth extracts against all phytopathogens fungi were $\geq 4096 \mu\text{g/ml}$.

Keywords: Optimize condition, Mangrove fungi, Endophyte, Phytopathogenic fungi, Antifungal, Extract

สารบัญเรื่อง

| | หน้า |
|--|------|
| บทที่ 1 บทนำ | |
| ความสำคัญและที่มาของปัญหา..... | 1 |
| วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... | 3 |
| ขอบเขตของการวิจัย..... | 4 |
| ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... | 4 |
| บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง | |
| รายละเอียดในระบบนิเวศป่าชายเลน..... | 5 |
| โรคพืช และราก่อโรคพืช..... | 7 |
| การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี..... | 12 |
| ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากรากทะเล..... | 13 |
| สภาวะในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ..... | 14 |
| วิธีการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราก..... | 22 |
| เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา..... | 23 |
| บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย | |
| สายพันธุ์จุลินทรีย์..... | 26 |
| อาหารเลี้ยงเชื้อ..... | 26 |
| การทดสอบยืนยันประสิทธิภาพของรากจากป่าชายเลนต่อราก่อโรคพืชบนอาหาร แข็งด้วยวิธีการเลี้ยงเชื้อร่วมกัน..... | 27 |
| การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงรากจากป่าชายเลนให้ผลิตสารยับยั้ง ราก่อโรคพืช | 29 |
| การศึกษาความสัมพันธ์ของการเจริญ กับความสามารถในการผลิตสารยับยั้ง ราก่อโรคพืชของรากจากป่าชายเลน..... | 31 |
| การศึกษาผลของการใช้สภาวะเหมาะสมกับการเลี้ยงรากจากป่าชายเลน ในการขยายขนาดการผลิต | 32 |
| การหาค่า minimum inhibition concentration ของสารสกัดที่ได้ต่อราก่อโรคพืช ด้วยวิธี agar dilution..... | 33 |

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

| | หน้า |
|---|------|
| บทที่ 4 ผลการวิจัย | |
| การทดสอบยืนยันประสิทธิภาพของราจากป่าชายเลนต่อราก่อโรคพืชบนอาหารแข็งด้วยวิธีการเลี้ยงเชื้อร่วมกัน..... | 34 |
| การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคพืชของสารสกัดจากราป่าชายเลนที่เลี้ยงในสภาวะตั้งต้น..... | 35 |
| การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารยับยั้งราก่อโรคพืชของราจากป่าชายเลน..... | 35 |
| สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้งราก่อโรคพืชของราทะเลบนเศษไม้ในป่าชายเลน สายพันธุ์ BUCS 004..... | 36 |
| สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้งราก่อโรคพืชของราทะเลบนเศษไม้ในป่าชายเลน สายพันธุ์ BUSK 055-1..... | 44 |
| สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้งราก่อโรคพืชของราเอนโดไฟท์ จากพืชป่าชายเลน สายพันธุ์ BUEN 121..... | 49 |
| สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้งราก่อโรคพืชของราเอนโดไฟท์ จากพืชป่าชายเลน สายพันธุ์ BUEN 830 | 61 |
| สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้งราก่อโรคพืชของราเอนโดไฟท์ จากพืชป่าชายเลน สายพันธุ์ BUEN 834..... | 69 |
| การศึกษาการเปรียบเทียบสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้งราก่อโรคพืชของราจากป่าชายเลนสายพันธุ์ต่างๆ..... | 77 |
| การเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคพืชของสารสกัดที่ได้จากราป่าชายเลนแต่ละสายพันธุ์..... | 77 |
| การศึกษาความสัมพันธ์ของการเจริญกับความสามารถในการผลิตสารยับยั้งราก่อโรคพืชของราจากป่าชายเลน..... | 79 |
| การศึกษาผลของการใช้สภาวะเหมาะสมกับการเลี้ยงราจากป่าชายเลนในการขยายขนาดการหมัก..... | 79 |
| การหาค่า minimum inhibition concentration ของสารสกัดภายหลังการขยายขนาดการหมักในการยับยั้งราก่อโรคพืช..... | 81 |

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

| | หน้า |
|---|------------|
| บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการศึกษา | |
| สรุปผลการทดลอง..... | 84 |
| อภิปรายผลการทดลอง..... | 85 |
| สรุปและข้อเสนอแนะ..... | 89 |
| ผลผลิต..... | 89 |
| บรรณานุกรม..... | 90 |
| ภาคผนวก..... | 109 |
| ประวัติคณะผู้วิจัย | 110 |

สารบัญตาราง

| ตารางที่ | | หน้า |
|----------|---|------|
| 1 | สารยับยั้งราก่อโรคจากราในระบบนิเวศทางทะเล..... | 15 |
| 2 | สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ จากราในระบบนิเวศทางทะเล..... | 16 |
| 3 | ชนิดของอาหารเหลวในการเลี้ยงราเอนโดไฟท์เพื่อผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ..... | 18 |
| 4 | ชนิดของอาหารเหลวในการเลี้ยงราทะเลเพื่อผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ.... | 19 |
| 5 | ปัจจัยทางกายภาพอื่นๆ ในการเลี้ยงราเอนโดไฟท์เพื่อผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ..... | 20 |
| 6 | ปัจจัยการภาพอื่นๆ ในการเลี้ยงราทะเลเพื่อผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ..... | 21 |
| 7 | สถานะตั้งต้นที่ใช้ในการผลิตสารยับยั้งราก่อโรคพืชของราจากป่าชายเลน..... | 29 |
| 8 | สถานะทางกายภาพที่ศึกษาสถานะเหมาะสมของราป่าชายเลนต่อการผลิตสารยับยั้งราก่อโรคพืช..... | 31 |
| 9 | ระดับ antibiosis ของราจากป่าชายเลนเมื่อเลี้ยงร่วมกับราก่อโรคพืชบนอาหาร PDA/DW และ PDA/SW เป็นระยะเวลา 3 วัน..... | 34 |
| 10 | ผลของความเค็มต่อความสามารถของราทะเลสายพันธุ์ BUCS 004 ในการผลิตสารยับยั้งการเจริญราก่อโรคพืช..... | 36 |
| 11 | ผลของชนิดอาหารเหลวเลี้ยงราทะเลสายพันธุ์ BUCS 004 ต่อความสามารถในการผลิตสารยับยั้งการเจริญราก่อโรคพืช | 37 |
| 12 | ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเหลวเลี้ยงราทะเลสายพันธุ์ BUCS 004 ต่อความสามารถในการผลิตสารยับยั้งการเจริญราก่อโรคพืช..... | 38 |
| 13 | ผลของความเร็วในการเขย่าเลี้ยงราทะเลสายพันธุ์ BUCS 004 ในการผลิตสารยับยั้งการเจริญราก่อโรคพืช..... | 39 |
| 14 | ผลของอุณหภูมิในการเลี้ยงราทะเลสายพันธุ์ BUCS 004 ต่อความสามารถในการผลิตสารยับยั้งการเจริญราก่อโรคพืช..... | 39 |
| 15 | ผลของระยะเวลาเลี้ยงราทะเลสายพันธุ์ BUCS 004 ต่อความสามารถในการผลิตสารยับยั้งการเจริญราก่อโรคพืช..... | 40 |
| 16 | สถานะทางกายภาพของราทะเลสายพันธุ์ BUCS 004 ที่เพิ่มฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคพืช เมื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดด้วยวิธี disc diffusion | 42 |

สารบัญตาราง (ต่อ)

| ตารางที่ | | หน้า |
|----------|---|------|
| 17 | เปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคพืชของสารสกัดจากรากทะเลสาวยพันธ์ุ BUCS 004 เมื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดด้วยวิธี disc diffusion | 43 |
| 18 | ผลของความเค็มต่อความสามารถของทะเลสาวยพันธ์ุ BUSK 055-1 ในการผลิตสารยับยั้งการเจริญราก่อโรคพืช..... | 44 |
| 19 | ผลของชนิดอาหารเหลวเลี้ยงราก่อโรคพืชทะเลสาวยพันธ์ุ BUSK 055-1 ต่อความสามารถ ในการผลิตสารยับยั้งการเจริญราก่อโรคพืช..... | 45 |
| 20 | ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเหลวเลี้ยงราก่อโรคพืชทะเลสาวยพันธ์ุ BUSK 055-1 ต่อความสามารถในการผลิตสารยับยั้งการเจริญราก่อโรคพืช... | 46 |
| 21 | ผลของความเร็วในการเขย่าเลี้ยงราก่อโรคพืชทะเลสาวยพันธ์ุ BUSK 055-1 ในการผลิต สารยับยั้งการเจริญราก่อโรคพืช..... | 47 |
| 22 | ผลของอุณหภูมิในการเลี้ยงราก่อโรคพืชทะเลสาวยพันธ์ุ BUSK 055-1 ในการผลิต สารยับยั้งการเจริญราก่อโรคพืช..... | 48 |
| 23 | ผลของระยะเวลาในการเลี้ยงราก่อโรคพืชทะเลสาวยพันธ์ุ BUSK 055-1 ในการผลิต สารยับยั้งการเจริญราก่อโรคพืช..... | 48 |
| 24 | สภาวะทางกายภาพของราก่อโรคพืชทะเลสาวยพันธ์ุ BUSK 055-1 ที่เพิ่มฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคพืช..... | 50 |
| 25 | เปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคพืชของสารสกัดที่ได้จากรากทะเลสาวยพันธ์ุ BUSK 0551 เมื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดด้วยวิธี disc diffusion ... | 52 |
| 26 | ผลของความเค็มต่อความสามารถของราเอนโดไฟท์สายพันธ์ุ BUEN 121 ในการผลิตสารยับยั้งการเจริญราก่อโรคพืช..... | 53 |
| 27 | ผลของชนิดของอาหารเหลวเลี้ยงราเอนโดไฟท์สายพันธ์ุ BUEN 121 ต่อความสามารถในการผลิตสารยับยั้งการเจริญราก่อโรคพืช..... | 55 |
| 28 | ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเหลวเลี้ยงราเอนโดไฟท์สายพันธ์ุ BUEN 121 ต่อความสามารถในการผลิตสารยับยั้งการเจริญราก่อโรคพืช..... | 55 |

สารบัญตาราง (ต่อ)

| ตารางที่ | | หน้า |
|----------|---|------|
| 29 | ผลของความเร็วในการเขย่าเลี้ยงราเอนโคไฟท์สายพันธุ์ BUEN 121 ในการผลิตสารยับยั้งการเจริญร่าก่อโรคพืช..... | 56 |
| 30 | ผลของอุณหภูมิในการเลี้ยงราเอนโคไฟท์สายพันธุ์ BUEN 121 ต่อความสามารถในการผลิตสารยับยั้งการเจริญร่าก่อโรคพืช..... | 57 |
| 31 | ผลของระยะเวลาในการเลี้ยงราเอนโคไฟท์สายพันธุ์ BUEN 121 ต่อความสามารถในการผลิตสารยับยั้งการเจริญร่าก่อโรคพืช..... | 57 |
| 32 | สภาวะทางกายภาพของราเอนโคไฟท์สายพันธุ์ BUEN 121 ที่เพิ่มฤทธิ์ยับยั้งร่าก่อโรคพืชเมื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดด้วยวิธี disc diffusion | 59 |
| 33 | เปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งร่าก่อโรคพืชของสารสกัดที่ได้จากราเอนโคไฟท์สายพันธุ์ BUEN 121 เมื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดด้วยวิธี disc diffusion | 60 |
| 34 | ผลของความเค็มต่อความสามารถของราเอนโคไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830 ในการผลิตสารยับยั้งการเจริญร่าก่อโรคพืช..... | 61 |
| 35 | ผลของชนิดของอาหารเหลวเลี้ยงราเอนโคไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830 ต่อความสามารถในการผลิตสารยับยั้งการเจริญร่าก่อโรคพืช..... | 62 |
| 36 | ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเหลวเลี้ยงราเอนโคไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830 ต่อความสามารถในการผลิตสารยับยั้งการเจริญร่าก่อโรคพืช..... | 63 |
| 37 | ผลของความเร็วในการเขย่าเลี้ยงราเอนโคไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830 ในการผลิตสารยับยั้งการเจริญร่าก่อโรคพืช..... | 64 |
| 38 | ผลของอุณหภูมิในการเลี้ยงราเอนโคไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830 ต่อความสามารถในการผลิตสารยับยั้งการเจริญร่าก่อโรคพืช..... | 65 |
| 39 | ผลของระยะเวลาในการเลี้ยงราเอนโคไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830 ต่อความสามารถในการผลิตสารยับยั้งการเจริญร่าก่อโรคพืช..... | 66 |
| 40 | สภาวะทางกายภาพของราเอนโคไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830 ที่เพิ่มฤทธิ์ยับยั้งร่าก่อโรคพืช เมื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดด้วยวิธี disc diffusion | 67 |

สารบัญตาราง (ต่อ)

| ตารางที่ | | หน้า |
|----------|---|------|
| 41 | เปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งรากล่อโรคพืชของสารสกัดที่ได้จากราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830 เมื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดด้วยวิธี disc diffusion.... | 68 |
| 42 | ผลของความเค็มต่อความสามารถของราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 834 ในการผลิตสารยับยั้งการเจริญรากล่อโรคพืช..... | 69 |
| 43 | ผลของชนิดของอาหารเหลวเลี้ยงราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 834 ต่อความสามารถในการผลิตสารยับยั้งการเจริญรากล่อโรคพืช..... | 70 |
| 44 | ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเหลวเลี้ยงราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 834 ต่อความสามารถในการผลิตสารยับยั้งการเจริญรากล่อโรคพืช..... | 71 |
| 45 | ผลของความเร็วในการเขย่าเลี้ยงราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 834 ในการผลิตสารยับยั้งการเจริญรากล่อโรคพืช..... | 72 |
| 46 | ผลของอุณหภูมิในการเลี้ยงราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 834 ต่อความสามารถในการผลิตสารยับยั้งการเจริญรากล่อโรคพืช..... | 72 |
| 47 | ผลของระยะเวลาในการเลี้ยงราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 834 ต่อความสามารถในการผลิตสารยับยั้งการเจริญรากล่อโรคพืช..... | 73 |
| 48 | สภาวะทางกายภาพของราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 834 ที่เพิ่มฤทธิ์ยับยั้งรากล่อโรคพืช เมื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดด้วยวิธี disc diffusion | 74 |
| 49 | เปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งรากล่อโรคพืชของสารสกัดที่ได้จากราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 834 เมื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดด้วยวิธี disc diffusion | 76 |
| 50 | สภาวะทางกายภาพที่เหมาะสมของราจากป่าชายเลนแต่ละสายพันธุ์ต่อการผลิตสารยับยั้งรากล่อโรคพืช..... | 78 |
| 51 | ฤทธิ์ยับยั้งรากล่อโรคพืชของสารสกัดจากราจากป่าชายเลนแต่ละสายพันธุ์เมื่อเลี้ยงราจากป่าชายเลนภายหลังการศึกษาสภาวะเหมาะสม..... | 78 |
| 52 | ผลผลิตของราจากป่าชายเลนจากการศึกษาก่อนและหลังขยายขนาดการหมัก | 81 |
| 53 | ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากราป่าชายเลน และยา fluconazole ในการยับยั้งการเจริญรากล่อโรคพืช..... | 83 |

สารบัญภาพ

| ภาพที่ | | หน้า |
|--------|---|------|
| 1 | ลักษณะทางสัณฐานของ <i>A. brassicicola</i> DOAC 0436 ก่อโรคใบจุดสีดำในคะน้า | 8 |
| 2 | ลักษณะทางสัณฐานของ <i>C. gloeosporioides</i> DOAC 0782 ก่อโรคแอนแทรคโนส ในถั่วเหลือง..... | 9 |
| 3 | ลักษณะทางสัณฐานของ <i>F. oxysporum</i> DOAC 1808 ก่อโรคตายพรายในกล้วย..... | 10 |
| 4 | ลักษณะทางสัณฐานของ <i>Pestalotiopsis</i> sp. DOAC 1098 ก่อโรคใบไหม้ในมังคุด | 11 |
| 5 | ระยะยับยั้งของสารสกัดจากราทะเลสาบพันธุ์ BUCS 004 จากการศึกษาสภาวะ ตั้งต้นโดยตั้งทิ้งไว้และเขย่า ด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที และภายหลัง การศึกษา สภาวะเหมาะสมต่อการยับยั้งการเจริญราก่อโรคพืช..... | 41 |
| 6 | ฤทธิ์ยับยั้ง <i>C. gloeosporioides</i> ของสารสกัดจากราทะเลสาบพันธุ์ BUSK 055-1 ที่สภาวะต่าง ๆ..... | 51 |
| 7 | ระยะยับยั้งของสารสกัดของราทะเลสาบพันธุ์ BUSK 055-1 จากการศึกษาสภาวะ ตั้งต้นโดยตั้งทิ้งไว้และเขย่า ด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที และภายหลังการศึกษา สภาวะที่เหมาะสม ต่อการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืช..... | 53 |
| 8 | ระยะยับยั้งของสารสกัดของราทะเลสาบพันธุ์ BUEN 121 จากการศึกษาสภาวะ ตั้งต้นโดยตั้งทิ้งไว้และเขย่า ด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที และภายหลังการศึกษา สภาวะที่เหมาะสม ต่อการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืช..... | 58 |
| 9 | ระยะยับยั้งของสารสกัดของราทะเลสาบพันธุ์ BUEN 830 จากการศึกษาสภาวะ ตั้งต้นโดยตั้งทิ้งไว้และเขย่า ด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที และภายหลังการศึกษา สภาวะที่เหมาะสมต่อการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืช..... | 66 |
| 10 | ระยะยับยั้งของสารสกัดของราทะเลสาบพันธุ์ BUEN 834 จากการศึกษาสภาวะ ตั้งต้นโดยตั้งทิ้งไว้และเขย่า ด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที และภายหลังการศึกษา สภาวะที่เหมาะสม ต่อการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืช..... | 75 |
| 11 | ระยะยับยั้งราก่อโรคพืชและน้ำหนักแห้งเซลล์ จากการเลี้ยงราทะเลสาบพันธุ์ BUSK 055-1 ในสภาวะที่เหมาะสม | 80 |
| 12 | ระยะยับยั้งราก่อโรคพืช และน้ำหนักแห้งเซลล์ จากการเลี้ยงราแอนโดไฟท์ สายพันธุ์ BUEN 830 ในสภาวะที่เหมาะสม..... | 80 |

สารบัญภาพ (ต่อ)

| ภาพที่ | | หน้า |
|--------|---|------|
| 13 | ระยะยับยั้ง <i>A. brassicicola</i> , <i>C. gloeosporioides</i> , <i>F. oxysporum</i> และ <i>Pestalotiopsis</i> sp. ของสารสกัดจากการเลี้ยงราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 ในสภาวะที่เหมาะสมก่อนและภายหลังการขยายขนาดการหมัก | 82 |
| 14 | ระยะยับยั้ง <i>A. brassicicola</i> (Ab), <i>C. gloeosporioides</i> (Cg), <i>F. oxysporum</i> (Fo) และ <i>Pestalotiopsis</i> sp. (Ps) ของสารสกัดจากการเลี้ยงราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830 ในสภาวะที่เหมาะสมก่อนและภายหลังการขยายขนาดการหมัก..... | 82 |

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

| | | |
|---------------------------------|---|--|
| ANOVA | = | Analysis of variance |
| DMRT | = | Duncan's multiple rang test |
| cm | = | Centimeter |
| H ₂ O | = | Water |
| L | = | Litter |
| LNB | = | Low nutrient broth |
| mg | = | Milligram |
| Mg ₂ SO 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 |
| 0.5x PDB | = | Half-strength of potato dextrose broth |
| SDB | = | Sabouraud dextrose agar |
| YMB | = | Yeast malt broth |

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร

ข้าพเจ้า ผศ.ดร.อภิรดี ปิลาณธนาภักย์ ได้รับทุนสนับสนุนโครงการวิจัย จากมหาวิทยาลัยบูรพา ประเภทงบประมาณเงินรายได้ จากเงินอุดหนุนจากรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) มหาวิทยาลัยบูรพา เรื่อง “การปรับปรุงสภาวะในการสร้างสารต้านราจากสิ่งแวดลอมทางทะเล” (Optimization of fungi from marine environments for production of antifungal compounds against fungal phytopathogens) รหัสโครงการ 2559A10802174 สัญญาเลขที่ 92/2559 ได้รับงบประมาณรวมทั้งสิ้น สองแสนเจ็ดหมื่นหนึ่งพันเจ็ดร้อยบาท ระยะเวลาดำเนินงาน ระหว่างวันที่ 1 ตุลาคม 2558- 27 กันยายน 2561

บทคัดย่อ

ศึกษาสภาวะเหมาะสมของราจากสิ่งแวดลอมทางทะเลในการสร้างสารยับยั้งราก่อโรคพืช 4 ชนิด คือ *Colletotrichum gloeosporioides* DOAC 0782, *Alternaria brassicicola* DOAC 0436, *Fusarium oxysporum* DOAC 1808 และ *Pestalotiopsis* sp. DOAC 1098 ของราทะเลและราเอนโดไฟท์จากป่าชายเลน จำนวน 5 สายพันธุ์ เริ่มจากการทดสอบยืนยันฤทธิ์ของสารสกัดในการยับยั้งราก่อโรคพืช ด้วยการเลี้ยงราในสภาวะตั้งต้นในอาหารเหลว PDB บ่มโดยใช้สภาวะตั้งต้นสองสภาวะ คือตั้งทิ้งไว้ และเขย่า ด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที ผลการศึกษาด้วยวิธี disc diffusion พบว่าสารสกัดเอธิลอะซิเตตจากน้ำเลี้ยงเชื้อราป่าชายเลนทุกสายพันธุ์สามารถยับยั้งราก่อโรคพืชได้และสารสกัดที่ได้จากสภาวะที่มีการเขย่าส่วนใหญ่มีฤทธิ์ยับยั้งดีกว่าผลของสารสกัดที่ตั้งทิ้งไว้

ทำการหาสภาวะเหมาะสมของราทะเลและราเอนโดไฟท์ต่อการผลิตสารยับยั้งราก่อโรคพืชที่ดีโดยใช้สภาวะตั้งต้นที่เขย่า 150 รอบ/นาที ในอาหารเหลว PDB เป็นหลักและปรับสภาวะทางกายภาพอื่นๆ ได้แก่ ผลของความเค็ม ตามด้วยชนิดของอาหารเหลว ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น ความเร็วในการเขย่า อุณหภูมิ และระยะเวลาในการเลี้ยงตามลำดับ ครั้งละ 1 สภาวะ เลือกสภาวะที่ดีที่สุดไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้งราก่อโรคพืชที่มีประสิทธิภาพของราทะเลคือ ความเค็ม 15-20 ppt อาหาร PDB และ YMB ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6 เขย่าที่ 100-150 รอบ/นาที บ่มที่ 25-28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน และสภาวะเหมาะสมของราเอนโดไฟท์คือ ความเค็ม 0-10 ppt อาหาร PDB YMB และ SDB ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 5-6 เขย่าที่ 100-150 รอบ/นาที บ่มที่ 22-28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4-7 วัน พบฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคพืชสูงสุดจากสารสกัดของราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 ฤทธิ์ยับยั้งสูงสุดรองลงมาคือ สารสกัดของราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830 แต่พบว่าสารสกัดราเอนโดไฟท์ สายพันธุ์ BUEN 834 มีฤทธิ์ยับยั้งเพิ่มขึ้นสูงสุดคือ 10 เท่า หลังปรับสภาวะเทียบกับการเลี้ยงแบบตั้งทิ้งไว้

ผลผลิตของราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 และราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830 ที่เลี้ยงในอาหารเหลวปริมาตร 50 มิลลิลิตร และ 200 x 5 มิลลิลิตร ไม่แตกต่างกัน แต่เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดด้วยวิธี disc diffusion พบว่าสารสกัดของราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 ที่ได้ภายหลังจากการขยายขนาดการหมักมีฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคพืชทุกชนิดยกเว้น *Pestalotiopsis* เพิ่มขึ้นประมาณ 0.2-0.4 เท่า

ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดต่อการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชที่ได้หลังจากการขยายขนาดการหมักของราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 ในการยับยั้ง *C. gloeosporioides* และ *A. brassicicola* เท่ากับ 1024 และ 2048 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนสารสกัดจากราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830 มีค่า MIC ในการยับยั้งราก่อโรคพืชทุกชนิด ≥ 4096 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

คำสำคัญ: สภาวะเหมาะสม/ ราจากป่าชายเลน/ เอนโดไฟท์/ราก่อโรคพืช/ สารยับยั้งรา/ สารสกัด

ผลผลิต

งานวิจัยนี้ได้ นักศึกษาด้านการศึกษาราทะเลและการนำไปใช้ประโยชน์เพิ่มขึ้น 1 คน

สรุปและข้อเสนอแนะ

โดยสรุปจากการศึกษาพบว่าการผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชของราทะเลทั้งที่อยู่ในรูปอิสระในต้นจากและเอนโดไฟท์ในใบพืชชายเลน สามารถถูกกระตุ้นให้สร้างเพิ่มขึ้นและออกฤทธิ์เพิ่มขึ้นได้ โดยการเลี้ยงในอาหารเหลวที่สภาวะเหมาะสม ราทะเลทั้ง 2 ประเภทนี้ต้องการสารอาหารที่สมบูรณ์ และออกซิเจนเป็นสภาวะหลัก ส่วนสภาวะอื่นๆ เช่นความเค็ม ความเป็นกรด-ด่าง แตกต่างกันไปขึ้นกับสายพันธุ์ ดังนั้น การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตผลิตภัณฑ์ชีวภาพจากราสายพันธุ์ใหม่ๆ ก่อนจะนำไปใช้เพื่อการผลิตให้ได้สารออกฤทธิ์ปริมาณสูงๆ จึงเป็นขั้นตอนจำเป็น และหากสามารถลดต้นทุนการผลิตโดยใช้หางนมหรือกากน้ำตาลที่ราคาถูกลงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อทางการค้าก็จะดียิ่งขึ้น

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ราเป็นสาเหตุของโรคในพืชเศรษฐกิจส่วนใหญ่ทั่วโลก รวมถึงพืชเศรษฐกิจในประเทศไทย โดยเฉพาะอย่างยิ่งราในสกุล *Fusarium*, *Colletotrichum*, *Alternaria* และ *Pestalotiopsis* ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้พืชเกิดโรคระหว่างการเจริญและการเก็บเกี่ยว หรือทำให้เกิดโรคในผลผลิตหลังการเก็บเกี่ยว (Strange, 2003; Sharma, Singh, & Singh, 2009) ราในสกุลดังกล่าว ได้แก่ *F. oxysporum* สาเหตุของโรคเหี่ยว (Fusarium wilt) ในพืชหลายชนิด เช่น ถั่วเขียว (Dita et al., 2010) พริก (Suryanto, Potonah, & Munir, 2010) มะเขือเทศ (Rowe, 1980; Chantal et al., 2006) *C. gloeosporioides* สาเหตุการเกิดโรคแอนแทรคโนสในพืชหลายชนิด เช่น พริก (Gopinath, Radhakrishnan, & Jayaraj, 2006; Than et al., 2008) มะม่วง (Gupta et al., 2010) สตรอเบอร์รี่ (Freeman, Horowitz, & Sharon, 2001; Freeman, Shalev, & Katan, 2002) และ *A. brassicicola* สาเหตุโรคใบจุดในพืชตระกูลกะหล่ำ เช่น บรอกโคลี กะหล่ำปลี กะหล่ำดอก ผักกาดขาว (Junji, 2006; Lawrence et al., 2008) ส่วน *Pestalotiopsis* sp. ก่อให้เกิดโรคใบไหม้ในถั่วเขียว (Photital et al., 2004)

ราก่อโรคพืชดังกล่าวทำให้ผลิตผลทางการเกษตรเสียหายเป็นอย่างมาก ส่งผลให้มูลค่าสินค้าทางการเกษตรลดลง และยังคงเสียค่าใช้จ่ายในการควบคุมการระบาดของราก่อโรคพืชเพิ่มขึ้น (Gao, Liu, & Liu, 2004; Jin, et al., 2009) จากการควบคุมโรคพืชโดยใช้สารเคมี การใช้สารเคมีที่มากเกินไปเป็นส่งผลให้ราก่อโรคพืชต้านสารเคมีก่อให้เกิดความยุ่งยากในการควบคุม นอกจากนี้ยังพบว่าสารเคมีที่ใช้ยังส่งผลกระทบต่อมนุษย์ สัตว์ และสิ่งแวดล้อมอีกด้วย (Russel, 2005; Brent, & Hollomon, 2007; Mondali et al., 2009; Wegulo et al., 2011)

ในช่วงเริ่มแรกการศึกษาผลิตภัณฑ์จากราส่วนใหญ่เน้นไปที่ราบก (Terrestrial fungi) แต่พบข้อจำกัดของคุณสมบัติทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของผลิตภัณฑ์ที่ได้ เนื่องจากส่วนใหญ่มีผู้ศึกษาแล้ว (Cabrera et al., 2002; Liu et al., 2006) ความสนใจในการศึกษาราแหล่งใหม่ๆ เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ใหม่ๆ จึงเริ่มขึ้น รวมถึงการศึกษาราในระบบนิเวศทางทะเล (Marine-derived fungi) (Faulkner, 1994) ที่อาจไม่ใช่ราทะเลที่แท้จริง พบการศึกษาราในระบบนิเวศทางทะเล ครั้งแรกในประเทศออสเตรเลียเมื่อ 50 ปีที่ผ่านมา (Cribb & Cribb, 1995) ในระยะหลังมีการศึกษาราในระบบนิเวศทางทะเล รวมถึงราในระบบนิเวศป่าชายเลนเพิ่มมากขึ้น ทำให้ทราบข้อมูลเกี่ยวกับราในระบบนิเวศทางทะเลเพิ่มขึ้นทั้งความรู้ด้านสรีรวิทยา นิเวศวิทยา อนุกรมวิธาน และราทะเลประยุกต์ (Abdel-Wahab, 2005) นอกจากนี้ยังมี

รายงานว่าการจากระบบนิเวศป่าชายเลนเป็นหนึ่งในกลุ่มราชนิดใหม่ๆ ที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีคุณสมบัติทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพแตกต่างจากสารที่ได้จากรา (Davidson, 1995; Faulkner, 2001; Liu et al., 2006; Imhoff, Labes, & Wiese, 2011) ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากราในระบบนิเวศทางทะเลถูกนำมาประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ ทั้งด้านการแพทย์ สิ่งแวดล้อม อุตสาหกรรม ด้านอาหารและยา (Blunt et al., 2008; Kansoh et al., 2010) รวมถึงด้านการเกษตรในการควบคุมโรคพืช (Xiao et al., 2005; Chen, Pan, Tang, Chen, & Lin, 2009) และมีแนวโน้มสูงกว่าจากระบบนิเวศป่าชายเลนจะสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ รวมถึงสารยับยั้งราก่อโรคพืชที่มีประสิทธิภาพสูง เนื่องจากการดำรงชีวิตอยู่ในระบบเฉพาะก็อยู่ภายใต้ความเค็ม ความดัน สารอาหาร การขึ้น-ลงของน้ำทะเล และอุณหภูมิที่หลากหลาย เป็นปัจจัยในการพัฒนาไปสู่กลไกในการสร้างสารออกฤทธิ์ที่แตกต่างจากรากเพื่อให้สามารถแข่งขันกับจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ได้ (Kumaresan & Suryanarayanan, 2002; Sakayaroj et al., 2004; Zhu, & Lin, 2006; Kosta, Jain, & Tiwari, 2008; Mabrouk et al., 2008; Tarman et al., 2011)

ในกระบวนการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของราก หรือราทั่วไปในห้องปฏิบัติการมีปัจจัยหลากหลายเป็นตัวกำหนด ได้แก่ อุณหภูมิ แสงคาร์บอน แสงไนโตรเจน กรดอะมิโน ออกซิเจน และระยะเวลาในการบ่ม เป็นต้น (Xiong et al., 2004; Gogoi et al., 2008) ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมราจะสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลากหลาย (Dobrestov, Dahm, & Qiu, 2006) ปัจจัยทางกายภาพดังกล่าวจึงน่าจะมีความสำคัญต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของจากระบบนิเวศป่าชายเลนเช่นกัน

สภาวะต่างๆที่ใช้ในกระบวนการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ของราในระบบนิเวศทางทะเล รวมถึงรากป่าชายเลนที่มีรายงาน ได้แก่ ชนิดของอาหารเหลว ซึ่งส่วนใหญ่ที่มีรายงานเป็น potato dextrose (PDB), Sabouraud dextrose (SDB) และอาหารที่มีส่วนประกอบของ glucose, peptone, beef extract, malt extract และ yeast extract (Zhu & Lin, 2006; Huang et al., 2008; Yan et al., 2010; Abdel-Wahab et al., 2007; Chen et al., 2003a; Huang et al., 2011a; Bhimba et al., 2011) สภาวะทางกายภาพอื่นๆ ที่มีรายงาน ได้แก่ ความเค็มของอาหารเหลว (Chen et al., 2003a; Zhu & Lin, 2006; Wen et al., 2009) ระยะเวลาในการเลี้ยงรา (Abdel-Wahab et al., 2007; Lin et al., 2008a; Bhimba et al., 2011) อุณหภูมิในการบ่ม (Rukachaisirikul et al., 2011; Lin et al., 2008b; Chen et al., 2003a; Xu et al., 2011) ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเหลว (Huang et al., 2007; Isaka et al., 2009) เป็นต้น

จากรายงาน พบการใช้สภาวะในการเลี้ยงราจากระบบนิเวศทางทะเลให้ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย แต่การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในห้องปฏิบัติการกลับมีค่อนข้างน้อยและส่วนใหญ่ศึกษาในราสายพันธุ์เดียว เช่นการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Aspergillus ustus* MSF3 ที่อาศัยร่วมกับฟองน้ำทะเลโดยใช้

สภาวะทางกายภาพ 6 ปัจจัย ในอาหารเหลว Sabouraud dextrose ได้แก่ ระยะเวลาในการบ่ม ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเหลว ความเค็มของอาหารเหลว แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และอ็อกซิเจน (Kiran et al., 2009) และการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารออกฤทธิ์จากราทะเล *Varicosporina ramulosa* ในอาหารเหลว โดยใช้ปัจจัยทางกายภาพ 5 ปัจจัย ได้แก่ ชนิดอาหารเหลว ระยะเวลาในการบ่ม อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเหลว และความเร็วรอบในการเขย่า (Mabrouk et al., 2008)

งานวิจัยนี้มุ่งศึกษาสภาวะที่เหมาะสม ต่อการผลิตสารยับยั้งราก่อโรคพืชของราในระบบนิเวศป่าชายเลนสองกลุ่ม คือ ราทะเลที่พบบนเศษไม้ในป่าชายเลน ได้แก่ ราทะเลสายพันธุ์ BUCS 004 และ BUSK 055-1 ราเอนโดไฟท์ที่แยกจากใบของพืชป่าชายเลน ได้แก่ ราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 121, BUEN 830 และ BUEN 834 รวมทั้งสิ้น 5 สายพันธุ์ เพื่อให้ผลิตสารยับยั้งราก่อโรคพืชที่มีฤทธิ์ยับยั้งสูงขึ้นโดยศึกษาสภาวะทางกายภาพ 6 ปัจจัย ได้แก่ ความเค็มของอาหารเหลว ชนิดของอาหารเหลว ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเหลว ความเร็วรอบในการเขย่า อุณหภูมิ และระยะเวลาในการบ่ม ตามลำดับ เปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดจากราจากป่าชายเลนที่ผลิตในสภาวะตั้งต้น และภายหลังการเลี้ยงราจากป่าชายเลน ในสภาวะเหมาะสมที่ได้จากการศึกษา จากนั้นขยายขนาดการหมักราจากป่าชายเลนที่มีฤทธิ์ยับยั้งสูงสุดจำนวน 2 สายพันธุ์ โดยใช้สภาวะเหมาะสมที่ได้จากการศึกษา

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงราทะเลที่พบบนเศษไม้ในป่าชายเลน และราเอนโดไฟท์ที่แยกจากใบพืชป่าชายเลนต่อการผลิตสารยับยั้งราก่อโรคพืช
2. ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากการใช้สภาวะเหมาะสมของราทะเลบนเศษไม้ และราเอนโดไฟท์ที่แยกจากใบพืชป่าชายเลนแต่ละสายพันธุ์ในการผลิตสารยับยั้งราก่อโรคพืช เปรียบเทียบกับการใช้สภาวะตั้งต้นทั้งสองสภาวะ ได้แก่ สภาวะที่ตั้งทิ้งไว้และสภาวะที่เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที

ขอบเขตของการวิจัย

ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของราจากป่าชายเลนทั้งหมด 5 สายพันธุ์ โดยคัดเลือกราทะเล 3 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ BUCS 004 และ BUSK 055-1 และราเอนโดไฟท์จากพืชป่าชายเลน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ BUEN 121, BUEN 830 และ BUEN 834 เป็นตัวแทนในการศึกษา ปัจจัยที่ศึกษาได้แก่ ความเค็มของอาหารเหลว ชนิดของอาหารเหลว ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเหลว ความเร็วรอบในการเขย่า อุณหภูมิ และระยะเวลาใน

การเลี้ยง ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพกับราก่อโรคพืช 4 ชนิด คือ *A. brassicicola* DOAC 0436, *C. gloeosporioides* DOAC 0782, *F. oxysporum* DOAC 1808 และ *Pestalotiopsis* sp. DOAC 1098 เปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งที่ได้ระหว่างการศึกษาในสภาวะตั้งต้น และภายหลังจากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสม จากนั้นนำข้อมูลสภาวะที่เหมาะสมของราจากป่าชายเลนที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคพืชจำนวน 2 สายพันธุ์ มาทดลองขยายขนาดการหมัก

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถนำราที่ศึกษาไปใช้ประโยชน์ในการผลิตสารต้านราก่อโรคพืชให้ได้ประสิทธิภาพยิ่งขึ้น โดยการใช้สภาวะที่ศึกษาแล้วว่าเหมาะสม

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ราทะเลในระบบนิเวศป่าชายเลน

ป่าชายเลนเป็นทรัพยากรที่พบได้ในแถบประเทศเขตร้อนและกึ่งเขตร้อน (Macintosh & Ashton, 2000; Kathiresan & Bingham, 2001) พบได้ทั่วไปตามพื้นที่ชายฝั่งทะเล บริเวณปากแม่น้ำ ชายฝั่งทะเล อ่าว ทะเลสาบ และเกาะ ซึ่งเป็นบริเวณที่น้ำทะเลท่วมถึง (Banerjee, 2011) มักจะพบป่าชายเลนที่มีความอุดมสมบูรณ์ในกลุ่มประเทศภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยเฉพาะในประเทศไทย อินโดนีเซีย มาเลเซีย พม่า รวมถึงประเทศไทย (Giri et al., 2011; Donato et al., 2011)

ป่าชายเลนเป็นพื้นที่วิกฤตทางความหลากหลายทางชีวภาพ (Biodiversity hotspots) ของราทะเล (Shearer et al., 2007) ราทะเลจากป่าชายเลนเป็นกลุ่มราขนาดใหญ่อันดับที่สองในกลุ่มของราทะเล (Sridhar, 2004) ในประเทศไทยมีการศึกษาราทะเลครั้งแรกในปี ค.ศ. 1984 (Kohlmeyer, 1984) ปัจจุบันมีรายงานข้อมูลความหลากหลายทางชีวภาพและนิเวศวิทยาของราทะเลในประเทศไทยมากขึ้นจากการสำรวจบริเวณหาดทราย ชายฝั่งทะเล ป่าชายเลน และป่าจาก (Pilantanapak, Jons, & Eaton, 2005; Jones et al., 2006; Sakayaroj, Supaphon, Jones, & Phongpaichit, 2011)

1.1 ราทะเล

Kohlmeyer and Kohlmeyer (1979) แบ่งราทะเลเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ ได้แก่ obligate marine fungi เป็นราที่สามารถเจริญ และสร้างสปอร์ได้เฉพาะในน้ำทะเล และเขตน้ำกร่อย ราทะเลกลุ่มนี้ส่วนใหญ่เป็นราชั้นสูงในกลุ่ม Ascomycota, Basidiomycota รวมถึงรูป anamorph (Sakayaroj et al., 2004) facultative marine fungi เป็นราน้ำจืด หรือราในสิ่งแวดล้อมบนบกที่สามารถเจริญหรือ สร้างสปอร์ได้ในสภาวะแวดล้อมทางทะเล (Kohlmeyer & Kohlmeyer, 1979) ส่วนใหญ่ อยู่ในรูป anamorphic fungi ปัจจุบันนิยมเรียกราทั้งสองกลุ่มนี้รวมกันว่า marine-derived fungi (Bugni & Ireland, 2004)

สามารถพบราทะเลได้ทั่วไปทั้งในน้ำทะเล บริเวณหาดทราย หาดโคลน หรือป่าชายเลน มักยึดเกาะกับชั้นสตรทต่าง ๆ ส่วนใหญ่ เช่น ใบไม้ เนื้อไม้ หญ้าทะเล ปะการัง ดิน ทราย หรือในสัตว์ที่มีกระดองแข็งหรือเปลือกแข็งหุ้ม (Kohlmeyer & Kohlmeyer, 1979; Hyde & Alias, 2000; Tsui & Hyde, 2004; Vrijmoed, 2000) เศษไม้ (Renner, Jensen, & Fenical, 1998; Schlingmann et al., 1998) ราก ผล เมล็ดของพืชที่ขึ้นบริเวณป่าชายเลน (Sakayaroj et al., 2004) ไลเคนส์ (Hawksworth, 2000; Kohlmeyer,

Hawksworth, & Volkman- Kohlmeier, 2004) สัตว์ทะเล เช่น ปลา หอย และปู (Liu et al., 2006; Jones & Pang, 2012) และสาหร่ายทะเล (Barata, 2006; Suryanarayanan et al., 2010)

Schmit & Shearer (2003) รายงานจำนวนราจากป่าชายเลนทั้งหมด 625 สายพันธุ์ ในจำนวนนี้นับรวมสายพันธุ์ที่พบจากตัวอย่างดิน โคลน และพืชป่าชายเลน และเมื่อไม่นานมานี้ Jones et al. (2009) รายงานจำนวนราทะเลชั้นสูงที่พบในป่าชายเลนจำนวน 530 สายพันธุ์ ส่วนข้อมูลราทะเลในประเทศไทย พบราทะเล 154 สายพันธุ์ เป็นราในกลุ่ม Ascomycota 116 สายพันธุ์ Basidiomycota 3 สายพันธุ์ anamorphic fungi 28 สายพันธุ์ และ straminopiles 7 สายพันธุ์ (Jones et al., 2006)

1.2 ราเอนโดไฟท์ และราเอนโดไฟท์จากพืชป่าชายเลน

ราเอนโดไฟท์เป็นราที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชที่สมบูรณ์ แต่ไม่ทำให้พืชเกิดโรค เมื่ออาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชจะเจริญโดยการแทรกเส้นใยไปในเซลล์ หรือระหว่างเซลล์พืชใช้สารอาหารจากพืชที่อยู่อาศัย (Strobel & Long, 1998) สามารถพบราเอนโดไฟท์ได้ในพืชทุกชนิดรวมถึง มอส และไลเคนส์ (Li, Zhou, Guo, & Guo, 2007; U'Ren, Lutzoni, Miadlikowska, & Arnold, 2010) อาจพบการอาศัยในช่วงหนึ่งของวงชีวิต หรือตลอดวงชีวิตในลักษณะพึ่งพาอาศัยกัน (Tanaka et al., 2002) ซึ่งพืชจะปกป้องจากภาวะไม่เหมาะสมต่างๆ ส่วนราเอนโดไฟท์จะสร้างสารออกฤทธิ์บางชนิดที่เป็นประโยชน์แก่พืช (Carroll, 1988) ราเอนโดไฟท์ที่พบส่วนใหญ่เป็นราในกลุ่ม Ascomycota, Basidiomycota และ anamorphic fungi (Carroll, 1988; Stone, Bacon, & White, 2000; Rungjindamai, Pinruan, Choeyklin, Hattori, & Jones, 2008) และส่วนน้อยเป็น Oomycota (Park et al., 2003)

ราเอนโดไฟท์จากพืชป่าชายเลนเป็นราทะเลกลุ่มหนึ่งที่มีผู้ศึกษากันมาก รายงานที่กล่าวถึงส่วนใหญ่จะอยู่แถบประเทศเขตร้อน และกึ่งเขตร้อน เนื่องจากมีทรัพยากรป่าชายเลนเป็นจำนวนมาก มีการศึกษาราเอนโดไฟท์จากพืชป่าชายเลนชนิดต่าง ๆ (Kumaresan & Suryanarayanan, 2001; Ananda & Sridhar, 2002; Yang et al., 2006b; Alias, Zainuddin, & Jones, 2010) ได้แก่ โกงกางใบใหญ่ (*Rhizophora mucronata* Poir) (Xu et al., 2009b; Bhimba et al., 2011) โกงกางใบเล็ก (*R. apiculata* Blume) (Rukachaisirikul et al., 2011) รังกะแต้ (*Kandelia candel* (L.) Druce) (Huang et al., 2007; Chen et al., 2003a; Wen et al., 2009) เต็มมือนาง (*Aegiceras corniculatum* (L.) Blanco) (Huang et al., 2011a; Zhang et al., 2011) แสมขาว (*Avicennia alba* Blume) แสมดำ (*A. officinalis* L.) พังกาหัวสุมดอกแดง (*Bruguiera gymnorrhiza* (L.) Savigny) ถั่วดำ (*B. parviflora* Wight & Arn. ex Griff.) ฝาด ดอกแดง (*Lumnitzera littorea* Voigt) ลำพู (*Sonneratia caseolaris* (L.) Engl.) สีจู้ (*Scyphiphora hydrophyllacea* Gaertn. f.) ตะบูนขาว (*Xylocarpus granatum* Koen.) ตะบูนดำ (*X. Moluccensis* Roem.) (Rukachaisirikul et al., 2011)

2. โรคพืช และราก่อโรคพืช

โรคพืช หมายถึง การที่พืชมีความผิดปกติทางด้านสรีรวิทยา ส่งผลให้พืชนั้นมีโครงสร้างทางสัณฐานวิทยาเปลี่ยนไป โดยจะแสดงอาการบริเวณรอยโรค (Dickinson, 2003) ทำให้พืชเกิดความเสียหาย ส่งผลให้มูลค่าทางเศรษฐกิจของผลผลิตลดลง สาเหตุของโรคพืชเกิดจากปัจจัยทางกายภาพ ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญประการหนึ่งที่ทำให้พืชเกิดโรค ได้แก่ สภาพของดิน สภาพของอากาศ มลพิษในอากาศ สารเคมีที่ใช้รวมถึงการขาดหรือได้รับธาตุอาหารมากเกินไป

มีรายงานสิ่งมีชีวิต 11 กลุ่ม ที่เป็นสาเหตุของโรค ได้แก่ พืชดอกที่เป็นปรสิต (Parasitic angiosperm) สาหร่าย (Algae) หนอนตัวกลม (Nematodes) ไฟโตพลาสมา (Phytoplasma) โอโอไมซีต (Oomycetes) โปรโตซัว (Trypanosomatid) พลาสโมดิโอฟอโรไมซีต (Plasmodiophoromycetes) แบคทีเรีย (Bacteria) รา (Fungi) ไวรัส (Virus) และไวรอยด์ (Viroid) (Strange, 2003) การบุกรุกของจุลินทรีย์โรคพืชจะมีการสร้างเอนไซม์หรือสารพิษที่ทำให้ห้องคัพระกอบของผนังเซลล์พืชสลาย (Omokolo et al., 2003) หรือเมื่อเป็นโรคแล้วสามารถระบาดไปสู่ต้นอื่นได้ (Infection disease) โรคที่เกิดจากสิ่งมีชีวิตมักสร้างความเสียหายกับพืชได้มากและรุนแรง อีกทั้งยังต้องเสียค่าใช้จ่ายในการควบคุมโรคสูงกว่าโรคพืชที่เกิดจากสิ่งไม่มีชีวิต การใช้วิธีการต่างๆ ในการป้องกันหรือลดการเกิดโรคทำให้ต้นทุนการผลิตสูงขึ้น และเกิดการตกค้างของสารพิษที่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค และสภาพแวดล้อมอีกด้วย (Muto et al., 2005)

ราเป็นสาเหตุหลักของอาการผิดปกติในพืชที่พบบ่อย (Rossman & Palm, 2008) ได้แก่ อาการแผลจุด (Spots) อาการไหม้ (Blight) อาการเน่า (Rot) อาการเหี่ยว (Wilt) อาการราน้ำค้าง (Downy mildew) อาการแป้ง (Powdery mildew) อาการแอนแทรกโนส (Anthracnose) อาการราสนิม (Rust) อาการราเขม่าดำ (Smut) อาการเน่าคอดิน (Damping-off) อาการยอดแห้งตาย (Die-back) สามารถจัดจำแนกราก่อโรคพืชได้ 8 ไฟลัมได้แก่ Myxomycota, Plasmodiophoromycota, Oomycota, Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota, Basidiomycota รวมถึงราก่อ anamorphic fungi (Strange, 2003)

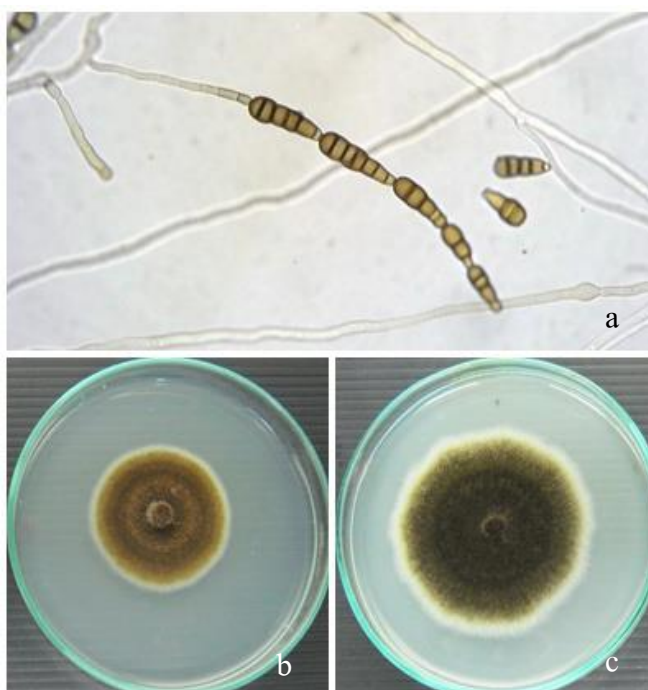
ในประเทศไทยมีราก่อโรคพืชหลายชนิดที่เป็นปัญหาสำคัญทางเศรษฐกิจรวมถึง *A. brassicicola*, *C. gloeosporioides*, *F. oxysporum* และ *Pestalotiopsis* sp. ซึ่งเป็นราทดสอบในการศึกษานี้ ราก่อโรคพืชแต่ละชนิดที่นำมาทดสอบสร้างความเสียหายให้พืชได้แตกต่างกัน ดังนี้

2.1 *Alternaria brassicicola*

เป็นสาเหตุของโรคใบจุดสีดำ (Black spot) ของผักตระกูลกะหล่ำ และผักกาดต่างๆ ทำให้ใบพืชเกิดจุดสีดำ (Chen, Price, & Park-Ng, 2003b; Muto et al., 2005) ทำลายพืชเป้าหมายโดยการสร้างสารพิษ เช่น brassicicenes, fusicoccane-like หรือ diterpenoid (MacKinnon, Keifer, & William,

1999) กลไกการเข้าทำลายมี 2 กลไก กลไกแรกสารพิษที่ผลิตจะทำลายเนื้อเยื่อพืชบางส่วน (Necrosis) กลไกที่สองสารพิษจะส่งผลให้เซลล์ตาย (Apoptosis) (Lawrence et al., 2008) นอกจากนี้ยังเป็นสาเหตุของโรคโคนเน่าระดับดิน โดยจะติดไปกับเมล็ดพันธุ์เมื่อเพาะเมล็ดทำให้รากทำลายต้นอ่อนของพืชตระกูลกะหล่ำ (Shrestha, Mathur, & Munk, 2000; Köhl & Wolf, 2005)

ลักษณะทางสัณฐานของ *A. brassicicola* DOAC 0436 (ภาพที่ 1) conidia มีสีน้ำตาลดำ มีรูปร่างคล้ายกระสวย ท้ายป้าน conidia เกิดต่อกันเป็นลูกโซ่ มีผนังกันตามยาว ตั้งแต่ 0-4 เซลล์ และผนังกันตามขวาง 2-9 เซลล์ ขนาดเซลล์ขนาดประมาณ 4-9 x 20-60 ไมโครเมตร conidiophore ยาวประมาณ 23-84 ไมโครเมตร

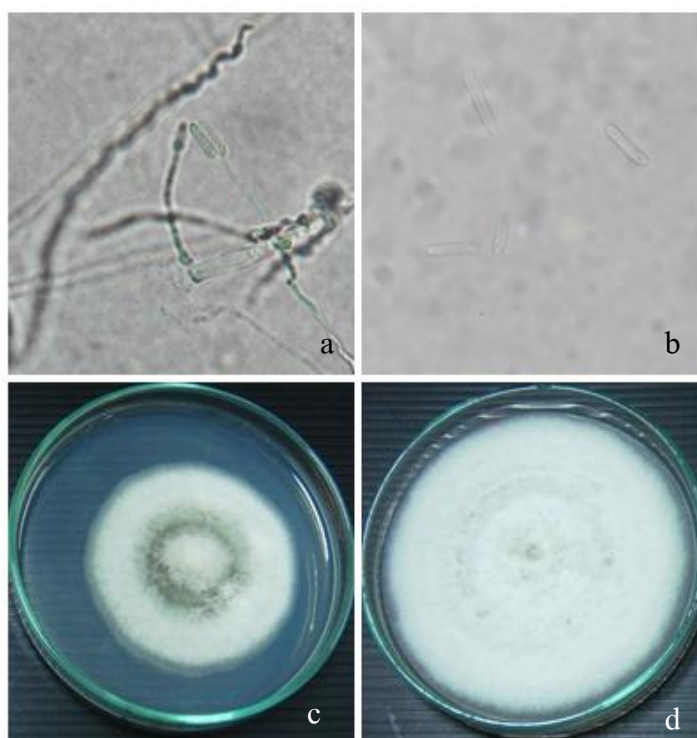


ภาพที่ 1 ลักษณะทางสัณฐานของ *A. brassicicola* DOAC 0436 ก่อโรคใบจุดสีดำในกะหล่ำ; a: Conidia สายยาวบน conidiophore, b: ลักษณะ โคลนินบนอาหาร PDA ที่เตรียมด้วยน้ำกลั่น อายุ 7 วัน, c: ลักษณะ โคลนินบนอาหาร PDA ที่เตรียมด้วยน้ำทะเลความเค็ม 15 ppt อายุ 7 วัน
ที่มา: จิราภรณ์ ธนากุลปกรณณ์และอภิรดี ปิรันชนภักย์

2.2 *Colletotrichum gloeosporioides*

เป็นสาเหตุของโรคแอนแทรคโนส (Anthracnose) ซึ่งเป็นปัญหาเกี่ยวกับทุกส่วนของต้นพืช ได้แก่ ต้นกล้า ยอดอ่อน ช่อดอก ใบ ดอก ผลอ่อน ผลแก่ รวมถึงเป็นปัญหาเกี่ยวกับผลผลิตหลังการเก็บเกี่ยว (Post-harvest) มากกว่าผลผลิตระหว่างการเก็บเกี่ยว (Johnson, Cooke, & Mead, 1993) ตัวอย่างพืชที่ประสบปัญหา เช่น มะม่วง (Sangeetha & Rawal, 2008; Gupta et al., 2010) มะละกอ (Banos et al., 2003) พริก (Gopinath et al., 2006; Than et al., 2008) บางครั้งความเสียหายสูงกว่าร้อยละ 50 ของผลิตผลที่ส่งออก (Kader, 2002) รอยโรคที่พบเป็นแผลกลมรีขนาด 1-2 เซนติเมตร เนื้อเยื่อบริเวณแผลยุบตัวเป็นแอ่ง และพบ acervulus ซ้อนกันบริเวณแผล (Abd-Alla, El-Mohamedy, & Badaea, 2006)

ลักษณะทางสัณฐานของ *C. gloeosporioides* DOAC 0782 (ภาพที่ 2) พบ conidia รูปปร่างทรงกระบอก หัวท้ายมน (Cylindrical) ไม่มีสี ส่วนใหญ่ไม่มีผนังกั้นตามขวาง อาจพบผนังกั้นตามขวาง 1 เซลล์ มีขนาดประมาณ 9-24 x 3-4.5 ไมโครเมตร

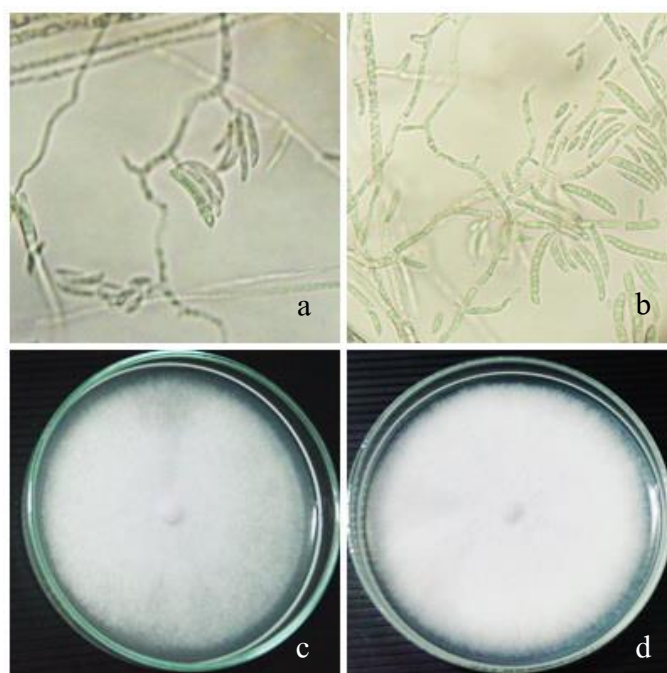


ภาพที่ 2 ลักษณะทางสัณฐานของ *C. gloeosporioides* DOAC 0782 ก่อโรคแอนแทรคโนสในถั่วเหลือง;
 a: Conidia บน conidiophore, b: Single conidia, b: ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA ที่เตรียมด้วยน้ำกลั่น อายุ 7 วัน, c: ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA ที่เตรียมด้วยน้ำทะเลความเค็ม 15 ppt อายุ 7 วัน
 ที่มา: จิราภรณ์ ชนากุลปรกรณ์และอภิรดี ปิรันชนภาคย์

2.3 *Fusarium oxysporum*

เป็นสาเหตุของโรคเหี่ยว (Fusarium wilt) ซึ่งเป็นปัญหาเกี่ยวกับพืชหลายชนิด ได้แก่ แตงกวา (Park, Paulitz, & Baker, 1987) ถั่ว (Dita et al., 2010) พริก (Jabeen et al., 2009; Suryanto et al., 2010) มะเขือเทศ (Steinkellner, Mamerler, & Vierheilig, 2005; Olivian et al., 2006; Chantal et al., 2006; Takken & Rep, 2010) การติดเชื้อเกิดขึ้นบริเวณระบบท่อลำเลียงน้ำ โดยจะเริ่มที่ใบด้านล่างก่อน แล้วจึงลามสู่ใบส่วนที่อยู่ด้านบน ทำให้พืชเกิดอาการใบเหี่ยวกลายเป็นสีน้ำตาลและแห้งเหี่ยวในที่สุด (Steinkellner et al., 2005)

ลักษณะทางสัณฐานของ *F. oxysporum* DOAC 1808 (ภาพที่ 3) ระยะสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศสามารถสร้างสปอร์ได้ 2 แบบ คือ macroconidia มีรูปร่างโค้งเล็กน้อยคล้ายพระจันทร์ครึ่งเสี้ยวถึงเกือบตรง มีผนังกันตามขวาง 3-5 เซลล์ microconidia เป็นรูปไข่ มีผนังกันตามขวาง 1-2 เซลล์ conidia ทั้งสองแบบไม่มีสี เกิดบน conidiophore เมื่ออายุมากขึ้นพบ chlamydospore ซึ่งเป็นสปอร์ในระยะพักจะสะสมอาหารในเส้นใยจนผนังหนาขึ้น

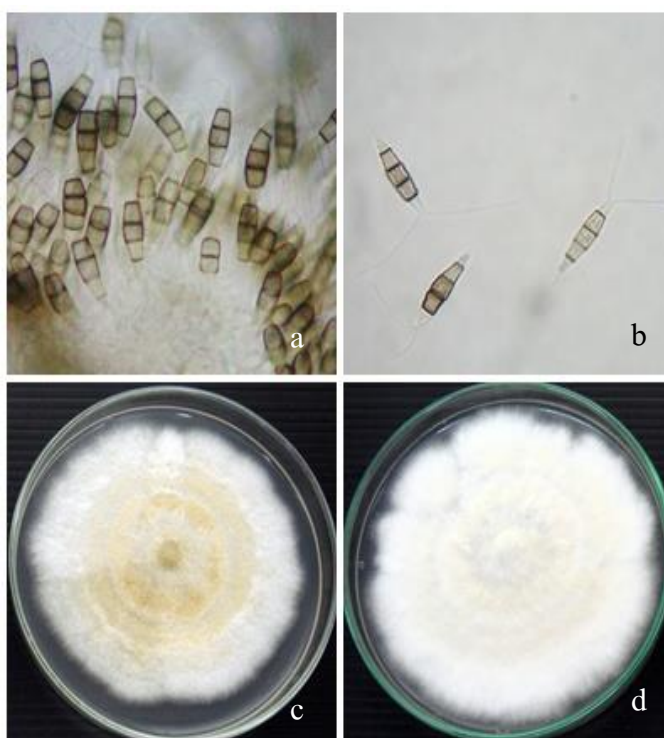


ภาพที่ 3 ลักษณะทางสัณฐานของ *F. oxysporum* DOAC 1808 ก่อนโรคตายพราจในถั่ว; a: Conidia บน conidiophore, b: Single conidia, c: ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA ที่เตรียมด้วยน้ำกลั่น อายุ 7 วัน, d: ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA ที่เตรียมด้วยน้ำทะเลความเค็ม 15 ppt อายุ 7 วัน
ที่มา: จิราภรณ์ ธนากุลปกรณณ์และอภิรดี ปิลาณชนภาคย์

2.4 *Pestalotiopsis* sp.

เป็นสาเหตุของโรคใบจุด (Leaf spot) เริ่มจากเป็นจุดสีเทาขนาดใหญ่ และทำให้เกิดอาการใบแห้งในมังคุด (*Garcinia mangostana*) (Khewkhom, Shangchote, & Sangsiri, 2010) ทำให้เกิดโรคก้านใบ/ใบย่อยไหม้ (Petiole/Rachis blight) ในปาล์ม (Uchaida, 2004) ทำให้เกิดอาการเนื้อเยื่อกิ่งตาย (Twigs dieback) ในบลูเบอร์รี่ (Espinoza et al., Briceño, Keith, & Latorre, 2008) นอกจากนี้ยังทำให้เกิดโรคผลเน่าในระหว่างเก็บเกี่ยว และหลังการเก็บเกี่ยวในฝรั่ง (*Psidium guajava* L.) (Keith, Velasquez, & Zee, 2006)

ลักษณะทางสัณฐานของ *Pestalotiopsis* sp. DOAC 1098 (ภาพที่ 4) เมื่อเลี้ยงบนอาหาร PDA เชื้อเจริญให้โคโลนีสีขาว ลักษณะเป็นวง มีการสร้าง pycnidia ลักษณะคล้ายหยดน้ำสีดำมัน เป็นจำนวนมากในโคโลนี ลักษณะของ conidia มีรูปร่างคล้ายกระสวย มี 5 เซลล์ ลักษณะของส่วนหัวและท้ายมีลักษณะใส กลางเซลล์มีเข็ม ที่ปลายเซลล์มีระยะยาว 2-3 เส้น ขนาดประมาณ 21-28 x 8-10 ไมโครเมตร



ภาพที่ 4 ลักษณะทางสัณฐานของ *Pestalotiopsis* sp. DOAC 1098 ก่อโรคใบไหม้ในมังคุด a: Conidia ใน pycnidium, b: Single conidia, c: ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA ที่เตรียมด้วยน้ำกลั่น อายุ 7 วัน, d: ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA ที่เตรียมด้วยน้ำทะเลความเค็ม 15 ppt อายุ 7 วัน
ที่มา: จิราภรณ์ ชนากุลปกรณและอภิรดี ปิรันชนภาคย์

3. การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี

กว่า 100 ปีที่ผ่านมาการกำจัดศัตรูพืชส่วนใหญ่ใช้สารเคมีเป็นหลัก ส่งผลให้ศัตรูพืชด้านสารเคมี เกิดสารเคมีตกค้างในผลิตผลทางการเกษตร และการใช้สารเคมีผิดประเภทหรือการใช้มากเกินไปยังส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมอีกด้วย จากผลกระทบดังกล่าวบวกกับการเริ่มใช้กฎหมายควบคุมการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชที่รัดกุมมากขึ้น ทำให้เกิดการพัฒนาระบบการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีอย่างต่อเนื่อง (Haject, 2004) มีผู้ให้ความหมายของการควบคุมโดยชีววิธี ได้แก่ การใช้สิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งควบคุมจำนวนประชากรของสิ่งมีชีวิตที่เป็นศัตรูพืชให้มีจำนวนลดลง หรือทำลายศัตรูพืชนั้น (Elinberg et al., 2000) ส่วนความหมายที่กำหนดโดยสถาบันวิทยาศาสตร์สหรัฐอเมริกา (US National academy sciences) ในปี ค.ศ. 1998 หมายถึงการใช้สิ่งมีชีวิตจากธรรมชาติ หรือสิ่งมีชีวิตที่ถูกดัดแปลง ยีน ดัดแปลงผลิตภัณฑ์ของยีน เพื่อลดผลกระทบของสิ่งมีชีวิตที่เป็นศัตรูพืช และเกี่ยวสิ่งมีชีวิตอื่น เช่น พืชไร่ พืชสวน สัตว์ หรือจุลินทรีย์ (Haject, 2004) นักควบคุมโรคพืชบางท่านได้ขยายความเพิ่มเติม ถึงการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี ว่าต้องสามารถปรับเปลี่ยนให้เข้ากับเทคโนโลยีใหม่ๆ ได้ (Charudattan, Chandramohan, & Wyss, 2002) นอกจากนี้ยังหมายถึง การลดปริมาณหรือลดกิจกรรมของจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืชให้อยู่ในระดับที่ไม่ก่อความเสียหายทางเศรษฐกิจ โดยอาศัยสิ่งมีชีวิตและจุลินทรีย์ รวมถึงการใช้ผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติในการควบคุมโรคพืช (Pal & Gardener, 2006)

ปัจจุบันมีการนำราปฏิปักษ์ (Antagonistic fungi) มาใช้ในการควบคุมราก่อโรคพืชเป็นจำนวนมาก เช่น การใช้ *Nigrospora* sp. (WS01), *Penicillium* sp. (WS01), *Trichoderma harzianum* (WS01), *T. hamatum* (WS01), *T. hamatum* (WS01), *T. viride* (WS01) และ *Gliocladium virens* (WS01) ในการควบคุมราโรคพืช *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* และ *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Srinon et al., 2006) การใช้ *T. longibrachiatum*, *T. harzianum*, *T. viride*, *T. koningii* และ *G. roseum* ในการควบคุมราก่อโรคพืช *F. solani*, *F. sambucinum*, *F. moniliforme*, *S. sclerotiorum* และ *R. solani* (Celar, 2003) นอกจากนี้ในกลุ่มดังกล่าวยังพบการนำราทะเล กลุ่มต่างๆ มาประยุกต์ใช้ในการควบคุมราก่อโรคพืชเช่นกัน ได้แก่ ราทะเล *Diaporthe* sp. ในการควบคุม *Aspergillus niger* (Lin et al., 2005) ราเอนโดไฟท์ *Phomopsis* sp. ZSU-H76 ในการควบคุม *F. oxysporum* (Huang et al., 2008) ราทะเล *Varicosporina ramulosa* ในการควบคุม *F. solani* (Mabrouk et al., 2008)

กลไกการควบคุมจุลินทรีย์โรคพืชโดยชีววิธีมี 4 ประเภท คือ

1. กลไกการแข่งขัน (Competition)

เกิดจากการที่จุลินทรีย์ต้องแย่งแย่งสารอาหาร เช่น ธาตุอาหาร อากาศ แร่ธาตุ หรือแม้แต่ที่อยู่อาศัย เพื่อการเจริญ และกิจกรรมของเซลล์ (Klepzig et al., 2001) ตัวอย่างเช่น การแย่งแย่งสารอาหาร

ทำให้เกิดกิจกรรม antagonistic หรือในสภาวะการขาดสารอาหารสามารถทำให้ราผลิตสารออกฤทธิ์ได้ (Celar, 2003) ราที่อาศัยอยู่บริเวณรากพืชจะใช้สารอาหารที่มีโครงสร้างไม่ซับซ้อนในดิน เช่น น้ำตาลที่มีโครงสร้างอย่างง่าย กรดอะมิโน และยังสามารถใช้สารอาหารได้หลากหลายเพื่อการอยู่รอด และแพร่กระจายในดิน (Blackeman, 1978)

2. กลไกการหลังสารยับยั้งการเจริญ (Antibiosis)

จุลินทรีย์ปฏิปักษ์สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญตั้งแต่ 1 ชนิด จากกระบวนการเมแทบอลิซึมแล้วขับออกไปเพื่อความเป็นพิษและฆ่าจุลินทรีย์อื่น หากสารนั้นมีประสิทธิภาพก็จะยับยั้งราโรคพืชได้ในระยะไกล (Pal & Gardener, 2006) ในห้องปฏิบัติการที่ศึกษากลไกนี้ นิยมใช้วิธีการเลี้ยงราปฏิปักษ์ร่วมกับราก่อโรคพืช (Dual culture technique) ตรวจสอบผลโดยวัดระยะยับยั้งจากระยะห่างของขอบโคโลนีราทั้ง 2 ชนิด (Mishra et al., 2011)

3. กลไกปรสิต (Parasitism)

คือการที่จุลินทรีย์ปฏิปักษ์สามารถเจริญอยู่ในราก่อโรคพืชแล้วเข้าทำลาย เพื่อใช้อาหารหรือสารประกอบต่างๆจากราก่อโรคพืช แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่ม necrotrophic mycoparasite เป็นกลุ่มที่รานั้นฆ่าหรือทำลายราก่อโรคพืชให้ตายก่อน โดยการสร้างเอนไซม์ chitinase, cellulase และ β -1, 3-glucanase ออกมาย่อยสลาย ส่วนประกอบของผนังเซลล์ของราก่อโรคพืช ทำให้เส้นใยแตกออกแล้วจึงดูดซึมสารอาหาร กลุ่มที่สอง คือกลุ่ม biotrophic mycoparasite รากลุ่มนี้อาจสร้าง haustoria แทะเข้าไปในเส้นใยของราก่อโรคพืชเพื่อดูดซึมสารอาหารโดยไม่ทำให้ราก่อโรคพืชตาย (Jeffries, 1995; Jacobs, Holtzman, & Seifert, 2005; Kemen et al., 2005)

4. กลไกการชักนำให้เกิดความต้านทานโรค (Induction of host resistance)

สารชีวเคมีที่ผลิตจากจุลินทรีย์ในดินและจุลินทรีย์ที่อาศัยร่วมกับพืช สามารถชักนำให้พืชปกป้องตนเองและนำไปสู่ความต้านทานต่อจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช การชักนำสามารถเกิดขึ้นได้เฉพาะที่ เช่น ใบ ราก ลำต้น หรือทั้งระบบตั้งแต่รากสู่ใบ ขึ้นอยู่กับชนิด แหล่งกำเนิด และจำนวนของชีวเคมีหรือสารกระตุ้นนั้น (Pal & Gardener, 2006) ตัวอย่างสารกระตุ้น ได้แก่ salicylic acid และ jasmonic acid (He et al., 2004) หรือสารที่ผลิตจากแบคทีเรียที่ไม่ก่อโรคบริเวณรากพืช (Yoshida, Sano, Wada, Takabayashi, & Okada, 2009)

4. ผลลัพธ์ธรรมชาติจากรากทะเล

การปรับตัวให้อยู่รอดในระบบนิเวศทางทะเล ไม่ว่าจะเป็นการปรับตัวให้เข้ากับสภาวะทางกายภาพที่มีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา เช่น การขึ้นลงของน้ำ ความเค็ม ความดันออสโมซิส อุณหภูมิ

หรือการปรับตัวต่อสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ในระบบนิเวศ (Bhakuni & Rawat, 2005; Sakayaroj et al., 2004) ทำให้ราทะเลผลิตสารป้องกันตนเอง (Defense compounds) หรือผลิตเพื่อใช้เป็นสารสื่อสัญญาณ (Signaling molecules) (Rohlfis & Churchill, 2011; Rodrigues et al., 2011) สารทุติยภูมิ (Secondary metabolites) ที่ราผลิตขึ้นดังกล่าวเป็นสารที่ไม่จำเป็นต่อการเจริญโดยตรง มีมวลโมเลกุลขนาดเล็ก เรียกว่าผลิตภัณฑ์ธรรมชาติทางทะเล (Marine natural products) ถือได้ว่าราทะเลเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพ (Sakayaroj et al., 2004; Bugni & Ireland, 2004) ปัจจุบันนักวิจัยให้ความสนใจศึกษาผลิตภัณฑ์ทางทะเลเพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะการนำมาประยุกต์ใช้ด้านเภสัชกรรม ไม่ว่าจะเป็นการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ คุณสมบัติทางเคมี เพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์ รวมถึงการพัฒนา (Molinsky et al., 2009)

ปัจจุบันมีการศึกษาผลิตภัณฑ์จากราป่าชายเลนอย่างกว้างขวาง ได้แก่ สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย (Antibacterial agent) เช่น สารกลุ่ม pyrrolidinone กลุ่ม mycoepoxydiene กลุ่ม L-isoleucine (Daferner, Anke, & Sterner, 2022; Lin et al., 2005; Gallardo et al., 2006) สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งโปรโตซัว (Antiprotozoal agent) ของ halorosellinic acid จากราทะเล *Halorosellinia oceanica* (Chinworrungsee et al., 2001) สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งมะเร็ง (Anticancer agent) ของสารกลุ่ม peptides กลุ่ม arugosin กลุ่ม chromone และสารกลุ่ม anthracenedione (Huang et al., 2007; Lin et al., 2008a; Xu et al., 2009a; Zhang et al., 2010) สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งไวรัส (Antiviral agent) ของสารกลุ่ม isoindolones จากราเอนโดไฟท์ *Emericella* sp. (Zhang et al., 2011) และสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งรา (Antifungal agent) ของสารกลุ่ม lactone กลุ่ม benzofuran กลุ่ม dibutylphthalate และสารกลุ่ม ergosterol (Lin et al., 2005; Mabrouk et al., 2008) นอกจากนี้ที่กล่าวมายังมีสารยับยั้งราที่ผู้วิจัยได้รวบรวมไว้ดังแสดงในตารางที่ 1 และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ แสดงในตาราง 2

5. สภาพะในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

ราทะเลเหมือนจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ที่ต้องการสารอาหาร และปัจจัยทางกายภาพที่เหมาะสมเพื่อการเจริญ (Carlile, Watkinson, & Gooday, 2001) เพื่อสร้างพลังงาน เป็นสารโครงสร้างของเซลล์ หรือสารอื่นๆที่เกี่ยวข้องกับกิจกรรมของเซลล์ ได้แก่ เอนไซม์ รวมถึงสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ (Adrio & Demain, 2003; Both et al., 2005) สภาพะที่ราต้องการในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมักจะแตกต่างกันไปตามชนิดและสายพันธุ์ของรา ซึ่งอาจเหมือนหรือแตกต่างกับสารอาหารที่ราต้องการในการเจริญ (Frisvad, Andersen, & Thrane, 2008; Pillay, Polya, & Spangenberg, 2011) ทุกครั้งที่ศึกษาราสายพันธุ์ใหม่ หากต้องการได้ผลผลิตที่ดีจึงจำเป็นต้องศึกษาสภาพะที่เหมาะสมต่อกระบวนการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

ตารางที่ 1 สารยับยั้งราก่อโรคจากราในระบบนิเวศทางทะเล

| ราทะเล | สารยับยั้งรา | ราก่อโรคที่ทดสอบ | อ้างอิง |
|--------------------------------|-----------------------|--|----------------------------------|
| <i>Pestalotiopsis</i> sp. | Pestalotiopyrone | <i>C. albicans</i> , <i>C. neoformance</i> , <i>Microsporium</i> <i>gypseum</i> | Rukachaisirikul et al. (2011) |
| <i>Phomopsis</i> sp. | Cytosporone | <i>C. albicans</i> , <i>F. oxysporum</i> | Huang et al. (2008) |
| <i>Daldinia eschscholzii</i> | Lactone | <i>Cladosporium cucumerinum</i> | Tarman et al. (2012) |
| <i>Acremonium furcatum</i> | L-isoleucine | <i>Colletotrichum truncatum</i> , <i>Macrophomina phaseolina</i> , <i>Botrytis cynerea</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>F. virguliforme</i> , <i>Macrophomina phaseolina</i> | Gallardo et al. (2006) |
| <i>Penicillium chrysogenum</i> | Penicisteroids | <i>Alternaria brassicae</i> , <i>Aspergillus niger</i> | Gao et al. (2011) |
| <i>Fasciatispora nypae</i> | Chromone | <i>C. albicans</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Schizosaccharomyces</i> <i>pombe</i> | Zainuddin et al. (2010) |
| <i>Aspergillus niger</i> | Pyrone | <i>Alternaria brassicae</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>Coniella diplodiella</i> , <i>Physalospora piricola</i> | Liu et al. (2011) |
| <i>Diaporthe</i> sp. | Lactone Benzofuran | <i>Aspergillus niger</i> <i>Alternaria alternata</i> | Lin et al. (2005) |
| <i>Varicosporina ramulosa</i> | Dibutylphthalate | <i>F. solani</i> <i>C. albicans</i> | Mabrouk et al. (2008) |

ตารางที่ 2 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ จากราในระบบนิเวศทางทะเล

| ราทะเล | สารออกฤทธิ์ | ฤทธิ์ทางชีวภาพ | อ้างอิง |
|----------------------------------|---------------------|----------------|---------------------------|
| <i>Zopfiella latipes</i> | Pyrrolidinone | Antibacteria | Daferner et al. (2002) |
| <i>Diaporthe</i> sp. | Mycoepoxydiene | Antibacteria | Lin et al. (2005) |
| <i>Halorosellinia oceanica</i> | Halorosellinic acid | Antiprotozoa | Chinwongsee et al. (2001) |
| <i>Diaporthe</i> sp. | Mycoepoxydiene | Antibacteria | Lin et al. (2005) |
| <i>Penicillium</i> sp. | Arugosin | Anticancer | Lin et al. (2008b) |
| <i>Acremonium furcatum</i> | Isoleucine | Antibacteria | Gallardo et al. (2006) |
| <i>Pestalotiopsis</i> sp. | Chromone | Anticancer | Xu et al. (2009a) |
| <i>Aspergillus</i> sp. | Asperxanthone | Antivirus | Wu et al. (2009) |
| | Asperbiphenyl | | |
| <i>Cosmospora</i> sp. | Aquastatin | Antidiabetic | Seo et al. (2009) |
| <i>Aspergillus sydowi</i> | Oxotryprostatin | Cytotoxic | Zhang et al. (2008b) |
| | Hydroxyterezine | | |
| <i>Halorosellinia</i> sp. | Anthracenedione | Anticancer | Zhang et al. (2010) |
| <i>Emericella</i> sp. | Isoindolones | Antivirus | Zhang et al. (2011) |
| <i>Phoma herbarum</i> | Phthalate | Antibacteria | Bhimba et al. (2012) |
| <i>Halorosellinia</i> sp. | Anthraquinone | Anticancer | Yu et al. (2012) |
| <i>Microsporium</i> sp. | Neoechinulin | Anticancer | Wijesekara et al. (2013) |
| <i>Chrysosporium articulatum</i> | Chysoarticulins | Anticancer | Jeon et al. (2013) |
| <i>Penicillium</i> sp. | Citrinin | Cytotoxic | Subramani et al. (2013) |
| | | Antibacteria | |
| <i>Curvularia</i> sp. | Apralactone | Cytotoxic | Greve et al. (2008) |
| | Dehydrocurvularin | | |

5.1 สารอาหารในการการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

สารอาหารหลักสำหรับการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของรา ได้แก่ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน เช่น กรดอะมิโน หรือธาตุอาหาร ในกรณีของราเอนโดไฟท์จากพืชป่าชายเลน และราทะเลทั่วไป มีการศึกษาความแตกต่างของสูตรอาหารเหลวที่เป็น synthetic media แตกต่างกันไป ประกอบด้วย glucose, dextrose, maltose, yeast extracts, peptone, beef extracts และ malt extract (Lin et al., 2002; Chen et al., 2003a; Zhu & Lin, 2006; Huang et al., 2007; Abdel-Wahab et al., 2007; Huang et al., 2008) เป็นหลัก มีการปรับเปลี่ยนสัดส่วนของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจนแตกต่างกันไปในแต่ละการศึกษา การใช้อาหารประเภท semi-synthetic media ได้แก่ potato dextrose broth (PDB) (Lin et al., 2005; Isaka et al., 2009; Rukachaisirikul et al., 2011; Huang et al., 2011a; Buatong et al., 2011) และ Sabouraud dextrose broth (SDB) (Bhimba et al., 2011) รวมทั้งการใช้อาหารประเภท natural media ที่ไม่ทราบองค์ประกอบอาหาร ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 3 และตารางที่ 4

5.2 สภาพทางกายภาพ

นอกจากสารอาหารแล้ว ปัจจัยทางกายภาพอื่นๆ เช่น ความเค็ม อุณหภูมิ และค่าความเป็นกรด-ด่าง ยังมีความสำคัญต่อกระบวนการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Yu & Keller, 2005) สภาพที่มีรายงาน ได้แก่ ความเค็มหรือเกลือที่ใช้ ส่วนใหญ่จะใช้ NaCl หรือเกลือทะเล (Chen et al., 2003a; Zhu & Lin, 2006; Wen et al., 2009) อาหารเหลวที่เตรียมด้วยน้ำทะเล หรือน้ำทะเลเทียม และอาหารเหลวที่เตรียมด้วยน้ำกลั่น (Lin et al., 2008a; Lin et al., 2008b; Xu et al., 2009a) ระยะเวลาในการเลี้ยงรามีทั้งที่มีรายงาน เป็นระยะเวลาสั้น ๆ ระหว่าง 5 วัน ถึง 16 วัน (Lin et al., 2008b; Bhimba et al., 2011) และระยะเวลาที่มากกว่า 16 วัน ถึง 40 วัน (Huang et al., 2007; Chen et al., 2003a) อุณหภูมิที่มีรายงานอยู่ระหว่าง 24 ถึง 30 องศาเซลเซียส (Chen et al., 2003a; Huang et al., 2007; Rukachaisirikul et al., 2011) ส่วนค่าความเป็นกรด-ด่างที่มีรายงานเท่ากับ 7 หรือเท่ากับค่าของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียม (Huang et al., 2007; Isaka et al., 2009) สภาพทางกายภาพที่ใช้เลี้ยงราเอนโดไฟท์ และราทะเลเพื่อผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ แสดงดังตารางที่ 5 และตารางที่ 6

ตารางที่ 3 ชนิดของอาหารเหลวในการเลี้ยงราเอนโดไฟท์เพื่อผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

| ราเอนโดไฟท์ | พืชที่ร่าอาศัย | อาหารเลี้ยงเชื้อ | องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ | | อ้างอิง |
|--|--|--------------------------|---|--|----------------------------------|
| สายพันธุ์ 1962 | รังกะแท้ (<i>K. candel</i>) | Glucose yeast extract | Yeast extract 1 g/L Peptone 2 g/L | Glucose 10 g/L | Huang et al. (2007) |
| <i>Pestalotiopsis</i> sp. PSU-MA92 | โกงกางใบเล็ก (<i>R. apiculata</i>) | Potato dextrose | Potato starch 4 g/L | Dextrose 20 g/L | Rukachaisirikul et al. (2011) |
| sp. JP-1 | เล็บมือนาง (<i>A. corniculatum</i>) | - | Yeast extracts 3 g/L Corn steep liquor 1 g/L Mg ₂ SO ₄ .7 H ₂ O 0.3 g/L Monosodium glutamate 10 g/L | Mannitol 20 g/L Glucose 10 g/L Maltose 20 g/L KH ₂ PO ₄ 0.5 g/L | Lin et al. (2008b) |
| <i>Alternaria</i> sp. ZJ9-6B | เล็บมือนาง (<i>A. corniculatum</i>) | Potato dextrose | Potato starch 4 g/L | Dextrose 20 g/L | Huang et al. (2011a) |
| สายพันธุ์ 1893 | รังกะแท้ (<i>K. candel</i>) | Glucose yeast extract | Yeast extract 0.5 g/L Peptone 1 g/L Beef extract 0.5 g/L | Glucose 5 g/L | Chen et al. (2003a) |
| <i>Sporothrix</i> sp. (#4335) | รังกะแท้ (<i>K. candel</i>) | Glucose yeast extract | Yeast extract 2 g/L Peptone 1g/L | Glucose 10 g/L | Wen et al. (2009) |

หมายเหตุ - : ไม่ได้รายงานไว้

ตารางที่ 4 ชนิดของอาหารเหลวในการเลี้ยงราทะเลเพื่อผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

| ราทะเล | แหล่งของ รา | อาหาร เลี้ยงเชื้อ | องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ | | อ้างอิง |
|---|----------------|--------------------------|---|-----------------------------------|------------------------------------|
| <i>Massarina</i> sp. CNT-016 | โคลน ทะเล | Yeast malt extract | Malt extract 10 g/L Yeast extracts 4 g/L | Glucose 10 g/L | Abdel-Wahab et al. (2007) |
| <i>Verruculina</i> <i>enalia</i> | เศษไม้ | - | Yeast extracts 0.5 g/L Peptone 1 g/L Beef extract 0.5 g/L | Glucose 5 g/L | Lin et al. (2002) |
| <i>Aigialus</i> <i>parvus</i> BCC5311 | เศษไม้ | Potato dextrose | Potato starch 4 g/L | Dextrose 20 g/L | Isaka et al. (2009) |
| <i>Diaporthe</i> sp. 14LY2 | เศษไม้ | Potato dextrose | Potato starch 4 g/L | Dextrose 20 g/L | Lin et al. (2005) |
| <i>Cladosporium</i> sp. | โคลน ทะเล | - | Yeast extract 5 g/L Peptone 10 g/L | Dextrose 10 g/L | Gallo, Seldes, & Cabrera (2004) |
| <i>Hypoxyton</i> <i>oceanicum</i> | เศษไม้ | Potato dextrose | Potato starch 4 g/L | Dextrose 20 g/L | Chinworrungsee et al. (2001) |
| <i>Penicillium</i> sp. F23-2 | - | - | Potato 40 g/L | Maltose 20 g/L Mannitol 20 g/L | Sun et al. (2009) |

หมายเหตุ -: ไม่ได้รายงานไว้

ตารางที่ 5 ปัจจัยทางกายภาพอื่นๆ ในการเลี้ยงราเอนโดไฟท์เพื่อผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

| ราเอนโดไฟท์ | ปัจจัยทางกายภาพ | | | | | อ้างอิง |
|--|--------------------|-------------------|--|--------------------------------|---------------------------|----------------------------------|
| | ความเค็ม | ระยะเวลา (วัน) | อัตราการ ให้อากาศ (รอบ/ นาที) | อุณหภูมิ (องศา เซลเซียส) | ค่าความเป็น กรด – ด่าง | |
| สายพันธุ์ 1962 | NaCl 2 g/L | 25 | ให้อากาศ | 28 | 7 | Huang et al. (2007) |
| <i>Pestalotiopsis</i> sp. PSU-MA92 | น้ำกลั่น | 28 | - | อุณหภูมิ ห้อง | - | Rukachaisirikul et al. (2011) |
| <i>Pestalotiopsis</i> sp. PSU-MA119 | | | | | | |
| <i>Penicillium</i> sp. JP-1 | น้ำทะเล | 30 | - | 24 | 7 | Lin et al. (2008b) |
| สายพันธุ์ 1893 | NaCl 3 g/L | 40 | ให้อากาศ | 30 | - | Chen et al. (2003a) |
| <i>Alternaria</i> sp. ZJ9-6B | เกลือทะเล 3 g/L | 30 | ให้อากาศ | 28 | - | Huang et al. (2011a) |
| <i>Phomopsis</i> sp. ZSU-H76 | NaCl 3 g/L | 25 | 200 | 30 | - | Huang et al. (2008) |
| <i>Emericella</i> sp. (HK-ZJ) | น้ำทะเล | 30 | ตั้งทิ้งไว้ | 24 | 6.5 | Zhang et al. (2011) |

หมายเหตุ -: ไม่ได้รายงานไว้

ตารางที่ 6 ปัจจัยทางกายภาพอื่นๆ ในการเลี้ยงราทะเลเพื่อผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

| ราทะเล | ปัจจัยทางกายภาพ | | | | | อ้างอิง |
|------------------------------------|------------------|-------------------|-------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|
| | ความเค็ม | ระยะเวลา (วัน) | อัตราการให้ อากาศ (รอบ/นาทีก) | อุณหภูมิ (องศา เซลเซียส) | ค่าความ เป็น กรด - ด่าง | |
| <i>Massarina</i> sp. CNT-016 | น้ำทะเล | 16 | 280 | 27 | - | Abdel- Wahab et al. (2007) |
| <i>Verruculina enalia</i> | น้ำทะเล | 45 | ให้อากาศ (ไม่ระบุ) | 30 | - | Lin et al. (2002) |
| <i>Aigialus parvus</i> BCC 5311 | - | 80 | ตั้งทิ้งไว้ | 25 | - | Isaka et al. (2009) |
| <i>Diaporthe</i> sp. 14LY2 | น้ำทะเล | 7 | 120 | 25 | - | Lin et al. (2005) |
| <i>Cladosporium</i> sp. | น้ำทะเล เทียม | 14 | - | 25 | - | Gallo et al. (2004) |
| <i>Halocyphina villosa</i> | - | 20 | 150 | 22 | 5.5 | Kupka et al. (1981) |
| <i>Penicillium</i> sp. F23-2 | - | 7 | 160 | 28 | - | Sun et al. (2009) |

หมายเหตุ - : ไม่ได้รายงานไว้

6. วิธีการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากรา

6.1 การสกัดสารออกฤทธิ์จากรา

การสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากรานิยมใช้การสกัดด้วยตัวทำละลายที่มีขี้้ว หรือมีขี้้วอ่อนเพื่อละลายสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีขี้้ว หรือมีขี้้วอ่อนจากอาหารเหลวที่ผ่านการเลี้ยงรา ตัวทำละลายที่นิยมใช้ ได้แก่ เอธิลอะซิเตต เอทานอล เฮกเซน เมทานอล และไดคลอโรมีเทน (Motti et al., 2007; Trisuwana et al., 2009; Tarman et al., 2011) ผสมตัวทำละลายกับอาหารที่ผ่านการเลี้ยงรา ในกรวยแยก จากนั้นเขย่าเป็นเวลา 10-15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้สารแยกชั้น ในกรณีที่สารไม่แยกชั้นอาจต้องทำการระเหยบางส่วนแล้วจึงสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดอื่นอีกครั้ง หลังจากตั้งทิ้งไว้ให้แยกส่วนของตัวทำละลายที่มีส่วนของสารออกฤทธิ์ละลายอยู่ จากนั้นนำไประเหยแห้งด้วย rotary evaporator ให้แห้ง ละลายสารสกัดที่ได้ด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมเพื่อเก็บไว้ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

6.2 การศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งร่าก่อโรคของสารสกัด

6.2.1 วิธี Diffusion

เป็นวิธีที่นิยมใช้ทดสอบความไวของจุลินทรีย์ก่อโรคต่อสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีขี้้ว ได้ดีกว่าสารที่ไม่มีขี้้ว (Burns et al., 2000) ในการทดสอบจะใช้แผ่นดิสก์ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ชุบด้วยสารทดสอบ และวางบนผิวหน้าอาหารแข็ง ที่มีจุลินทรีย์ทดสอบ สารออกฤทธิ์จะแพร่สู่อาหาร และยับยั้งการงอก หรือการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ ตรวจสอบผลการทดสอบโดยการวัดขนาดโซนยับยั้ง (Davies et al., 2000) ในการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งร่าก่อโรคพืช นิยมใช้หลักการ diffusion เช่นเดียวกัน แต่มีรายละเอียดบางขั้นตอนที่แตกต่างกันคือ ในขั้นตอนการทดสอบการยับยั้งการเจริญของร่าก่อโรคพืช จะเลี้ยงร่าก่อโรคพืชบนอาหารเป็นเวลา 2-3 วัน จากนั้นจึงนำแผ่นดิสก์ที่ชุบสารวางให้ห่างจากขอบโคโลนีร่าประมาณ 1 เซนติเมตร บ่มเป็นเวลา 2-3 วัน ตรวจสอบผลการทดสอบโดยการวัดระยะยับยั้ง (Inhibition distance) จากขอบโคโลนีร่าก่อโรคพืช ถึงขอบของแผ่นดิสก์ (ดัดแปลงจาก Xia & Ng, 2005; Ye & Ng, 2005)

6.2.2 วิธี Dilution

เป็นวิธีประมาณค่าความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพกับจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ บนอาหารแข็ง หรือในอาหารเหลว ส่วนใหญ่นิยมใช้ในการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ (Minimal inhibitory concentration; MIC) วิธีนี้ใช้ได้กับสารทดสอบที่เป็นสารสกัด สารบริสุทธิ์ สารมีขี้้ว หรือสารไม่มีขี้้ว (Otvos & Cudic, 2007) ทดสอบฤทธิ์ของสารด้วยการผสมสารในอาหารที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ไม่ว่าจะเป็นอาหารแข็ง หรืออาหารเหลว จากนั้นถ่ายเชื้อทดสอบเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของสารที่เตรียมไว้ข้างต้น บ่มและตรวจหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้ง

จุลินทรีย์ก่อโรค โดยดูจากการเจริญของเชื้อ ระดับความเข้มข้นใดที่ไม่พบการเจริญถือว่าเป็น MIC ในกรณีทดสอบในอาหารเหลวนิยมทำเป็น microdilution โดยจะผสมสารและอาหารในหลุม การตรวจผลจะอาศัยการตรวจวัดความขุ่น เมื่อเทียบกับหลุมควบคุมถือว่าระดับความเข้มข้นของหลุมนั้นเป็นค่า MIC (Choma & Grzelak, 2011) หลุมที่ใสเป็นหลุมที่เชื้อไม่เจริญ

7. เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

Chen et al. (2003a) ศึกษาราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ 1893 ที่แยกจากรังกะແທ້ (*K. candel*) ในป่าชายเลนของประเทศจีน ในอาหารเหลวประกอบด้วย glucose 5 กรัม/ลิตร peptone (1 กรัม/ลิตร) yeast extract 0.5 กรัม/ลิตร beef extract 0.5 กรัม/ลิตร และ NaCl 3 กรัม/ลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน สกัดด้วยเอธิลอะซิเตต พบสารชนิดใหม่ ในกลุ่ม lactones 2 ชนิด

Lin et al. (2005) ศึกษาราทะเล *Diaporthe* sp. HLY2 บนเศษใบไม้ในป่าชายเลนของประเทศจีน โดยเลี้ยงในอาหารเหลว PDB ที่ผสมน้ำทะเลร้อยละ 50 (ปริมาตร/ปริมาตร) เขย่าที่ 120 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน สกัดด้วยเอธิลอะซิเตตพบสาร 3 ชนิด เป็นสารใหม่ 1 ชนิด มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *Aspergillus niger* ได้

Abdel-Wahab et al. (2007) ศึกษาราทะเล *Massarina* sp. CNT-016 ที่แยกจากโคลนบริเวณเกาะ Palau โดยเลี้ยงในอาหารเหลว ที่ประกอบด้วย yeast extract 4 กรัม/ลิตร malt extract 10 กรัม/ลิตร และ glucose 10 กรัม/ลิตร ในน้ำทะเลเขย่าด้วยความเร็วที่ 280 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 วัน สกัดด้วยเอธิลอะซิเตตพบสาร 4 ชนิด เป็นสารใหม่ 2 ชนิด

Motti et al. (2007) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต Uguinol ซึ่งเป็นสารยับยั้งเอนไซม์ pyruvate phosphate dikinase ของพืช C4 จากราทะเล 449 ไอโซเลท โดยใช้สภาวะทางกายภาพที่แตกต่างกัน 5 สภาวะ ได้แก่ อาหารที่มีสารอาหารสูง (High nutrient) อาหารที่มีสารอาหารต่ำ (Low-nutrient) อาหารที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างสูง (High pH) อาหารที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำ (Low pH) และอาหารที่ไม่มีเกลือ (No-salt) โดยเตรียมจากน้ำทะเลเทียมและน้ำกลั่นตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 วัน พบว่าอาหารชนิดเด่นที่ส่งผลต่อการผลิต uguinol คือ อาหารที่มีสารอาหารสูง และอาหารที่ไม่มีเกลือ

Mabrouk et al. (2008) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารที่ออกฤทธิ์จากราทะเล *Varicosporina ramulosa* คัดเลือกอาหารเหลว biomalt ที่ประกอบด้วย biomalt 20 กรัม/ลิตร ในการหาสภาวะทางกายภาพที่เหมาะสมโดยใช้ปัจจัยทางกายภาพ 4 ปัจจัย ได้แก่ ระยะเวลา อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง เขย่าด้วยความเร็วรอบต่างๆ พบว่าสภาวะเหมาะสมที่ส่งผลให้อัตราการผลิตสารชนิดที่ 3 สูงที่สุด ได้แก่ ระยะเวลา 8 วัน อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6 และเขย่าด้วยความเร็ว 65 รอบ/นาที และสภาวะที่เหมาะสมที่ส่งผลให้อัตราการผลิตสารชนิดที่ 10 สูงสุด

ได้แก่ ระยะเวลา 10 วัน ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6 อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส และเขย่าที่ 150 รอบ/นาที เมื่อวิเคราะห์สารเบื้องต้นด้วยวิธี TLC พบสาร 13 ชนิด ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์แตกต่างกัน และสารชนิดเด่นๆ คือ สารชนิดที่ 13 สามารถยับยั้ง *Escherichia coli* และ *Bacillus subtilis* บนอาหาร Nutrient agar ยับยั้ง *Candida albicans* และ *Fusarium solani* บนอาหาร Dox agar และสารชนิดที่ 10 สามารถยับยั้ง *Escherichia coli* และ *Bacillus subtilis* บนอาหาร Nutrient agar และ *Candida albicans* บนอาหาร Dox agar ตามลำดับ

Isaka et al. (2009) ศึกษาาราทะเล *Aigialus parvus* BCC 5311 บนไม้ในป่าชายเลนของประเทศ ไทย โดยเลี้ยงในอาหารเหลว PDB ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 80 วัน สกัดด้วยเอธิลอะซิเตตพบสาร 12 ชนิด เป็นสารใหม่ 6 ชนิด และมีสารบางชนิดมีฤทธิ์เป็นสารยับยั้งมาลาเรีย

Xiong et al. (2009) ศึกษาแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารต้านแบคทีเรียจากราทะเล *Cladosporium* sp. F14 โดยใช้อาหารเหลวที่มีสัดส่วนที่แตกต่างกันของแหล่งคาร์บอน ได้แก่ glucose, xylose และ glycerol และแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ yeast extract, tryptone, ammonium sulphate, sodium nitrate และ urea เตรียมด้วยน้ำทะเลปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 100 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน พบว่าสูตรอาหารที่แตกต่างกันมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้ต่างชนิดกัน ได้แก่ อาหารที่มีส่วนประกอบของ glucose และ tryptone ร้อยละ 1 ให้ผลการยับยั้ง *Vibrio fluvialis* ได้ดี แตกต่างจากอาหารที่มีส่วนประกอบ ของ glucose และ yeast extract ร้อยละ 1 ให้ผลการยับยั้ง *Micrococcus luteus* ได้ดี และพบว่าเมื่อไม่มีน้ำตาลการผลิตสารออกฤทธิ์จะน้อยลง

Rukachaisirikul et al. (2011) ศึกษาารานเอนโดไฟท์ *Pestalotiopsis* spp. PSU-MA92 และ PSU-MA119 ที่แยกจากกิ่งของต้นโกงกางใบเล็ก (*R. apiculata*) และต้นโกงกางใบใหญ่ (*R. mucronata*) ในป่าชายเลนของประเทศไทย ตามลำดับ เลี้ยงในอาหารเหลว PDB ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 สัปดาห์ สกัดด้วยเอธิลอะซิเตต พบสาร 6 ชนิด แต่สารเพียงชนิดเดียวเท่านั้นที่เป็นสารยับยั้งรา และแบคทีเรีย คือ pestalotiopyrones B

Xu et al. (2011) ศึกษาารานเอนโดไฟท์ *Pestalotiopsis* sp. ที่แยกจากโกงกางใบใหญ่ (*R. mucronata*) ในป่าชายเลนของประเทศจีน เลี้ยงบนอาหารแข็งที่ใช้ข้าวเป็นซัพสเตรต สกัดด้วยเอธิลอะซิเตต พบสาร 19 ชนิด เป็นสารชนิดใหม่ถึง 16 ชนิด

Bhimba et al. (2012) ศึกษาารานเอนโดไฟท์แยกจากใบพืชป่าชายเลน *Phoma herbarum* VB7 เลี้ยงในอาหารเหลว Sabouraud dextrose สกัดด้วยเอธิลอะซิเตต พบสาร phthalate ที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย

Yu et al. (2012) ศึกษาารานเอนโดไฟท์แยกจากใบพืชป่าชายเลน *Halorosellina* sp. (No. 1403) เลี้ยงในอาหารเหลวที่ประกอบด้วย yeast extract 1 กรัม/ลิตร peptone 2 กรัม/ลิตร และ glucose 10 กรัม/ลิตร ในน้ำทะเลเทียม พบสารในกลุ่ม anthraquinone มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง

Jeon et al. (2013) ศึกษาราทะเล *Chrysosporium articulatum* แยกจากฟองน้ำทะเล ประเทศเกาหลี เลี้ยงในอาหารเหลวที่ประกอบด้วย yeast extract 0.5 กรัม/ลิตร peptone 0.5 กรัม/ลิตร และ glucose 1 กรัม/ลิตร ในน้ำทะเลเทียม บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 21 วัน สกัดสารด้วยเอธิลอะซิเตต เมื่อทำบริสุทธิ์สารพบสาร 3 ชนิด คือ chrysoarticulin A-C เป็นสารในกลุ่ม benzolactones มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง K562 และ A549

Wijesekara et al. (2013) ศึกษาราทะเล *Microsporium* sp. แยกจากสาหร่ายทะเล ในเขตทะเลของประเทศเกาหลี เลี้ยงในอาหารเหลวที่ประกอบด้วย yeast extract 0.5 กรัม/ลิตร peptone 0.5 กรัม/ลิตร และ glucose 1 กรัม/ลิตร ในน้ำทะเลที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 3: 2 บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 วัน สกัดสารด้วยเอธิลอะซิเตตพบสาร neoechinulin A มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

1. สายพันธุ์จุลินทรีย์

ราทะเล BUCS 004 ป็นราที่แยกได้จากเศษไม้ชายฝั่งทะเล จังหวัดฉะเชิงเทรา และ BUSK 55-1 แยกได้จากต้นจาก (*Nypa fruticans*) ในจังหวัดสมุทรสงคราม ราเอนโคไฟท์จำนวน 3 ไอโซเลท แยกได้จากใบพืชชายเลนชนิดต่างๆ เก็บเป็น stock culture ณ ห้องปฏิบัติการราวิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ราก่อโรคพืชใช้เป็นราทดสอบได้แก่ *Colletotrichum gloeosporioides* DOAC 0782, *Alternaria brassicicola* DOAC 0436, *Fusarium oxysporum* DOAC 1808 และ *Pestalotiopsis* sp. DOAC 1098 จัดซื้อจากกรมวิชาการเกษตรกระทรวงเกษตรและสหกรณ์

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

ใช้อาหารที่เตรียมจากน้ำจืด (XXX/dw) และน้ำทะเล (XXX/ SW_{xx ppt}) ดังนี้

Potato dextrose agar (PDA) (Difco, USA) เตรียมด้วยน้ำกลั่น (PDA/dw) และที่เตรียมด้วยน้ำทะเลความเค็ม 15 ppt (PDA/SW_{15 ppt})

Potato dextrose broth (Difco, USA) เตรียมด้วยน้ำกลั่น (PDB/dw) และที่เตรียมด้วยน้ำทะเลความเค็ม 10, 15, 20 และ 30 ppt (PDB/SW_{10, 15, 20, 30 ppt})

0.5x Potato dextrose broth (Difco, USA) เตรียมด้วยน้ำกลั่น (0.5xPDB/dw) และที่เตรียมด้วยน้ำทะเลความเค็ม 10, 15, 20 และ 30 ppt (0.5xPDB/SW_{10, 15, 20, 30 ppt}) โดยลดปริมาณอาหารลงครึ่งหนึ่งจากสูตร

Yeast malt glucose broth (yeast extract 4 g/L, malt extract 10 g/l, dextrose 10g/L) เตรียมด้วยน้ำกลั่น (YMG/dw) และที่เตรียมด้วยน้ำทะเลความเค็ม 10, 15, 20 และ 30 ppt (YMG/SW_{10, 15, 20, 30 ppt})

Low nutrient broth (yeast extract 0.1 g/l, malt extract 0.2 g/l, dextrose 2g/L) เตรียมด้วยน้ำกลั่น (LNB/dw) และที่เตรียมด้วยน้ำทะเลความเค็ม 10, 15, 20 และ 30 ppt (LNB/SW_{10, 15, 20, 30 ppt})

Sabouraud dextrose broth (Difco, USA) เตรียมด้วยน้ำกลั่น (SDB/dw) และที่เตรียมด้วยน้ำทะเลความเค็ม 10, 15, 20 และ 30 ppt (SDB/SW_{10, 15, 20, 30 ppt})

3. การทดสอบยืนยันประสิทธิภาพของราจากป่าชายเลนต่อราก่อโรคพืชบนอาหารแข็งด้วยวิธีการเลี้ยงเชื้อร่วมกัน (Dual culture technique) (ดัดแปลงจากวิธีของ Adebola & Amadi (2010))

3.1. การเตรียมกล้าเชื้อ

ถ่ายเชื้อราจากป่าชายเลนจากหลอดเก็บรักษาสายพันธุ์บริสุทธิ์ลงบนอาหาร PDA ที่เตรียมด้วยน้ำทะเลที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเค็ม 15 ppt (PDA/SW) บ่มเป็นเวลา 10-14 วัน และถ่ายเชื้อราก่อโรคพืชจากหลอดเก็บรักษาสายพันธุ์บริสุทธิ์ลงบนอาหาร PDA ที่เตรียมด้วยน้ำกลั่น (PDA/DW) เป็นเวลา 3-5 วัน บ่มราทุกชนิดที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส จากนั้นใช้ cork borer ปราศจากเชื้อ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร เจาะชิ้นวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเส้นใยราเจริญ ถ่ายลงอาหารแข็งจานใหม่ บ่มโดยใช้สภาวะข้างต้นเพื่อใช้เป็นเชื้อทดสอบในขั้นตอนต่อไป

3.2. การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคพืช

ใช้ cork borer ปราศจากเชื้อ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร เจาะชิ้นวุ้นจากขอบโคโลนีราทะเลมาเลี้ยงร่วมกับราก่อโรคพืช บนอาหาร PDA/DW และ PDA/SW ตามลำดับ โดยวางชิ้นวุ้นให้มีระยะห่างระหว่างราทั้งสองชนิดเท่ากับ 2.5 เซนติเมตร ในกรณีที่ราทะเลที่เจริญช้าจะเลี้ยงราทะเลบนอาหารทดสอบก่อนประมาณ 4-7 วัน บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส แล้วจึงถ่ายเชื้อราก่อโรคพืชมาเลี้ยงร่วมกัน (ทำ 3 ซ้ำ) ตรวจผลการทดลองโดยสังเกตการณ์เกิด antibiosis หลังจากเลี้ยงเชื้อร่วมกันในวันที่ 3 โดยวัดระยะ antibiosis ระหว่างขอบของโคโลนีราจากป่าชายเลนถึงขอบโคโลนีราก่อโรคพืช บันทึกระยะวัดไว้และแบ่งระดับความแรงของระยะ antibiosis ที่ได้ออกเป็น 4 ระดับ ได้แก่ ผลลบ - ไม่พบระยะยับยั้งหรือไม่เกิด antibiosis ผลบวกอ่อน + ระยะยับยั้ง ≤ 0.50 เซนติเมตร ผลบวกปานกลาง ++ ระยะยับยั้ง $> 0.50-1.00$ เซนติเมตร ผลบวกแรง +++ ระยะยับยั้ง $> 1.00-2.00$ เซนติเมตร และผลบวกแรงมาก ++++ ระยะยับยั้ง > 2.00 เซนติเมตร ตามลำดับ (ดัดแปลงมาจาก Prapagdee, Kuekulvong & Mongkolsuk, 2008)

3.3. การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคพืชของสารสกัดจากราป่าชายเลน โดยใช้สภาวะตั้งต้น

3.3.1 การเตรียมกล้าเชื้อ และการเลี้ยงราจากป่าชายเลนในอาหารเหลว

เตรียมกล้าเชื้อราทะเล วิธีเดียวกับการเตรียมกล้าเชื้อในข้อ 1.1 ถ่ายเชื้อ โดยเจาะบริเวณขอบโคโลนีราจากป่าชายเลนในจานอาหารใหม่ จำนวน 5 ชิ้น ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิิตร ที่มีอาหารเหลว PDB ที่เตรียมด้วยน้ำทะเลความเค็ม 15 ppt (PDB/DW) สำหรับเลี้ยงราทะเล มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 5 เลี้ยงราในอาหารเหลวจำนวน 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส

เป็นเวลา 4 วัน (ราทะเลสายพันธุ์ BUCS 004) และ 7 วัน (ราทะเล) ให้สภาวะดังกล่าวเป็นสภาวะแบบตั้งทิ้งไว้ (Static) และเขย่าที่ 150 รอบ/นาที เมื่อครบกำหนดนำอาหารเหลวที่ผ่านการเลี้ยงรามากรองแยกเส้นใยด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 2 นำน้ำเลี้ยงเชื้อไปสกัดสาร และทดสอบฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคพืช เพื่อยืนยันประสิทธิภาพของสารสกัดที่ได้จากรากปลาชายนอีกครั้งหนึ่งก่อนนำไปหาสภาวะที่เหมาะสมต่อไป

สภาวะตั้งต้น (ตารางที่ 7) ที่ศึกษาประกอบด้วย 2 ชุดการทดลอง ชุดแรก บ่มโดยตั้งทิ้งไว้เป็นสภาวะตั้งต้นที่ 1 ชุดการทดลองที่ 2 เป็นสภาวะตั้งต้นที่ 2 บ่มโดยให้เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที ส่วนสภาวะอื่นๆ ไม่มีการเปลี่ยนแปลง

3.2. การสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (ดัดแปลงวิธีการจาก Isaka et al. (2009))

นำอาหารเหลวที่ผ่านการกรองมาสกัดด้วยเอธิลอะซิเตต ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่าแรงๆ ประมาณ 10 นาที ถึง 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น โดยชั้นบนเป็นส่วนของเอธิลอะซิเตต ชั้นล่างเป็นส่วนของอาหารเหลวที่ผ่านการเลี้ยงรามาจากปลาชายน ไขแยกส่วนของน้ำเลี้ยงราแล้วสกัดด้วยเอธิลอะซิเตตอีกรอบ จากนั้นรวมส่วนเอธิลอะซิเตตเข้าด้วยกัน (ประมาณ 100 มิลลิลิตร) นำไประเหยให้แห้งด้วยเครื่อง Rotary evaporator ให้แห้ง ละลายสารที่ได้ด้วยสารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ที่ปราศจากเชื้อ (50% DMSO) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เก็บสารสกัดที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดในการยับยั้งราก่อโรคพืช

3.3. ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดในการเป็นสารยับยั้งราก่อโรคพืช

ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดด้วยวิธี disc diffusion โดยถ่ายเชื้อราก่อโรคพืช เลี้ยงบนจานอาหาร PDA/DW ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน สำหรับ *C. gloeosporioides*, *F. oxysporum* และ *Pestalotiopsis* sp. และ 5 วัน สำหรับ *A. brassicicola* หยดสารสกัดที่ละลายในสารละลาย 50% DMSO ลงบนแผ่นดิสก์มาตรฐานปราศจากเชื้อปริมาตร 20 ไมโครลิตร ทิ้งให้แห้งสนิท จากนั้นวางแผ่นดิสก์ที่ชุบสารสกัด ให้ห่างจากของโคโลนีราก่อโรคพืช 1 เซนติเมตร บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน ตรวจสอบผลการยับยั้งของสารสกัด โดยวัดระยะห่างจากขอบโคโลนีราก่อโรคพืช ถึงขอบแผ่นดิสก์ (ระยะยับยั้ง; Inhibition distance) เทียบกับชุดควบคุมเชิงลบ คือแผ่นดิสก์ที่ชุบเฉพาะสารละลาย 50% DMSO ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ ต่อ 1 สารสกัด

ตารางที่ 7 สถานะตั้งต้นที่ใช้ในการผลิตสารยับยั้งราก่อโรคพืชของราจากป่าชายเลน

| สถานะตั้งต้น | ระดับสถานะ |
|--|--|
| สถานะตั้งต้นที่ 1 (ตั้งทิ้งไว้) | |
| ความเค็ม | 15 ppt |
| อาหารเหลว | PDB |
| ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น | 5 |
| ความเร็วในการเขย่า | 0 รอบ/นาที |
| อุณหภูมิ | 28 องศาเซลเซียส |
| ระยะเวลา | 7 วัน |
| สถานะตั้งต้นที่ 2 (เขย่าให้อากาศ) | |
| | เหมือนสถานะตั้งต้นที่ 1 ทุกประการ ยกเว้นการ เขย่าที่ 150 รอบ/นาที |

หมายเหตุ PBD:Potato dextrose broth, ppt: Part per thousand

4. การศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการเลี้ยงราป่าชายเลนให้ผลิตสารยับยั้งราก่อโรคพืช

(ดัดแปลงจากการศึกษาของ Kiran et al. (2009))

ศึกษาสถานะทางกายภาพที่มีรายงานว่าส่งผลต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของราป่าชายเลน ได้แก่ ความเค็มของอาหารเหลว ชนิดของอาหารเหลว ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเหลว อัตราเร็วในการเขย่าให้อากาศ อุณหภูมิ และระยะเวลาในการเลี้ยงราจากป่าชายเลน เพื่อศึกษาสถานะเหมาะสมต่อกระบวนการผลิตสารยับยั้งราก่อโรคพืช ทำการเลี้ยงราจากป่าชายเลนในอาหารเหลวจำนวน 3 ชุดการทดลอง และทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ

4.1. การเลี้ยงราจากป่าชายเลนในอาหารเหลว

ใช้สถานะเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที ร่วมกับการปรับสถานะทางกายภาพอื่นๆ ดังตารางที่ 8 เริ่มจากการศึกษาความเค็ม 0, 15 และ 30 ppt ถ่ายเชื้อราจากป่าชายเลนลงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารดังกล่าวเขย่าที่ 150 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7, 10 และ 14 วัน

4.2. การสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

เมื่อครบกำหนดเก็บขบวนการหมักในแต่ละชุดการทดลองมากรองแยกเส้นใย สกัดสารด้วยเอธิลอะซิเตต ระบายแห้ง และทดสอบความสามารถในการยับยั้งราก่อโรคพืชด้วยวิธี disc diffusion ตามที่กล่าวมาในข้อ 3.3

4.3. การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูล (ระยะยับยั้ง) ที่ได้ในแต่ละสภาวะ มาคัดเลือกสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้งราก่อโรคพืชทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ *A. brassicicola*, *C. gloeosporioides*, *F. oxysporum* และ *Pestalotiopsis* sp. โดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติสำเร็จรูป (SPSS version 16) ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ($P=0.05$) เมื่อเกิดความแตกต่างทำการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของระยะยับยั้ง (Multiple comparison) ด้วยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ($P=0.05$) หากพบว่ามีสภาวะเหมาะสมมากกว่าหนึ่งสภาวะ ให้คัดเลือกสภาวะที่เหมาะสมจากระยะยับยั้งเฉลี่ยและค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และต้องคำนึงถึงความสะดวกประหยัดในเรื่องของเวลาหรือค่าใช้จ่าย เพื่อคัดเลือกสภาวะเหมาะสมไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป ตามลำดับ

4.4. เปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งภาพของสารสกัดที่ได้จากป่าชายเลน

เปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งภาพของสารสกัดที่ได้จากป่าชายเลน ตามขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้

1. เปรียบเทียบฤทธิ์การยับยั้งราก่อโรคพืชของสารสกัดที่ได้ จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสม กับผลของสารสกัดจากการศึกษาสภาวะตั้งต้นที่ตั้งทิ้งไว้ และเขย่าที่ 150 รอบ/นาที
2. เปรียบเทียบสภาวะเหมาะสมของรจากป่าชายเลนทั้งสองกลุ่มคือ รทะเลที่พบบนเศษไม้ และราเอนโดไฟท์จากพืชป่าชายเลน
3. เปรียบเทียบระยะยับยั้งสูงสุดที่ได้จากการศึกษาสภาวะเหมาะสมของรจากป่าชายเลนแต่ละสายพันธุ์ เพื่อคัดเลือกรจากป่าชายเลนที่มีฤทธิ์ยับยั้งสูงสุด 2 สายพันธุ์ ไปศึกษารูปแบบการเจริญ และขยายขนาดการหมัก

ตารางที่ 8 สภาวะทางกายภาพที่ศึกษาสภาวะเหมาะสมของราป่าชายเลนต่อการยับยั้งราก่อโรคพืช

| สภาวะทางกายภาพ | ระดับสภาวะ |
|-----------------------------|------------------|
| ความเค็ม | 0, 15 และ 30 ppt |
| อาหารเหลว | PDB, YMB และ SDB |
| ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น | 4, 5 และ 6 |
| ความเร็วในการเขย่า | 150 รอบ/นาที |
| อุณหภูมิ | 28 องศาเซลเซียส |
| ระยะเวลา | 7, 10 และ 14 วัน |

หมายเหตุ YMB: yeast malt glucose broth, SDB: Sabouraud dextrose broth ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นในอาหารด้วย 1 N NaOH และ 1 N HCL

5. การศึกษาความสัมพันธ์ของการเจริญกับความสามารถในการผลิตสารยับยั้งราก่อโรคพืชของราจากป่าชายเลน

ศึกษาความสัมพันธ์ของการเจริญกับความสามารถในการผลิตสารยับยั้งราก่อโรคพืชของราจากป่าชายเลน ที่มีฤทธิ์ยับยั้งสูงสุด 2 สายพันธุ์ โดยใช้ cork borer เจาะชิ้นวุ้น บริเวณขอบโคโลนีราจากป่าชายเลนกล้าเชื้อที่เตรียมไว้ จำนวน 5 ชิ้น ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว 50 มิลลิลิตร และสภาวะทางกายภาพอื่น ๆ ที่เหมาะสมของราแต่ละสายพันธุ์ที่ได้จากการทดลอง บ่มราทะเลเป็นเวลา 7, 10 และ 14 วัน หาน้ำหนักเซลล์แห้ง (ตัดแปลงจากวิธีของ Rasooli & Abyaneh (2004)) กรองแยกเซลล์ และล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 2-3 ครั้ง นำกระดวยกรองที่มีเซลล์ราติดอยู่ด้านบนไปอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส จนแห้ง หรือจนกว่าน้ำหนักคงที่ ควบคุมความชื้นของเซลล์ราบนกระดวยกรองใน โถดูดความชื้น (Desiccator) ประมาณ 30-40 นาที จนอุณหภูมิของกระดวยเป็นปกติ หาน้ำหนักเซลล์แห้งจากน้ำหนักเซลล์แห้งบนกระดวยกรองลบด้วยน้ำหนักกระดวยกรองอบแห้ง นำข้อมูลที่ได้มาเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักแห้ง ระยะเวลาในการบ่มราจากป่าชายเลน และระยะยับยั้งของสารสกัดต่อราก่อโรคพืช

6. การศึกษาผลของการใช้สภาวะเหมาะสมกับการเลี้ยงราจากป่าชายเลนในการขยายขนาดการหมัก

6.1. การขยายขนาดการหมัก (Scale up)

ขยายขนาดการหมักราจากป่าชายเลนที่พบฤทธิ์ยับยั้งร่าก่อโรคพืชสูง มาเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 1000 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลวปริมาตร 200 มิลลิลิตร จำนวน 5 ขวด ใช้สภาวะที่เหมาะสมทั้ง 6 สภาวะจากการทดลองในข้อ 4

6.2. การหาผลผลิตที่ได้ (Yield)

6.2.1 การหาน้ำหนักสารสกัด

เมื่อครบกำหนดกรองแยกเซลล์ราจากอาหารเหลว นำส่วนของอาหารเหลวที่ผ่านการเลี้ยงราจากป่าชายเลน ไปสกัดสารด้วยเอธิลอะซิเตต 2 รอบ นำสารมารวมกันในขวดก้นกลมที่ใช้กับเครื่อง rotary evaporator จากนั้นระเหยสารให้เหลือปริมาตรสุดท้ายประมาณ 10 มิลลิลิตร ถ่ายลงหลอดฝากลีวขนาด 21×70 มิลลิลิตร ที่ปราศจากเชื้อ อบแห้ง และชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง กลั้วสารที่ติดอยู่ในขวดก้นกลมในชั้นแรกด้วยเอธิลอะซิเตต 3-5 ครั้ง (ปริมาตรที่ใช้ประมาณ 5-7 มิลลิลิตร) ถ่ายลงในหลอดฝากลีวข้างต้น สุดท้ายจะมีปริมาตรรวมกันไม่เกิน 20 มิลลิลิตร นำหลอดฝากลีวใส่ในขวดก้นกลม และนำไประเหยให้แห้งอย่างระมัดระวัง หลังจากนั้นตั้งหลอดฝากลีวทิ้งไว้ในโถดูดความชื้นเป็นเวลา 2-3 วัน ชั่งน้ำหนักรวมที่ได้ หักน้ำหนักหลอดฝากลีวในตอนต้นจะได้น้ำหนักของสารสกัด

6.2.2 เปรียบเทียบผลผลิตที่ได้ระหว่างก่อนการขยายขนาดการหมัก

เปรียบเทียบผลผลิต (Yield) ที่ได้ระหว่างก่อนการขยายขนาดการหมักกับปริมาณอาหารที่ใช้เลี้ยงราจากป่าชายเลน (น้ำหนัก/ปริมาตร) และเปรียบเทียบผลของสารสกัดต่อการยับยั้งร่าก่อโรคพืชด้วยวิธี disc diffusion โดยหดยคสารสกัดที่ได้จากการศึกษาสภาวะเหมาะสมในอาหารเหลว ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ละลายด้วย 50% DMSO ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และสารสกัดจากการขยายขนาดการหมักในอาหารเหลวปริมาตร 20 ไมโครลิตร เพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง ดังการทดลองข้อที่ 3.3 เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่หดยคสารละลาย 50% DMSO

7. การหาค่า **minimum inhibition concentration (MIC)** ของสารสกัดที่ได้ต่อราก่อโรคพืช ด้วยวิธี **agar dilution** (ดัดแปลงจากวิธีการของ Liu et al., 2002)

นำราก่อโรคพืชทั้ง 4 ชนิด มาทดสอบกับสารสกัดที่ได้จากการขยายขนาดการหมัก บนอาหาร PDA/DW ที่ผสมสารสกัดให้มีความเข้มข้น 4096, 2048, 1024, 512, 256, 128, 64 และ 32 ไมโครลิตร (ชุดทดสอบ) ตามลำดับ ด้วยการทำ two fold dilution ในจานเพาะเชื้อแบบ 24 หลุม ปริมาตร หลุมละ 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ให้อาหารแข็งตัว จากนั้นตัดปลายชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยของราก่อโรคพืชเจริญด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มิลลิลิตร วางลงบนอาหาร PDA/DW ที่มีสารสกัดผสมอยู่ บ่มที่ อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง อ่านค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สามารถยับยั้งการ เจริญของราก่อโรคพืชได้ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยทำทั้งหมด 2 ครั้ง ชุดควบคุมเชิงบวก (Positive control) ใช้ยา fluconazole ที่ละลายด้วย DMSO ให้มีระดับความเข้มข้นต่างๆ ในช่วงมาตรฐาน ส่วนชุด ควบคุมเชิงลบ (Negative control) จะถ่ายเชื้อราก่อโรคพืชลงบนอาหารที่เติมเฉพาะตัวทำละลาย 1% DMSO และใช้หลุมที่ไม่ถ่ายเชื้อเป็นชุดควบคุมปลอดเชื้อ (Sterility control)

บทที่ 4

ผลการวิจัย

1. การทดสอบยืนยันความสามารถของราจากป่าชายเลนต่อราก่อโรคพืชบนอาหารแข็งด้วยวิธีการเลี้ยงเชื้อร่วมกัน (Dual culture technique)

จากการทดสอบยืนยันความสามารถของราทะเลและราเอนโดไฟท์จากพืชป่าชายเลน ที่เป็นตัวแทนในการศึกษาจำนวน 5 สายพันธุ์ ต่อการยับยั้งราโรคพืชจำนวน 4 ชนิด ได้แก่ *Alternaria brassicicola* DOAC 0436, *Colletotrichum gloeosporioides* DOAC 0782, *Fusarium oxysporum* DOAC 1808 และ *Pestalotiopsis* sp. DOAC 1098 ด้วยวิธีการเลี้ยงเชื้อร่วมกัน (Dual culture technique) บนอาหาร PDA/DW และ PDA/SW เป็นเวลา 3 วัน แสดงผลการทดสอบดังตารางที่ 9 จากตารางพบว่าราทะเลและราเอนโดไฟท์ทุกสายพันธุ์ที่ศึกษาให้ผลการยับยั้งแบบ antibiosis ได้แรงใกล้เคียงกันบนอาหารทดสอบทั้ง 2 ชนิด ยกเว้นราทะเลสายพันธุ์ BUCS 004 ที่ให้ผลการยับยั้งบนอาหาร PDA/SW ดีกว่าและพบว่าระดับ antibiosis สูงสุดต่อราโรคพืชทุกชนิด คือ 3+

ตารางที่ 9 ระดับ antibiosis ของราจากป่าชายเลนเมื่อเลี้ยงร่วมกับราก่อโรคพืชบนอาหาร PDA/DW และ PDA/SW เป็นระยะเวลา 3 วัน

| รา | ระดับการเกิด antibiosis | | | | | | | |
|-----------|-------------------------|--------|---------------------------|--------|---------------------|--------|---------------------------|--------|
| | <i>A. brassicicola</i> | | <i>C. gloeosporioides</i> | | <i>F. oxysporum</i> | | <i>Pestalotiopsis</i> sp. | |
| | PDA/DW | PDA/SW | PDA/DW | PDA/SW | PDA/DW | PDA/SW | PDA/DW | PDA/SW |
| BUCS 004 | 2+ | 3+ | 1+ | 1+ | - | 1+ | 1+ | 1+ |
| BUSK 55-1 | 3+ | 4+ | 4+ | 3+ | 3+ | 3+ | 3+ | 3+ |
| BUEN 121 | 2+ | 2+ | 2+ | 1+ | 2+ | 2+ | 1+ | 1+ |
| BUEN 830 | 2+ | 3+ | 2+ | 2+ | 2+ | 2+ | 1+ | 1+ |
| BUEN 834 | 3+ | 3+ | 2+ | 1+ | 3+ | 3+ | 2+ | 1+ |

หมายเหตุ - : ไม่เกิด antibiosis, 1+ ผลบวกอ่อน (ระยะ antibiosis \leq 0.50 เซนติเมตร), 2+ ผลบวกปานกลาง (ระยะ antibiosis $>$ 0.50-1.00 เซนติเมตร), 3+ ผลบวกแรง (ระยะ antibiosis $>$ 1.00-2.00 เซนติเมตร), 4+ ผลบวกแรงมาก (ระยะ antibiosis $>$ 2.00 เซนติเมตร)

2. การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคพืชของสารสกัดรากาป่าชายเลนที่เลี้ยงในสถานะตั้งต้น

ทำการเลี้ยงรากาป่าชายเลน 2 ชุด ใช้สภาวะตั้งต้นแบบตั้งทิ้งไว้ (Static) ชุดหนึ่ง และเขย่า (Shake) ด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที อีกชุดหนึ่ง เมื่อครบกำหนด กรองแยกเซลล์แล้วนำส่วนของอาหารเหลวไปสกัดสาร จากนั้นทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชด้วยวิธี disc diffusion บนอาหาร PDA/DW พบฤทธิ์ของสารสกัดต่อการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชแตกต่างกัน หลังจากเลี้ยงรากาป่าชายเลนในสภาวะตั้งต้นที่ทิ้งไว้ พบว่าสารสกัดจากรากาทะเลสายพันธุ์ BUSK 55-1 ราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830 และ BUEN 121 มีฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคพืชทุกชนิดได้ดี เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ที่เหลือ นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดจากรากาทะเลสายพันธุ์ BUCS 004 ไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง *Pestalotiopsis* sp.

เมื่อเลี้ยงรากาป่าชายเลนพร้อมกับการเขย่า ด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที พบว่าสารสกัดจากราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 121 และรากาทะเลสายพันธุ์ BUCS 004 ยับยั้ง *A. brassicicola* ได้ดีขึ้นอย่างมาก แสดงให้เห็นระยะยับยั้งมากกว่า 0.20 เซนติเมตร และสารสกัดจากรา BUEN 121 ยังคงยับยั้ง *C. gloeosporioides* ได้ดี พบระยะยับยั้งมากกว่า 0.20 เซนติเมตร พบว่าสารสกัดจากรา BUEN 121 มีฤทธิ์ยับยั้ง *F. oxysporum* สูงกว่าสารสกัดจากรากาป่าชายเลนสายพันธุ์อื่นๆ ที่ศึกษา ในกรณีของ *Pestalotiopsis* sp. สารสกัดจากราเอนโดไฟท์ BUEN 121 มีฤทธิ์ยับยั้งสูงสุด พบระยะยับยั้งมากกว่า 0.20 เซนติเมตร ในขณะที่สารสกัดจากราอื่นๆ ยับยั้งได้ไม่มากนัก สารสกัดจากรากาทะเล BUCS 004 ไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง *Pestalotiopsis* sp. เมื่อเลี้ยงในสภาวะตั้งต้นที่เขย่า 150 รอบ/นาที

ผลการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดที่ได้จากการเลี้ยงระบบนิเวศป่าชายเลนในสภาวะตั้งต้น ช่วยยืนยันความสามารถในการยับยั้งราโรคพืชของรากาป่าชายเลนที่เป็นตัวแทนการศึกษา ไม่ว่าจะเป็นการศึกษาความสามารถของเชื้อหรือการศึกษาผลของสารสกัด และข้อมูลที่ได้จากการศึกษาสภาวะตั้งต้นดังกล่าวจะถูกนำไปเป็นข้อมูลเบื้องต้น เพื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลที่ได้ภายหลังการศึกษาสภาวะเหมาะสม

3. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารยับยั้งราก่อโรคพืชของรากาป่าชายเลน

สภาวะการเลี้ยงรากาในอาหารเหลวที่ไม่เหมาะสม เป็นสาเหตุสำคัญประการหนึ่งที่ส่งผลต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ผู้วิจัยจึงทำการปรับสภาวะในการเลี้ยงรากาป่าชายเลนที่เป็นตัวแทนการศึกษา ทั้ง 5 สายพันธุ์ โดยใช้สภาวะตั้งต้นที่เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที เป็นหลักร่วมกับการปรับสภาวะอื่นๆ ครั้งละสภาวะ เพื่อคัดเลือกสภาวะที่เหมาะสมไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป สภาวะที่ศึกษาได้แก่ ความเค็ม ชนิดของอาหารเหลว ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหาร ความเร็วรอบการเขย่า อุณหภูมิ และระยะเวลาในการเลี้ยงรากาป่าชายเลนตามลำดับ พบว่าส่วนใหญ่สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้งราโรคพืชของรากาต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดหรือสายพันธุ์ของรากาป่าชายเลนและชนิดของราโรคพืช

3.1. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้งราก่อโรคพืชของราทะเลที่พบบนเศษไม้ในป่าชายเลนสายพันธุ์ BUCS 004

การศึกษาผลของความเค็ม (0, 10, 15, 20 และ 30 ppt) ของอาหารเหลว PDB มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น เท่ากับ 5 เขย่า 150 รอบ/นาที บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ในการเลี้ยงราทะเลสายพันธุ์ BUCS 004 ให้ผลิตสารยับยั้งราก่อโรคพืช (ตารางที่ 10) พบว่าสารสกัดจากอาหารเหลวความเค็ม 15 ppt เท่านั้นที่มีฤทธิ์ยับยั้ง *A. brassicicola* สูงสุด แตกต่างจากระดับความเค็มอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและสารสกัดจากอาหารเหลวทุก ๆ ความเค็มไม่สามารถยับยั้ง *C. gloeosporiodes*, *F. oxysporum* และ *Pestalotiopsis* sp. จึงคัดเลือกความเค็มของอาหารเหลวที่ 15 ppt ไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

ตารางที่ 10 ผลของความเค็มต่อความสามารถของราทะเลสายพันธุ์ BUCS 004 ในการผลิตสารยับยั้งการเจริญราก่อโรคพืช

| ความเค็ม (ppt) | ระยะยับยั้งราก่อโรคพืช (ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน, เซนติเมตร) | | | |
|----------------|---|--------------------------|---------------------|---------------------------|
| | <i>A. brassicicola</i> | <i>C. gloeosporiodes</i> | <i>F. oxysporum</i> | <i>Pestalotiopsis</i> sp. |
| 0 | 0.11 \pm 0.03 ¹ | - | - | - |
| 10 | 0.13 \pm 0.05 ¹ | - | - | - |
| 15 | 0.23\pm0.09² | - | - | - |
| 20 | 0.17 \pm 0.07 ¹ | - | - | - |
| 30 | 0.13 \pm 0.07 ¹ | - | - | - |

หมายเหตุ - : ไม่พบระยะยับยั้ง,

¹⁻² ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

การศึกษานิดของอาหารเหลว (0.5x PDB, PDB, YMB, LNB และ SDB) ที่เตรียมด้วยน้ำทะเลความเค็ม 15 ppt มีความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น เท่ากับ 5 เขย่าที่ 150 รอบ/นาที บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ในการเลี้ยงราทะเลสายพันธุ์ BUCS 004 ให้ผลิตสารยับยั้งราก่อโรคพืช (ตารางที่ 11) พบว่าสารสกัดจากอาหารเหลว YMB เท่านั้น ที่มีฤทธิ์ยับยั้ง *C. gloeosporiodes* และให้ผลดีต่อการยับยั้งราก่อโรคพืชส่วนใหญ่ จึงคัดเลือกอาหารเหลว YMD ไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

ตารางที่ 11 ผลของชนิดอาหารเหลวเลี้ยงราทะเลสาบพันธุ์ BUCS 004 ต่อความสามารถในการผลิตสารยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืช

| อาหารเหลว | ระยะยับยั้งราก่อโรคพืช (ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน, เซนติเมตร) | | | |
|-----------|---|--|---|---------------------------|
| | <i>A. brassicicola</i> | <i>C. gloeosporioides</i> | <i>F. oxysporum</i> | <i>Pestalotiopsis</i> sp. |
| 0.5xPDB | - | - | - | - |
| PDB | 0.02 \pm 0.08 ² | - | - | - |
| YMB | 0.21\pm0.06^{b,2} | 0.16\pm0.08^{ab} | 0.11\pm0.07^{a,1} | - |
| LNB | 0.11 \pm 0.07 ¹ | - | 0.13 \pm 0.08 ^{a,1} | - |
| SDB | 0.10 \pm 0.07 ¹ | - | - | - |

หมายเหตุ - : ไม่พบระยะยับยั้ง,

0.5x PDB: Half-strength of potato dextrose broth, PDB: Potato dextrose broth, YMB: Yeast malt glucose broth, LNB: Low nutrient broth, SDB: Sabouraud dextrose broth;

^{a-b} ที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$);

¹⁻² ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

การศึกษาผลของค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น (5, 6, 7, 8 และ 9) ของอาหารเหลว YMB เตรียมด้วยน้ำทะเลความเค็ม 15 ppt เขย่าด้วยความเค็ม 150 รอบ/นาที บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ในการเลี้ยงราทะเลสาบพันธุ์ BUCS 004 ให้ผลิตสารยับยั้งราก่อโรคพืช (ตารางที่ 12) พบว่าสารสกัดจากราทะเลเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว YMB ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น เท่ากับ 6 และ 7 มีผลเพิ่มฤทธิ์ของสารสกัดในการยับยั้งราก่อโรคพืชส่วนใหญ่ ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดที่ได้จากอาหารเหลว YMB ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 8 เท่านั้นที่มีฤทธิ์ยับยั้ง *A. brassicicola* และเมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น เท่ากับ 5 สารสกัดยับยั้งได้เฉพาะ *F. oxysporum* ขณะที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 9 ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งราก่อโรคพืช

เนื่องจากอาหารเหลว YMB ที่มีความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น เท่ากับ 6 และ 7 ส่งผลให้ราทะเลสาบพันธุ์ BUCS 004 ผลิตสารยับยั้งราก่อโรคพืชดีไม่แตกต่างกัน แต่อาหารเหลว YMB ความเค็ม 15 ppt มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นใกล้เคียง 6 ดังนั้นเพื่อความสะดวกจึงเลือกใช้ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น เท่ากับ 6 ในการศึกษาขั้นต่อไป

ตารางที่ 12 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเหลวเลี้ยงราทะเลสาบพันธุ์ BUCS 004 ต่อความสามารถในการผลิตสารยับยั้งการเจริญราก่อโรคพืช

| ค่าความเป็นกรด-ด่าง | ระยะยับยั้งราก่อโรคพืช (ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน, เซนติเมตร) | | | |
|---------------------|---|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------|
| | <i>A. brassicicola</i> | <i>C. gloeosporioides</i> | <i>F. oxysporum</i> | <i>Pestalotiopsis</i> sp. |
| 5 | - | - | 0.11 \pm 0.06 ¹² | - |
| 6 | 0.14 \pm 0.05 ^{a,1} | 0.12 \pm 0.04 ^{a,1} | 0.16 \pm 0.07 ^{a,2} | - |
| 7 | 0.20 \pm 0.09 ^{a,1} | 0.14 \pm 0.08 ^{a,1} | 0.16 \pm 0.05 ^{a,2} | - |
| 8 | 0.14 \pm 0.05 ¹ | - | - | - |
| 9 | - | - | - | - |

หมายเหตุ - : ไม่ยับยั้ง

^{a,b} ที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$);

¹⁻² ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

การศึกษาความเร็วของการเขย่า (0, 50, 100, 150 และ 200 รอบ/นาที) เลี้ยงราทะเลสาบพันธุ์ BUCS 004 ในอาหารเหลว YMB เตรียมด้วยน้ำทะเลความเค็ม 15 ppt ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6 บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ให้ผลิตสารยับยั้งราก่อโรคพืช (ตารางที่ 13) พบว่าเมื่อเลี้ยงราทะเลสาบโดยเขย่าที่ความเร็ว 100 และ 150 รอบ/นาที มีผลต่อการเพิ่มฤทธิ์ของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชส่วนใหญ่ และฤทธิ์ยับยั้งที่ได้โดยการเขย่าที่ความเร็ว 100 และ 150 รอบ/นาที ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จึงคัดเลือกความเร็วในการเขย่าที่ 100 รอบ/นาที ไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป เนื่องจากประหยัดพลังงานมากกว่าการเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที

การศึกษาผลของอุณหภูมิ (22, 25, 28 และ 30 องศาเซลเซียส) ที่ใช้บ่มราทะเลสาบพันธุ์ BUCS 004 ในอาหารเหลว YMB เตรียมด้วยน้ำทะเลความเค็ม 15 ppt มีความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6 เขย่าที่ 100 รอบ/นาที เป็นเวลา 4 วัน ให้ผลิตสารยับยั้งราก่อโรคพืช (ตารางที่ 14) พบว่าสารสกัดจากการบ่มราทะเลที่ 28 องศาเซลเซียส ยับยั้งราก่อโรคพืชได้ทุกชนิด และสารสกัดจากการบ่มราทะเลที่ 28 องศาเซลเซียส เท่านั้นที่มีฤทธิ์ยับยั้ง *Pestalotiopsis* sp. จึงคัดเลือกการบ่มที่ 28 องศาเซลเซียส ไปใช้ในการทดลองถัดไป

ตารางที่ 13 ผลของความเร็วในการเขย่าเลี้ยงราทะเลสาวยพันธุ์ BUCS 004 ในการผลิตสารยับยั้งการเจริญร่าก่อโรคพืช

| การเขย่า (รอบ/นาที) | ระยะยับยั้งร่าก่อโรคพืช (ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน, เซนติเมตร) | | | |
|------------------------|--|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| | <i>A. brassicicola</i> | <i>C. gloeosporioides</i> | <i>F. oxysporum</i> | <i>Pestalotiopsis</i> sp. |
| 0 | - | - | - | - |
| 50 | 0.16 \pm 0.07 ^{a,1} | - | - | 0.11 \pm 0.07 ^{a,1} |
| 100 | 0.21 \pm 0.06 ^{b,1} | 0.13 \pm 0.07 ^{a,1} | 0.11 \pm 0.06 ^{a,1} | 0.14 \pm 0.07 ^{a,1} |
| 150 | 0.17 \pm 0.07 ^{a,1} | 0.11 \pm 0.07 ^{a,1} | 0.13 \pm 0.07 ^{a,1} | 0.13 \pm 0.05 ^{a,1} |
| 200 | - | - | - | - |

หมายเหตุ - : ไม่พบระยะยับยั้ง;

^{a-b} ที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$);

¹⁻² ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

ตารางที่ 14 ผลของอุณหภูมิในการเลี้ยงราทะเลสาวยพันธุ์ BUCS 004 แต่ความสามารถในการผลิตสารยับยั้งการเจริญร่าก่อโรคพืช

| อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) | ระยะยับยั้งร่าก่อโรคพืช (ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน, เซนติเมตร) | | | |
|----------------------------|--|---------------------------------|--------------------------------|------------------------------|
| | <i>A. brassicicola</i> | <i>C. gloeosporioides</i> | <i>F. oxysporum</i> | <i>Pestalotiopsis</i> sp. |
| 22 | 0.18 \pm 0.04 ^{b,2} | 0.13 \pm 0.05 ^{a,12} | - | - |
| 25 | 0.11 \pm 0.03 ^{a,1} | 0.10 \pm 0.05 ^{a,1} | 0.12 \pm 0.04 ^{a,1} | - |
| 28 | 0.21 \pm 0.03 ^{b,2} | 0.16 \pm 0.05 ^{a,2} | 0.13 \pm 0.05 ^{a,1} | 0.13 \pm 0.05 ^a |
| 30 | 0.12 \pm 0.04 ^{a,1} | 0.11 \pm 0.03 ^{a,12} | - | - |

หมายเหตุ - : ไม่พบระยะยับยั้ง;

^{a-b} ที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$);

¹⁻² ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

การศึกษาผลของระยะเวลา (2, 4, 7, 10 และ 14 วัน) ที่ใช้บ่มราทะเลสาวยพันธุ์ BUCS 004 ในอาหารเหลว YMB เตรียมด้วยน้ำทะเลความเค็ม 15 ppt มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6 เขย่า 100 รอบ/นาที บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 15) พบว่าการบ่มราทะเลเป็นเวลา 7 วัน ส่งผลให้ราทะเลผลิต

สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคพืชเพิ่มขึ้น แม้ว่าระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้ง *A. brassicicola* และ *Pestalotiopsis* sp. ค่อนข้างกว้าง การบ่มราทะเลเป็นเวลา 4 ถึง 10 วัน สารสกัดให้ผลยับยั้ง *Pestalotiopsis* sp. ไม่แตกต่างกัน การบ่มราทะเลสายพันธุ์ BUCS 004 เป็นเวลา 10 วัน สารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้ง *C. gloeosporioides* ไม่แตกต่างจากการบ่มเป็นเวลา 7 วัน สารสกัดที่ได้จากการบ่มราทะเลเป็นเวลา 4 วัน มีฤทธิ์ยับยั้ง *F. oxysporum* ไม่แตกต่างจากการบ่มเป็นเวลา 7 วัน จะเห็นว่าแม้ระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้งราก่อโรคพืชแต่ละชนิด ของราทะเลสายพันธุ์ BUCS 004 ค่อนข้างหลากหลาย แต่การบ่มราทะเลเป็นเวลา 7 วัน เท่านั้นที่สารสกัดให้ผลยับยั้งราก่อโรคพืชทุกชนิดที่ทดสอบดีที่สุด จึงคัดเลือกระยะเวลาในการบ่มราทะเลที่ 7 วัน ไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

ตารางที่ 15 ผลของระยะเวลาเลี้ยงราทะเลสายพันธุ์ BUCS 004 ต่อความสามารถในการผลิตสารยับยั้งการเจริญราก่อโรคพืช

| ระยะเวลา (วัน) | ระยะยับยั้งราก่อโรคพืช (ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน, เซนติเมตร) | | | |
|-------------------|---|---|---|--|
| | <i>A. brassicicola</i> | <i>C. gloeosporioides</i> | <i>F. oxysporum</i> | <i>Pestalotiopsis</i> sp. |
| 2 | 0.14 \pm 0.05 ^{b,2} | - | 0.10 \pm 0.05 ^{ab,1} | 0.12 \pm 0.04 ^{a,1} |
| 4 | 0.16 \pm 0.07 ^{a,2} | 0.13 \pm 0.05 ^{a,1} | 0.13 \pm 0.07 ^{a,12} | 0.18 \pm 0.08 ^{a,2} |
| 7 | 0.18\pm0.05^{a,2} | 0.20\pm0.07^{a,2} | 0.17\pm0.07^{a,2} | 0.14\pm0.05^{a,12} |
| 10 | 0.12 \pm 0.06 ^{a,2} | 0.17 \pm 0.05 ^{a,12} | - | 0.13 \pm 0.05 ^{a,12} |
| 14 | - | - | - | - |

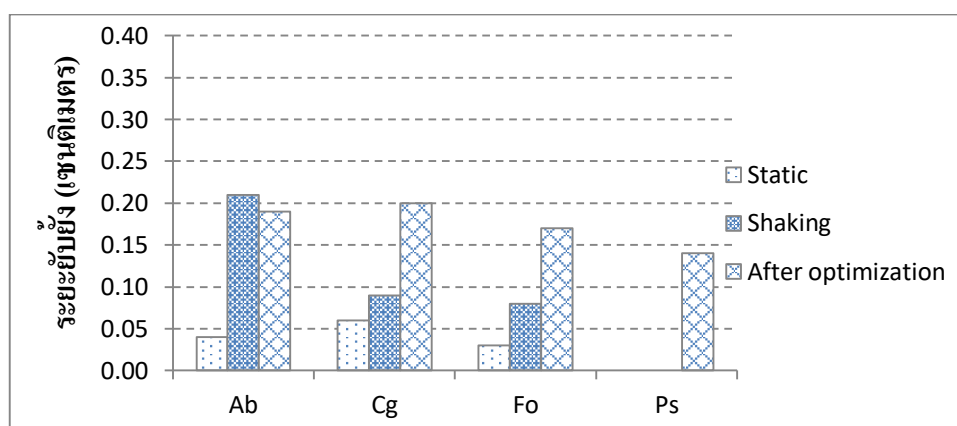
หมายเหตุ - : ไม่พบระยะยับยั้ง;

^{a-b} ที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$);

¹⁻² ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

สภาวะที่เหมาะสมของราจากป่าชายเลนสายพันธุ์ BUCS 004 ในการผลิตสารยับยั้งราก่อโรคพืชแต่ละชนิดที่แตกต่างกัน สรุปไว้ในตารางที่ 16 โดยสภาวะทางกายภาพที่ส่งผลให้ราทะเลสายพันธุ์ BUCS 004 ผลิตสารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคพืชทุกชนิดเพิ่มขึ้น ได้แก่ ความเค็ม 15 ppt อาหารเหลว YMB ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น เท่ากับ 6 เขย่าด้วยความเค็ม 100 รอบ/นาที บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

การเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดที่ได้ ระหว่างการเลี้ยงราทะเลในสภาวะตั้งต้นและภายหลังจากการศึกษาสภาวะเหมาะสมของราทะเลสายพันธุ์ BUCS 004 แสดงไว้ในภาพที่ 5 และตารางที่ 17 เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดจากราทะเลสายพันธุ์ BUCS 004 กับฤทธิ์ยับยั้งที่ได้จากการศึกษาในสภาวะตั้งต้นที่ตั้งทิ้งไว้ พบว่าสารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้ง *F. oxysporum*, *A. brassicicola* และ *C. gloeosporioides* เพิ่มขึ้นประมาณ 2-5 เท่า และเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาในสภาวะตั้งต้นที่เขย่า ด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที พบว่าสารสกัดที่ได้ภายหลังการศึกษาสภาวะเหมาะสมมีฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคพืชส่วนใหญ่เพิ่มขึ้นประมาณ 1 เท่า ยกเว้นฤทธิ์ยับยั้ง *A. brassicicola* ที่พบว่าไม่แตกต่างจากฤทธิ์ของสารสกัดในสภาวะตั้งต้นที่เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที นอกจากนี้ยังพบว่าหลังการปรับสภาวะการเลี้ยงอย่างเหมาะสม พบฤทธิ์ยับยั้ง *Pestalotiopsis* sp. ในขณะที่ในสภาวะตั้งต้นทั้งสองสภาวะ สารสกัดไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้ง



ภาพที่ 5 ฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดจากราทะเลสายพันธุ์ BUCS 004 จากการศึกษาสภาวะตั้งต้นโดยตั้งทิ้งไว้ (Static) เขย่า (Shaking) ด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที และภายหลังการศึกษาสภาวะเหมาะสมต่อการยับยั้งการเจริญราก่อโรคพืช *A.brassicicola* (Ab), *C. gloeosporioides* (Cg), *F. oxysporum* (Fo) และ *Pestalotiopsis* sp. (Ps)

ตารางที่ 16 สภาวะทางกายภาพของราทะเลสาบพันธุ์ BUCS 004 ที่เพิ่มฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคพืช เมื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดด้วยวิธี disc diffusion

| สภาวะทางกายภาพ | สภาวะทางกายภาพที่เพิ่มฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคพืช | | | | สภาวะทางกายภาพที่เพิ่มฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคพืชส่วนใหญ่ |
|-----------------------------|---|---------------------------|---------------------|---------------------------|---|
| | <i>A. brassicicola</i> | <i>C. gloeosporioides</i> | <i>F. oxysporum</i> | <i>Pestalotiopsis</i> sp. | |
| ความเค็ม (ppt) | 15 | - | - | - | 15 |
| ชนิดอาหารเหลว | PDB, YMB | YMB | YMB, LNB | - | YMB |
| ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น | 6, 7, 8 | 6, 7 | 5, 6, 7 | - | 6,7 |
| การเขย่า (รอบ/นาที) | 50, 100, 150 | 100, 150 | 100, 150 | 50, 100, 150 | 100,150 |
| อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) | 22, 28 | 22, 28, 30 | 25, 28 | 28 | 28 |
| ระยะเวลา (วัน) | 2, 4, 7, 10 | 7, 10 | 4, 7 | 4, 7, 10 | 7 |

หมายเหตุ PDB: Potato dextrose broth, YMB: Yeast malt glucose broth, LNB: Low nutrient broth; ระดับสภาวะที่ใช้ตัวหนาเป็นระดับสภาวะที่เลือกใช้ในการศึกษา
ขั้นต่อไป; - สภาวะทางกายภาพที่ศึกษาไม่มีผลต่อการผลิตสารยับยั้งราก่อโรคพืช

ตารางที่ 17 เปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคพืชของสารสกัดจากรากพืช BUCS 004 เมื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดด้วยวิธี disc diffusion

| สถานะทางกายภาพ | สถานะที่ศึกษา | | ฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคพืชที่เพิ่มขึ้น (เท่า) | | | | |
|----------------|-----------------------------|-----------------|--|---------------------------|---------------------|---------------------------|----|
| | สถานะตั้งต้น | สถานะที่เหมาะสม | <i>A. brassicicola</i> | <i>C. gloeosporioides</i> | <i>F. oxysporum</i> | <i>Pestalotiopsis</i> sp. | |
| สถานะที่ | ความเค็ม (ppt) | 15 | 15 | | | | |
| ตั้งทิ้งไว้ | อาหารเหลว | PDB | YMB | | | | |
| | ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น | 5 | 6 | | | | |
| | การเขย่า (รอบ/นาที) | 0 | 100 | 3.88 | 2.33 | 4.67 | UC |
| | อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) | 28 | 28 | | | | |
| | ระยะเวลา (วัน) | 4 | 7 | | | | |
| สถานะที่ | ความเค็ม (ppt) | 15 | 15 | | | | |
| เขย่าให้อากาศ | อาหารเหลว | PDB | YMB | | | | |
| | ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น | 5 | 6 | | | | |
| | การเขย่า (รอบ/นาที) | 150 | 100 | -0.05 | 1.22 | 1.13 | UC |
| | อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) | 28 | 28 | | | | |
| | ระยะเวลา (วัน) | 4 | 7 | | | | |

หมายเหตุ ฤทธิ์ยับยั้งที่เพิ่มขึ้น (เท่า) = (ฤทธิ์ของสารสกัดจากสถานะที่เหมาะสม/ฤทธิ์ของสารสกัดจากสถานะตั้งต้น) -1; PDB: Potato dextrose broth, YMB: Yeast malt glucose broth; UC (Uncalculated): ไม่สามารถคำนวณได้ เนื่องจากไม่พบการยับยั้งในสถานะตั้งต้น

3.2 สถานะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้งราก่อโรคพืชของราทะเลบนเศษไม้ในป่าชายเลน สายพันธุ์ BUSK 055-1

ศึกษาผลของความเค็ม (0, 10, 15, 20 และ 30 ppt) ของอาหารเหลว PDB มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เริ่มต้น เท่ากับ 5 เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ในการเลี้ยงราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 ต่อการผลิตสารยับยั้งราก่อโรคพืช (ตารางที่ 18) พบว่าสารสกัดจากอาหารเหลวความเค็ม 15 ppt มีผลต่อการผลิตสารยับยั้งราก่อโรคพืชทุกชนิด และพบว่าสารสกัดที่ได้จากอาหารเหลวที่เตรียมจากน้ำจืด 0 ppt มีฤทธิ์ยับยั้ง *A. brassicicola* และ *C. gloeosporioides* ได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เช่นเดียวกับกับฤทธิ์ของสารสกัดจากอาหารระดับความเค็ม 15 ppt และสารสกัดจากอาหารเหลวที่ระดับความเค็ม 15 ppt เท่านั้น ที่มีฤทธิ์ยับยั้ง *F. oxysporum* สารสกัดจากอาหารเหลวเลี้ยงราทะเลสายพันธุ์ BUUSK 055-1 ทุกระดับความเค็มให้ผลการยับยั้ง *Pestalotiopsis* sp. ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จึงคัดเลือกความเค็ม 15 ppt ซึ่งให้ผลสารสกัดดีที่สุดไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

ตารางที่ 18 ผลของความเค็มต่อความสามารถของราทะเลสายพันธุ์ BUUSK 055-1 ในการผลิตสารยับยั้งการเจริญราก่อโรคพืช

| ความเค็ม (ppt) | ระยะยับยั้งราก่อโรคพืช (ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน, เซนติเมตร) | | | |
|-------------------|---|---------------------------------|------------------------------|---------------------------------|
| | <i>A. brassicicola</i> | <i>C. gloeosporioides</i> | <i>F. oxysporum</i> | <i>Pestalotiopsis</i> sp. |
| 0 | 0.26±0.05 ^{b, 23} | 0.28±0.06 ^{b, 23} | - | 0.20±0.05 ^{a, 1} |
| 10 | 0.28±0.06 ^{b, 23} | 0.24±0.08 ^{b, 2} | - | 0.21±0.06 ^{b, 1} |
| 15 | 0.32±0.06^{c, 3} | 0.34±0.05^{c, 3} | 0.14±0.07^a | 0.23±0.05^{b, 1} |
| 20 | 0.24±0.08 ^{b, 2} | 0.17±0.07 ^{a, 1} | - | 0.20±0.07 ^{ab, 1} |
| 30 | 0.14±0.05 ^{a, 1} | 0.16±0.07 ^{a, 1} | - | 0.20±0.05 ^{a, 1} |

หมายเหตุ - : ไม่พบระยะยับยั้ง;

^{a-c} ที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$);

¹⁻³ ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

การศึกษานินคของอาหารเหลว (0.5xPDB, PDB, YMB, LNB และ SDB) ที่เตรียมด้วยน้ำทะเลความเค็ม 15 ppt มีความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น เท่ากับ 5 เขย่าที่ 150 รอบ/นาที บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ในการเลี้ยงราทะเลสายพันธุ์ BUCS 055-1 ต่อการผลิตสารยับยั้งราก่อโรคพืช (ตารางที่ 19) พบว่าอาหารเหลวที่มีสารอาหารสมบูรณ์ ได้แก่ PDB และ YMB มีผลต่อการเพิ่มฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคพืชส่วนใหญ่ แต่สารสกัดที่ได้จากอาหารเหลว PDB เท่านั้นที่พบฤทธิ์ในการยับยั้ง *Pestalotiopsis* sp. สูงสุด แตกต่างจากอาหารเหลว 0.5x PDB และ YMB อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สารสกัดจากอาหารเหลว SDB มีฤทธิ์ยับยั้ง ไม่แตกต่างกับสารสกัดจากอาหารเหลว PDB และ YMB ในกรณีของ *A. brassicicola* เท่านั้น

จะพบว่าสารสกัดจากอาหารเหลว PDB ให้ผลการยับยั้งราก่อโรคพืชทุกชนิดได้ดีที่สุด ตามด้วยสารสกัดจากอาหารเหลว YMB จึง คัดเลือกอาหารเหลว PDB ไปใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป

ตารางที่ 19 ผลของชนิดอาหารเหลวเลี้ยงราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 ต่อความสามารถในการผลิตสารยับยั้งการเจริญราก่อโรคพืช

| อาหารเหลว | ระยะยับยั้งราก่อโรคพืช (ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน, เซนติเมตร) | | | |
|------------|---|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| | <i>A. brassicicola</i> | <i>C. gloeosporioides</i> | <i>F. oxysporum</i> | <i>Pestalotiopsis</i> sp. |
| 0.5xPDB | 0.26±0.08 ^{b, 12} | 0.41±0.07 ^{c, 2} | - | 0.10±0.05 ^{a, 1} |
| PDB | 0.38±0.04^{c, 3} | 0.61±0.06^{d, 3} | 0.16±0.07^{a, 1} | 0.26±0.07^{b, 2} |
| YMB | 0.44±0.12 ^{b, 3} | 0.58±0.09 ^{c, 3} | 0.10±0.05 ^{a, 1} | 0.14±0.05 ^{a, 1} |
| LNB | 0.18±0.06 ^{a, 1} | 0.18±0.06 ^{a, 1} | - | - |
| SDB | 0.27±0.08 ^{a, 23} | 0.43±0.09 ^{b, 2} | - | - |

หมายเหตุ - : ไม่พบระยะยับยั้ง;

^{a-d} ที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$);

¹⁻³ ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น (5, 6, 7, 8 และ 9) ของอาหารเหลว PDB ที่เตรียมด้วยน้ำทะเลความเค็ม 15 ppt เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ในการเลี้ยงราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 ต่อการผลิตสารยับยั้งราก่อโรคพืช แสดงไว้ในตารางที่ 20 พบว่าสารสกัดที่ได้จากการเลี้ยงราทะเลในอาหารที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6 ให้ผลการยับยั้งราก่อโรคพืชทุกชนิดสูงสุด พบว่าเมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 5 สารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งเฉพาะ

C. gloeosporioides ได้ดีต่างจากราก่อโรคพืชอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จึงคัดเลือกค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเหลวเท่ากับ 6 ใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

ตารางที่ 20 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเหลวเลี้ยงราทะเลสาวยพันธุ์ BUSK 055-1 ต่อความสามารถในการผลิตสารยับยั้งการเจริญรากล่อโรคพืช

| ค่าความเป็นกรด-ด่าง | ระยะยับยั้งรากล่อโรคพืช (ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน, เซนติเมตร) | | | |
|---------------------|--|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| | <i>A. brassicicola</i> | <i>C. gloeosporioides</i> | <i>F. oxysporum</i> | <i>Pestalotiopsis</i> sp. |
| 5 | 0.36±0.05 ^{a,2} | 0.49±0.09 ^{b,3} | 0.34±0.05 ^{a,2} | 0.32±0.07 ^{a,2} |
| 6 | 0.40±0.07^{a,2} | 0.54±0.08^{b,3} | 0.48±0.06^{b,3} | 0.49±0.09^{b,3} |
| 7 | 0.21±0.06 ^{a,1} | 0.34±0.08 ^{b,2} | 0.24±0.05 ^{b,3} | 0.22±0.09 ^{a,1} |
| 8 | 0.26±0.05 ^{a,1} | 0.33±0.08 ^{b,2} | 0.33±0.07 ^{b,2} | 0.30±0.07 ^{ab,2} |
| 9 | 0.22±0.09 ^{ab,1} | 0.22±0.10 ^{ab,1} | 0.31±0.05 ^{b,2} | 0.20±0.08 ^{a,1} |

หมายเหตุ - : ไม่พบระยะยับยั้ง;

^{a,b} ที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$);

¹⁻³ ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

การศึกษาผลของความเร็วในการเขย่า (0, 50, 100, 150 และ 200 รอบ/นาที) เลี้ยงราทะเลสาวยพันธุ์ BUSK 055-1 ในอาหารเหลว PDB ที่เตรียมด้วยน้ำทะเลความเค็ม 15 ppt ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6 บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ต่อการผลิตสารยับยั้งรากล่อโรคพืช (ตารางที่ 21) พบว่าเมื่อเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที ส่งผลให้สารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งรากล่อโรคพืชสูงสุด นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้ความเร็วในการเขย่าที่ 200 รอบ/นาที ส่งผลให้สารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งเฉพาะ *F. oxysporum* และ *Pestalotiopsis* sp. ได้ไม่แตกต่างกับฤทธิ์ยับยั้งที่ได้จากการเขย่าที่ 150 รอบ/นาที เนื่องจากการเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที ให้ผลการทดสอบดีที่สุดต่อรากล่อโรคพืชทุกชนิดที่ศึกษา จึงคัดเลือกการเขย่าเลี้ยงราทะเลสาวยพันธุ์ BUSK 055-1 ที่ 150 รอบ/นาที ไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

ตารางที่ 21 ผลของความเร็วในการเขย่าเลี้ยงราทะเลสาบพันธุ์ BUSK 055-1 ในการผลิตสารยับยั้งการเจริญร่าก่อโรคพืช

| การเขย่า (รอบ/นาที) | ระยะยับยั้งร่าก่อโรคพืช (ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน, เซนติเมตร) | | | |
|------------------------|--|---|---|---|
| | <i>A. brassicicola</i> | <i>C. gloeosporioides</i> | <i>F. oxysporum</i> | <i>Pestalotiopsis</i> sp. |
| 0 | - | - | - | - |
| 50 | - | - | 0.11 \pm 0.07 ^{a,1} | 0.11 \pm 0.06 ^{a,1} |
| 100 | 0.26 \pm 0.07 ^{b,1} | 0.31 \pm 0.07 ^{b,1} | 0.29 \pm 0.09 ^{b,2} | 0.18 \pm 0.06 ^{a,2} |
| 150 | 0.40\pm0.05^{a,2} | 0.56\pm0.08^{b,2} | 0.59\pm0.06^{b,3} | 0.04\pm0.05^{a,3} |
| 200 | 0.31 \pm 0.07 ^{a,1} | 0.44 \pm 0.08 ^{b,1} | 0.47 \pm 0.09 ^{b,3} | 0.40 \pm 0.07 ^{b,3} |

หมายเหตุ - : ไม่พบระยะยับยั้ง;

^{a,b} ที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$);

¹⁻³ ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

ผลของอุณหภูมิ (22, 25, 28 และ 30 องศาเซลเซียส) ที่ใช้บ่มราทะเลสาบพันธุ์ BUSK 055-1 ในอาหารเหลว PDB เตรียมด้วยน้ำทะเลความเค็ม 15 ppt มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6 เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 7 วัน ต่อการผลิตสารยับยั้งร่าก่อโรคพืช แสดงในตารางที่ 22 พบว่า ยกเว้นการบ่มที่ 28 องศาเซลเซียส ที่พบระยะยับยั้ง *F. oxysporum* ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับระยะยับยั้งที่ได้จากการบ่มราทะเลที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส สารสกัดที่ได้จากการบ่มด้วยอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีฤทธิ์ยับยั้งร่าก่อโรคพืชทุกชนิดสูงสุด แตกต่างจากการบ่มราทะเลที่อุณหภูมิอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จึงคัดเลือกการบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

การศึกษาผลของระยะเวลา (7, 10, 14, 21 และ 28 วัน) ต่อการผลิตสารยับยั้งร่าก่อโรคพืชของราทะเลสาบพันธุ์ BUSK 055-1 ในอาหารเหลว PDB ที่เตรียมด้วยน้ำทะเลความเค็ม 15 ppt ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6 เขย่า 150 รอบ/นาที บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 23) พบว่าสารสกัดที่ได้จากการบ่มราทะเลเป็นเวลา 7 และ 10 วัน มีผลต่อการเพิ่มฤทธิ์ยับยั้งร่าก่อโรคพืชทุกชนิด และระยะยับยั้งที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ จากนั้นฤทธิ์ยับยั้งลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อบ่มราทะเลเป็นระยะเวลามากกว่า 10 วัน จึงคัดเลือกการบ่มที่ 7 วันไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป เนื่องจากประหยัดเวลาในการทดลองมากกว่าการบ่มที่ 10 วัน

ตารางที่ 22 ผลของอุณหภูมิในการเลี้ยงราทะเลสาบพันธุ์ BUSK 055-1 ในการผลิตสารยับยั้งการเจริญร่ากอโรคพืช

| อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) | ระยะยับยั้งร่ากอโรคพืช (ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน, เซนติเมตร) | | | |
|----------------------------|---|--|--|--|
| | <i>A. brassicicola</i> | <i>C. gloeosporiodes</i> | <i>F. oxysporum</i> | <i>Pestalotiopsis</i> sp. |
| 22 | 0.48 \pm 0.06 ^{c, 2} | 0.50 \pm 0.07 ^{c, 1} | 0.39 \pm 0.10 ^{b, 1} | 0.21 \pm 0.07 ^{a, 12} |
| 25 | 0.58\pm0.06^{b, 3} | 0.67\pm0.08^{c, 2} | 0.56\pm0.07^{b, 3} | 0.42\pm0.07^{a, 3} |
| 28 | 0.41 \pm 0.07 ^{b, 12} | 0.49 \pm 0.07 ^{b, 1} | 0.49 \pm 0.09 ^{b, 23} | 0.22 \pm 0.10 ^{a, 2} |
| 30 | 0.39 \pm 0.07 ^{b, 1} | 0.51 \pm 0.07 ^{c, 1} | 0.41 \pm 0.10 ^{b, 12} | 0.21 \pm 0.03 ^{a, 1} |

หมายเหตุ - : ไม่พบระยะยับยั้ง;

^{a-b} ที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$);

¹⁻³ ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

ตารางที่ 23 ผลของระยะเวลาในการเลี้ยงราทะเลสาบพันธุ์ BUSK 055-1 ในการผลิตสารยับยั้งการเจริญร่ากอโรคพืช

| ระยะเวลา (วัน) | ระยะยับยั้งร่ากอโรคพืช (ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน, เซนติเมตร) | | | |
|-------------------|---|--|--|--|
| | <i>A. brassicicola</i> | <i>C. gloeosporiodes</i> | <i>F. oxysporum</i> | <i>Pestalotiopsis</i> sp. |
| 7 | 0.54\pm0.08^{ab, 3} | 0.61\pm0.10^{b, 2} | 0.48\pm0.08^{a, 2} | 0.46\pm0.10^{a, 3} |
| 10 | 0.58\pm0.10^{ab, 3} | 0.62\pm0.09^{b, 2} | 0.52\pm0.08^{a, 2} | 0.49\pm0.07^{a, 3} |
| 14 | 0.34 \pm 0.08 ^{b, 2} | 0.23 \pm 0.07 ^{a, 1} | 0.37 \pm 0.07 ^{b, 1} | 0.37 \pm 0.08 ^{b, 2} |
| 21 | 0.23 \pm 0.05 ^{ab, 1} | 0.18 \pm 0.08 ^{a, 1} | 0.31 \pm 0.00 ^{b, 1} | 0.28 \pm 0.08 ^{b, 1} |
| 28 | 0.22 \pm 0.05 ^{a, 1} | 0.21 \pm 0.12 ^{a, 1} | 0.33 \pm 0.09 ^{b, 1} | 0.29 \pm 0.07 ^{ab, 12} |

หมายเหตุ - : ไม่พบระยะยับยั้ง;

^{a-b} ที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$);

¹⁻³ ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

จากการศึกษาสภาวะทางกายภาพที่เหมาะสมทั้ง 6 สภาวะ (ตารางที่ 24) ในการเลี้ยงราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 ให้ผลิตสารยับยั้งราก่อโรคพืช พบว่ามรสภาวะที่มีระดับความเค็ม 15 ppt อาหารเหลว PDB ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6 เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ส่งผลให้สารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคพืชทุกชนิดสูงสุด ตัวอย่างการยับยั้งของสารสกัดจากราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 ต่อรา *C. gloeosporioides* DOAC 0782 แสดงในภาพที่ 6

เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคพืชของสารสกัดที่ได้จากการศึกษาสภาวะตั้งต้น (Static หรือ Shaking) กับฤทธิ์ของสารสกัดที่ได้ภายหลังจากการศึกษาสภาวะเหมาะสม (ตารางที่ 25 และภาพที่ 7) พบว่าในสภาวะการเลี้ยงที่เหมาะสม ฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคพืชทุกชนิดเพิ่มขึ้นจากสภาวะตั้งต้นที่ตั้งทิ้งไว้ ประมาณ 2.5-4 เท่า และเมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะตั้งต้นที่เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที พบฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคพืชทุกชนิดเพิ่มขึ้นประมาณ 1-3 เท่า

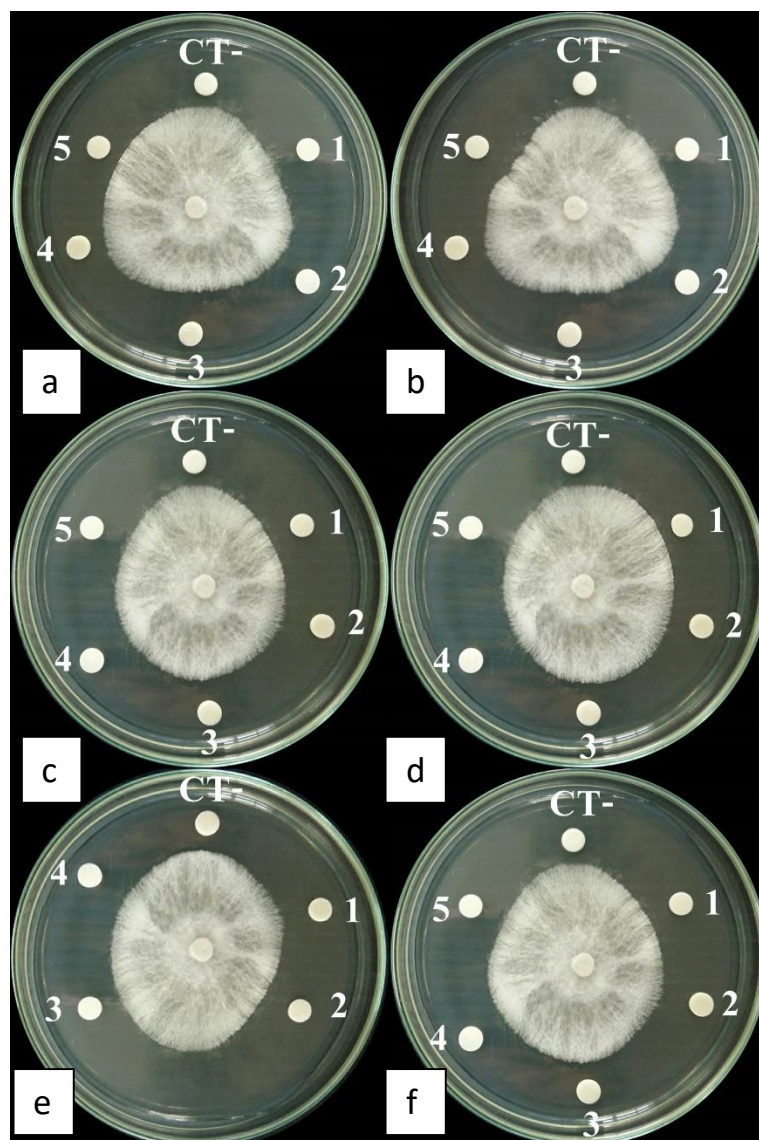
1.4 สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้งราก่อโรคพืชของราเอนโดไฟท์จากพืชชายเลนสายพันธุ์ BUEN 121

การศึกษาผลของความเค็ม (0, 10, 15, 20 และ 30 ppt) ของอาหารเหลว PDB มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น เท่ากับ 5 เขย่า 150 รอบ/นาที บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ต่อการผลิตสารยับยั้งราก่อโรคพืชของราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 121 (ตารางที่ 26) พบว่าสารสกัดจากอาหารเหลวความเค็ม 0 ppt ให้ผลการยับยั้งราก่อโรคพืชทุกชนิดสูงสุด และสารสกัดที่ได้จากอาหารเหลวความเค็ม 10 ppt ไม่แตกต่างจากที่ความเค็ม 0 ppt ในการยับยั้ง *Pestalotiopsis* sp. คัดเลือกความเค็มที่ 0 ppt ใช้ในการทดลองขั้นต่อไป เนื่องจากให้ผลของสารสกัดดีต่อการยับยั้งราก่อโรคพืชทุกชนิดที่ศึกษา

ตารางที่ 24 สภาวะทางกายภาพของราทะเลสาบพันธุ์ BUSK 055-1 ที่เพิ่มฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคพืช

| สภาวะทางกายภาพ | สภาวะทางกายภาพที่เพิ่มฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคพืช | | | | สภาวะทางกายภาพที่เพิ่มฤทธิ์ยับยั้ง |
|-----------------------------|---|---------------------------|---------------------|---------------------------|------------------------------------|
| | <i>A. brassicicola</i> | <i>C. gloeosporioides</i> | <i>F. oxysporum</i> | <i>Pestalotiopsis</i> sp. | ราก่อโรคพืชส่วนใหญ่ |
| ความเค็ม (ppt) | 0, 10, 15 | 0, 15 | 15 | 0, 10, 15, 20, 30 | 0, 15 |
| ชนิดอาหารเหลว | PDB, YMB, SDB | PDB, YMB | PDB, YMB | PDB | PDB |
| ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น | 5, 6 | 5, 6 | 6 | 6 | 6 |
| การเขย่า (รอบ/นาที) | 150 | 150 | 150, 200 | 150, 200 | 150 |
| อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) | 25 | 25 | 25, 28 | 25 | 25 |
| ระยะเวลา (วัน) | 7, 10 | 7, 10 | 7, 10 | 7, 10 | 7, 10 |

หมายเหตุ PDB: Potato dextrose broth, YMB: Yeast malt glucose broth, SDB: Sabouraud dextrose broth; ระดับสภาวะที่ใช้ตัวหนาเป็นระดับสภาวะที่เลือกใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

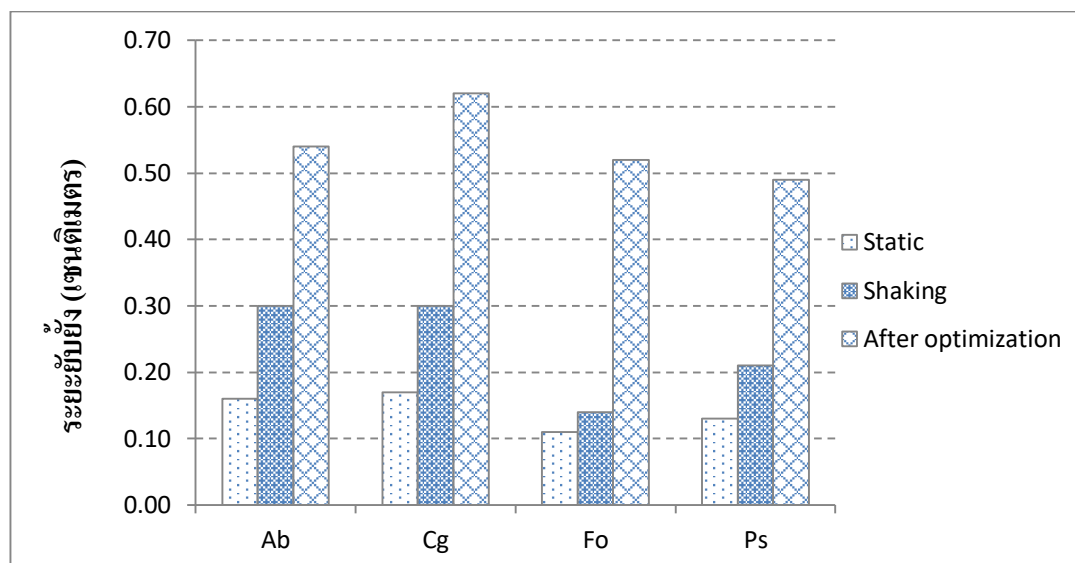


ภาพที่ 6 ฤทธิ์ยับยั้ง *C. gloeosporioides* ของสารสกัดที่ได้จากกระทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 ที่สภาวะต่างๆ; a: ผลของความเค็มในอาหารเหลว (1: 0 ppt, 2: 10 ppt, 3: 15 ppt, 4: 20 ppt, 5: 30 ppt), b: ผลของชนิดอาหารเหลว (1: 0.5xPDB, 2: PDB, 3: YMB, 4: LNB, 5: SDB), c: ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น (1: pH เท่ากับ 5, 2: pH เท่ากับ 6, 3: pH เท่ากับ 7, 4: pH เท่ากับ 8, 5: pH เท่ากับ 9), d: ผลของความเร็วยรอบในการเขย่า (1: 0 rpm, 2: 50 rpm, 3: 100 rpm, 4: 150 rpm, 5: 200 rpm), e: ผลของอุณหภูมิในการบ่มราทะเล (1: 22 °C, 2: 25 °C, 3: 28 °C, 4: 30 °C), f: ผลของระยะเวลา (1: 7 วัน, 2: 10 วัน, 3: 14 วัน, 4: 21 วัน, 5: 28 วัน); CT-: 50% DMSO

ตารางที่ 25 เปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคพืชของสารสกัดจากรากพืช BUSK 055-1 เมื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดด้วยวิธี disc diffusion

| สถานะทางกายภาพ | สถานะที่ศึกษา | | ฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคพืชที่เพิ่มขึ้น (เท่า) | | | | |
|----------------|-----------------------------|-----------------|--|---------------------------|---------------------|---------------------------|------|
| | สถานะตั้งต้น | สถานะที่เหมาะสม | <i>A. brassicicola</i> | <i>C. gloeosporioides</i> | <i>F. oxysporum</i> | <i>Pestalotiopsis</i> sp. | |
| สถานะที่ | ความเค็ม (ppt) | 15 | 15 | | | | |
| ตั้งทิ้งไว้ | อาหารเหลว | PDB | PDB | | | | |
| | ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น | 5 | 6 | | | | |
| | การเขย่า (รอบ/นาที) | 0 | 150 | 2.63 | 2.65 | 3.73 | 2.77 |
| | อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) | 28 | 25 | | | | |
| | ระยะเวลา (วัน) | 7 | 7 | | | | |
| สถานะที่ | ความเค็ม (ppt) | 15 | 15 | | | | |
| เขย่าให้อากาศ | อาหารเหลว | PDB | PDB | | | | |
| | ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น | 5 | 6 | | | | |
| | การเขย่า (รอบ/นาที) | 150 | 150 | 0.93 | 1.07 | 2.71 | 1.33 |
| | อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) | 28 | 25 | | | | |
| | ระยะเวลา (วัน) | 7 | 7 | | | | |

หมายเหตุ ฤทธิ์ยับยั้งที่เพิ่มขึ้น (เท่า) = (ฤทธิ์ของสารสกัดจากสถานะที่เหมาะสม/ฤทธิ์ของสารสกัดจากสถานะตั้งต้น) -1; PDB: Potato dextrose brot



ภาพที่ 7 ระยะเวลาที่ยังงของสารสกัดของราทะเลสาบพันธุ์ BUSK 055-1 จากการศึกษาสภาวะตั้งต้นโดยตั้งทิ้งไว้ (Static) และ เขย่า (Shaking) ด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที และภายหลังการศึกษาสภาวะที่เหมาะสม (After-optimization) ต่อการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืช *A. brassicicola* (Ab), *C. gloeosporioides* (Cg), *F. oxysporum* (Fo) และ *Pestalotiopsis* sp. (Ps)

ตารางที่ 26 ผลของความเค็มต่อความสามารถของราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 121 ในการผลิตสารยับยั้งการเจริญราก่อโรคพืช

| ความเค็ม (ppt) | ระยะเวลาที่ยังงราก่อโรคพืช (ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน, เซนติเมตร) | | | |
|-------------------|---|---------------------------|--------------------------|----------------------------|
| | <i>A. brassicicola</i> | <i>C. gloeosporioides</i> | <i>F. oxysporum</i> | <i>Pestalotiopsis</i> sp. |
| 0 | 0.37±0.07 ^{b,3} | 0.26±0.05 ^{a,2} | 0.20±0.05 ^{a,2} | 0.26±0.07 ^{a,2} |
| 10 | 0.23±0.07 ^{b,2} | 0.14±0.05 ^{a,1} | 0.13±0.07 ^{a,1} | 0.20±0.07 ^{ab,12} |
| 15 | 0.21±0.06 ^{b,12} | 0.14±0.07 ^{a,1} | 0.13±0.05 ^{a,1} | 0.19±0.06 ^{ab,1} |
| 20 | 0.17±0.07 ^{a,12} | - | - | 0.14±0.05 ^{a,1} |
| 30 | 0.14±0.07 ¹ | - | - | - |

หมายเหตุ - : ไม่พบระยะเวลาที่ยังง

^{a-b} ที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

¹⁻³ ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

การศึกษานินคของอาหารเหลว (0.5xPDB, PDB, YMB, LNB และ SDB) ที่เตรียมด้วยน้ำกลั่น (ความเค็ม 0 ppt) มีความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น เท่ากับ 5 เขย่าที่ 150 รอบ/นาทื บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ต่อการผลิตสารยับยั้งราก่อโรคพืชของราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 121 เมื่อทดสอบสารสกัดที่ได้จากการเลี้ยงราเอนโดไฟท์ในอาหารเหลว PDB และ YMB พบฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคพืชได้ทุกชนิด แต่ PDB ยับยั้งได้ดีกว่า แม้ว่าสารสกัดจากอาหารเหลว 0.5xPDB มีฤทธิ์ยับยั้ง *A. brassicicola* สูงสุด แต่ยับยั้ง *F. oxysporum* ไม่ได้ จึงทำการคัดเลือกอาหารเหลว PDB ไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

ตารางที่ 27 ผลของชนิดของอาหารเหลวเลี้ยงราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 121 ต่อความสามารถในการผลิตสารยับยั้งการเจริญราก่อโรคพืช

| อาหารเหลว | ระยะยับยั้งราก่อโรคพืช (ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน, เซนติเมตร) | | | |
|------------|---|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| | <i>A. brassicicola</i> | <i>C. gloeosporiodes</i> | <i>F. oxysporum</i> | <i>Pestalotiopsis</i> sp. |
| 0.5xPDB | 0.47±0.08 ^{b,4} | 0.17±0.07 ^{a,1} | - | 0.18±0.04 ^{a,12} |
| PDB | 0.38±0.06^{c,3} | 0.30±0.07^{b,2} | 0.19±0.06^{a,2} | 0.23±0.05^{a,2} |
| YMB | 0.26±0.07 ^{b,2} | 0.14±0.07 ^{a,1} | 0.12±0.04 ^{a,1} | 0.11±0.03 ^{a,1} |
| LNB | 0.17±0.07 ¹ | - | - | - |
| SDB | - | - | - | - |

หมายเหตุ 0.5xPDB: Half-strength of potato dextrose broth, PDB: potato dextrose broth, YMB: Yeast malt glucose broth, LNB: Low nutrient broth, SDB: Sabouraud dextrose broth; - : ไม่พบระยะยับยั้ง;

^{a-c} ที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$);

¹⁻³ ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

การศึกษาคผลของค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น (5, 6, 7, 8 และ 9) ของอาหารเหลว PDB เตรียมด้วยน้ำกลั่น (ความเค็ม 0 ppt) เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาทื บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ในการเลี้ยงราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 121 ให้ผลิตสารยับยั้งราก่อโรคพืช (ตารางที่ 28) พบว่าสารสกัดที่ได้จากอาหารเหลวเลี้ยงราเอนโดไฟท์ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ระหว่าง 5, 6 และ 7 ให้ผลการยับยั้ง *A. brassicicola*, *C. gloeosporiodes* และ *Pestalotiopsis* sp. ได้สูงสุด ยกเว้นการยับยั้ง *F. oxysporum* ที่

พบว่าสารสกัดให้ผลการยับยั้งสูงสุดจากอาหารเหลวที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 5 หรือ 6 เท่านั้น

ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 5 และ 6 มีผลต่อการเพิ่มฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคพืชทุกชนิดไม่ต่างกัน แต่เนื่องจากค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเหลว PDB ที่เตรียมด้วยน้ำกลั่นเท่ากับ 5 เพื่อความสะดวกจึงเลือกค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 5 ไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

ตารางที่ 28 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเหลวเลี้ยงราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 121 ต่อความสามารถในการผลิตสารยับยั้งการเจริญราก่อโรคพืช

| ค่าความเป็นกรด-ด่าง | ระยะยับยั้งราก่อโรคพืช (ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน, เซนติเมตร) | | | |
|---------------------|---|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | <i>A. brassicicola</i> | <i>C. gloeosporioides</i> | <i>F. oxysporum</i> | <i>Pestalotiopsis</i> sp. |
| 5 | 0.31±0.06 ^{b,3} | 0.022±0.04 ^{a,2} | 0.18±0.06 ^{a,34} | 0.21±0.03 ^{a,23} |
| 6 | 0.33±0.08 ^{b,3} | 0.26±0.05 ^{a,2} | 0.22±0.06 ^{a,4} | 0.23±0.07 ^{a,3} |
| 7 | 0.36±0.07 ^{c,3} | 0.23±0.08 ^{b,2} | 0.14±0.07 ^{a,23} | 0.22±0.04 ^{b,23} |
| 8 | 0.22±0.04 ^{c,2} | 0.16±0.05 ^{b,1} | 0.09±0.03 ^{a,12} | 0.17±0.05 ^{b,1} |
| 9 | 0.11±0.06 ^{a,1} | 0.11±0.03 ^{a,1} | 0.07±0.05 ^{a,1} | 0.18±0.04 ^{b,1} |

หมายเหตุ - : ไม่พบระยะยับยั้ง;

^{a-c} ที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$);

¹⁻⁴ ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

การศึกษาผลของความเร็วยรอบของการเขย่า (0, 50, 100, 150 และ 200 รอบ/นาที) ในการเลี้ยงราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 121 ในอาหารเหลว PDB ที่เตรียมด้วยน้ำกลั่น (ความเค็ม 0 ppt) มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5 บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ต่อการผลิตสารยับยั้งราก่อโรคพืชของราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 121 (ตารางที่ 29) พบว่าการเขย่าเลี้ยงราเอนโดไฟท์ด้วยความเร็ว 100 รอบ/นาที ส่งผลให้สารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคพืชทุกชนิดสูงสุด โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *F. oxysporum* และ *Pestalotiopsis* sp. การเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที ส่งผลให้สารสกัดที่ได้มีฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคพืชได้ทุกชนิดเช่นกัน แต่ไม่ดีเท่าที่ 100 รอบ/นาที จึงคัดเลือกการเขย่าด้วยความเร็ว 100 รอบ/นาที ไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

ตารางที่ 29 ผลของความเร็วในการเขย่าเลี้ยงราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 121 ในการผลิตสารยับยั้งการเจริญร่าก่อโรคพืช

| การเขย่า (รอบ/นาทึ) | ระยะยับยั้งร่าก่อโรคพืช (ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน, เซนติเมตร) | | | |
|------------------------|--|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| | <i>A. brassicicola</i> | <i>C. gloeosporiodes</i> | <i>F. oxysporum</i> | <i>Pestalotiopsis</i> sp. |
| 0 | - | - | 0.12±0.04 ¹ | - |
| 50 | 0.14±0.05 ^{a,1} | 0.10±0.05 ^{a,1} | 0.22±0.04 ^{b,2} | 0.10±0.05 ^{a,1} |
| 100 | 0.34±0.07^{b,2} | 0.27±0.07^{a,2} | 0.31±0.06^{ab,3} | 0.26±0.05^{a,3} |
| 150 | 0.29±0.07 ^{b,2} | 0.02±0.04 ^{a,2} | 0.19±0.06 ^{a,2} | 0.19±0.03 ^{a,2} |
| 200 | 0.12±0.04 ¹ | - | - | - |

หมายเหตุ - : ไม่พบระยะยับยั้ง;

^{a,b} ที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$);

¹⁻³ ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

การศึกษาผลของอุณหภูมิ (22, 25, 28 และ 30 องศาเซลเซียส) ที่ใช้บ่มราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 121 ในอาหารเหลว PDB เตรียมด้วยน้ำกลั่น (ความเค็ม 0 ppt) มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 5 เขย่าด้วยความเร็ว 100 รอบ/นาทึ เป็นเวลา 4 วัน ต่อการผลิตสารยับยั้งร่าก่อโรคพืช (ตารางที่ 30) พบว่าสารสกัดที่ได้จากการบ่มราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 121 ด้วยอุณหภูมิ 22, 25 และ 28 องศาเซลเซียส มีฤทธิ์ยับยั้ง *A. brassicicola* และ *Pestalotiopsis* sp. ได้ดีที่สุด แต่ที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส สารสกัดจากราเอนโดไฟท์มีฤทธิ์ยับยั้งร่าก่อโรคพืชทุกชนิดได้ดีที่สุดในขณะที่พบฤทธิ์ของสารสกัดต่ำสุดจากการบ่มราเอนโดไฟท์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จึงทำการคัดเลือกอุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียสไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

การศึกษาผลของระยะเวลา (2, 4, 7, 10 และ 14 วัน) ที่ใช้บ่มราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 121 ในอาหารเหลว PDB เตรียมด้วยน้ำกลั่น (ความเค็ม 0 ppt) มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 5 เขย่า 100 รอบ/นาทึ บ่มที่ 22 องศาเซลเซียส ต่อการผลิตสารยับยั้งร่าก่อโรคพืช (ตารางที่ 31) พบว่าการบ่มราเอนโดไฟท์เป็นเวลา 4 วัน ส่งผลให้ราทะเลผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งร่าก่อโรคพืชทุกชนิดสูงสุด แม้ว่าในบางครั้งระยะยับยั้งที่ได้ไม่แตกต่างจากการบ่มที่ระยะเวลาอื่นๆ การบ่มราเอนโดไฟท์เป็นเวลา 7 วัน สารสกัดที่ได้มีฤทธิ์ยับยั้งร่าก่อโรคพืชทุกชนิดเช่นกัน แต่ไม่ดีเท่าที่บ่ม 4 วัน จึงคัดเลือกระยะเวลาในการบ่มราทะเลที่ 4 วัน ไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

ตารางที่ 30 ผลของอุณหภูมิในการเลี้ยงราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 121 ต่อความสามารถในการผลิตสารยับยั้งการเจริญร่าก่อโรคพืช

| อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) | ระยะยับยั้งร่าก่อโรคพืช (ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน, เซนติเมตร) | | | |
|----------------------------|--|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| | <i>A. brassicicola</i> | <i>C. gloeosporiodes</i> | <i>F. oxysporum</i> | <i>Pestalotiopsis</i> sp. |
| 22 | 0.32 \pm 0.06 ^{c, 2} | 0.26 \pm 0.05 ^{ab, 2} | 0.29 \pm 0.07 ^{ac, 2} | 0.22 \pm 0.04 ^{a, 2} |
| 25 | 0.26 \pm 0.07 ^{b, 2} | 0.16 \pm 0.05 ^{a, 1} | 0.21 \pm 0.03 ^{ab, 1} | 0.19 \pm 0.06 ^{a, 12} |
| 28 | 0.30 \pm 0.05 ^{b, 2} | 0.24 \pm 0.05 ^{a, 2} | 0.22 \pm 0.4 ^{a, 1} | 0.20 \pm 0.05 ^{a, 12} |
| 30 | 0.16 \pm 0.07 ^{a, 1} | 0.13 \pm 0.07 ^{a, 1} | 0.20 \pm 0.05 ^{a, 1} | 0.14 \pm 0.07 ^{a, 1} |

หมายเหตุ - : ไม่พบระยะยับยั้ง;

^{a-c} ที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$);

¹⁻² ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

ตารางที่ 31 ผลของระยะเวลาในการเลี้ยงราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 121 ต่อความสามารถในการผลิตสารยับยั้งการเจริญร่าก่อโรคพืช

| ระยะเวลา (วัน) | ระยะยับยั้งร่าก่อโรคพืช (ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน, เซนติเมตร) | | | |
|-------------------|--|---------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|
| | <i>A. brassicicola</i> | <i>C. gloeosporiodes</i> | <i>F. oxysporum</i> | <i>Pestalotiopsis</i> sp. |
| 2 | - | - | 0.10 \pm 0.05 ¹ | - |
| 4 | 0.31 \pm 0.07 ^{b, 2} | 0.23 \pm 0.07 ^{a, 2} | 0.28 \pm 0.06 ^{ab, 2} | 0.22 \pm 0.04 ^{a, 2} |
| 7 | 0.27 \pm 0.07 ^{b, 2} | 0.21 \pm 0.06 ^{b, 2} | 0.24 \pm 0.05 ^{b, 2} | 0.12 \pm 0.04 ^{a, 1} |
| 10 | 0.10 \pm 0.08 ^{ab, 1} | 0.17 \pm 0.07 ^{b, 2} | 0.10 \pm 0.05 ^{ab, 1} | - |
| 14 | - | 0.10 \pm 0.07 ¹ | - | - |

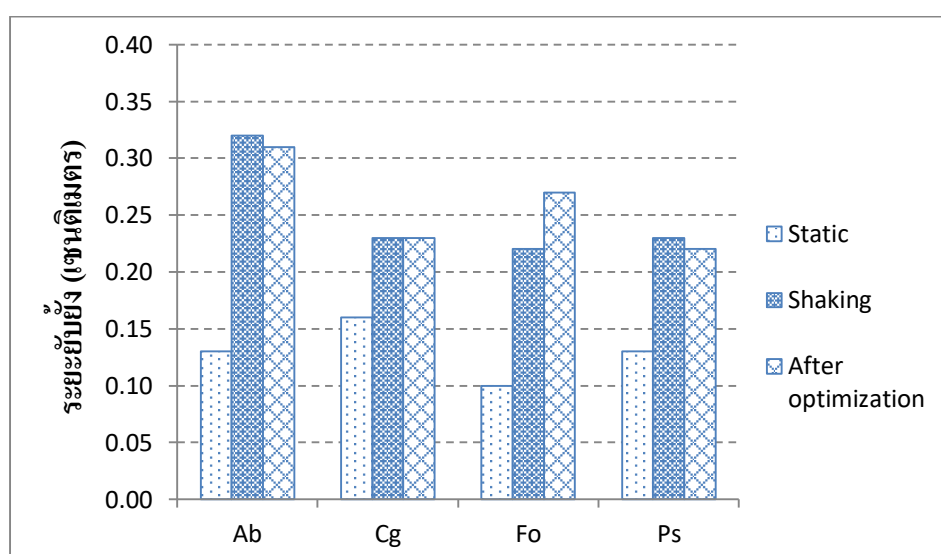
หมายเหตุ - : ไม่พบระยะยับยั้ง;

^{a-b} ที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$);

¹⁻³ ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

ตารางที่ 32 สรุปสภาวะทางกายภาพที่เหมาะสมในการเลี้ยงราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 121 ให้ผลิตสารยับยั้งราก่อโรคพืชแต่ละชนิด ซึ่งส่วนใหญ่ไม่แตกต่างกัน แต่สภาวะเหมาะสมในการเลี้ยงราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 121 ให้ผลิตสารยับยั้งราก่อโรคพืชทุกชนิดได้ดีที่สุด ได้แก่ ความเค็ม 0 ppt อาหารเหลว PDB ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 5 เขย่าด้วยความเร็ว 100 รอบ/นาที บ่มที่ 22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน

เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดที่ได้จากสภาวะตั้งต้น (Static หรือ Shaking) และภายหลังจากการเลี้ยงราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 121 ในสภาวะเหมาะสม (ภาพที่ 8 และตารางที่ 33) พบว่าฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดที่ได้ภายหลังจากการศึกษาสภาวะเหมาะสมส่วนใหญ่ ไม่แตกต่างกับฤทธิ์ของสารสกัดจากการศึกษาสภาวะตั้งต้น ที่เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที (Shaking) ยกเว้นฤทธิ์ยับยั้ง *F. oxysporum* ที่เพิ่มขึ้นประมาณ 0.3 เท่า และเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดที่ได้จากสภาวะตั้งต้นที่ตั้งทิ้งไว้ (Static) พบว่าสารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคพืชทุกชนิดเพิ่มขึ้นประมาณ 0.5-2 เท่า



ภาพที่ 8 ระบุฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดจากราทะเลสายพันธุ์ BUEN 121 จากการศึกษาสภาวะตั้งต้น โดยตั้งทิ้งไว้ (Static) และ เขย่า (Shaking) ด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที และภายหลังการศึกษาสภาวะที่เหมาะสม (After optimization) ต่อการผลิตสารยับยั้งราก่อโรคพืช *A. brassicicola* (Ab), *C. gloeosporioides* (Cg), *F. oxysporum* (Fo) และ *Pestalotiopsis* sp. (Ps)

ตารางที่ 32 สภาวะทางกายภาพที่เพิ่มฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคพืชของราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 121 เมื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดด้วยวิธี disc diffusion

| สภาวะทางกายภาพ | สภาวะทางกายภาพที่เพิ่มฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคพืช | | | | สภาวะทางกายภาพที่เพิ่มฤทธิ์ยับยั้ง |
|-----------------------------|---|---------------------------|---------------------|---------------------------|------------------------------------|
| | <i>A. brassicicola</i> | <i>C. gloeosporioides</i> | <i>F. oxysporum</i> | <i>Pestalotiopsis sp.</i> | ราก่อโรคพืชส่วนใหญ่ |
| ความเค็ม (ppt) | 0 | 0 | 0 | 0, 10 | 0 |
| ชนิดอาหารเหลว | 0.5xPDB | PDB | PDB | 0.5PDB, PDB | PDB |
| ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น | 5, 6, 7 | 5, 6, 7 | 5, 6 | 5, 6, 7 | 5, 6 |
| การเขย่า (รอบ/นาที) | 100, 150 | 100, 150 | 100 | 100 | 100 |
| อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) | 22, 25, 28 | 22, 28 | 22 | 22, 25, 28 | 22 |
| ระยะเวลา (วัน) | 4, 7 | 4, 7, 10 | 4, 7 | 4 | 4 |

หมายเหตุ PDB: Potato dextrose broth; 0.5x PDB: Half strength PDB; ระดับสภาวะที่ใช้ตัวหนาเป็นระดับสภาวะที่เลือกใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

ตารางที่ 33 เปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคพืชของสารสกัดราแอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 121 เมื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดด้วยวิธี disc diffusion

| สถานะทางกายภาพ | สถานะที่ศึกษา | | ฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคพืชที่เพิ่มขึ้น (เท่า) | | | | |
|-----------------------|-----------------------------|-----------------|--|---------------------------|---------------------|---------------------------|-------|
| | สถานะตั้งต้น | สถานะที่เหมาะสม | <i>A. brassicicola</i> | <i>C. gloeosporioides</i> | <i>F. oxysporum</i> | <i>Pestalotiopsis</i> sp. | |
| สถานะที่ตั้งทิ้งไว้ | ความเค็ม (ppt) | 0 | 0 | | | | |
| | อาหารเหลว | PDB | PDB | | | | |
| | ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น | 5 | 5 | | | | |
| | การเขย่า (รอบ/นาที) | 0 | 100 | 1.58 | 0.44 | 1.80 | 0.70 |
| | อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) | 28 | 22 | | | | |
| | ระยะเวลา (วัน) | 4 | 4 | | | | |
| สถานะที่เขย่าให้อากาศ | ความเค็ม (ppt) | 0 | 0 | | | | |
| | อาหารเหลว | PDB | PDB | | | | |
| | ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น | 5 | 5 | | | | |
| | การเขย่า (รอบ/นาที) | 150 | 100 | 0.03 | 0 | 0.27 | -0.04 |
| | อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) | 28 | 22 | | | | |
| | ระยะเวลา (วัน) | 4 | 4 | | | | |

หมายเหตุ ฤทธิ์ยับยั้งที่เพิ่มขึ้น (เท่า) = (ฤทธิ์ของสารสกัดจากสถานะที่เหมาะสม/ฤทธิ์ของสารสกัดจากสถานะตั้งต้น) -1; PDB: Potato dextrose broth

3.5 สถานะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้งราก่อโรคพืชของราเอนโดไฟท์จากพืชป่าชายเลน สายพันธุ์ BUEN 830

การศึกษาผลของความเค็ม (0, 10, 15, 20 และ 30 ppt) ของอาหารเหลว PDB มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น เท่ากับ 5 เขย่า 150 รอบ/นาที บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ต่อการผลิตสารยับยั้งราก่อโรคพืชของราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830 (ตารางที่ 34) พบว่าสารสกัดจากอาหารเหลวความเค็ม 10 ppt และ 15 ppt มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *A. brassicicola* และ *C. gloeosporioides* ได้ดี ไม่แตกต่างกัน ขณะที่สารสกัดจากอาหารเหลวระดับความเค็ม 0, 20 และ 30 ppt ไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง *F. oxysporum* และ *Pestalotiopsis* sp. เนื่องจากจำเป็นต้องคัดเลือกค่าความเค็มเดียวไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป จึงคัดเลือกความเค็มที่ 10 ppt เพราะหากไม่คำนึงถึงนัยสำคัญทางสถิติ สารสกัดเตรียมจากความเค็ม 10 ppt ให้ค่าเฉลี่ยระยะยับยั้งสูงกว่า 15 ppt

ตารางที่ 34 ผลของความเค็มต่อความสามารถของราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830 ในการผลิตสารยับยั้งการเจริญราก่อโรคพืช

| ความเค็ม (ppt) | ระยะยับยั้งราก่อโรคพืช (ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน, เซนติเมตร) | | | |
|-------------------|---|---------------------------------|---------------------|---------------------------|
| | <i>A. brassicicola</i> | <i>C. gloeosporioides</i> | <i>F. oxysporum</i> | <i>Pestalotiopsis</i> sp. |
| 0 | 0.10±0.07 ¹ | - | - | - |
| 10 | 0.23±0.05 ^{a,2} | 0.21±0.03 ^{a,1} | - | - |
| 15 | 0.18±0.06 ^{a,2} | 0.17±0.08 ^{a,1} | - | - |
| 20 | 0.11±0.06 ¹ | - | - | - |
| 30 | 0.10±0.07 ¹ | - | - | - |

หมายเหตุ - : ไม่พบระยะยับยั้ง;

^{a,b} ที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$);

¹⁻² ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

การศึกษานิคของอาหารเหลว (0.5xPDB, PDB, YMB, LNB และ SDB) ที่เตรียมด้วยน้ำทะเลความเค็ม 10 ppt มีความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 5 เขย่าที่ 150 รอบ/นาที บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ในการเลี้ยงราทะเลสายพันธุ์ BUEN 830 ให้ผลิตสารยับยั้งราก่อโรคพืช (ตารางที่ 35) พบว่าอาหารเหลว SDB ส่งผลให้สารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคพืชทุกชนิดสูงสุด และฤทธิ์ยับยั้งที่พบแตกต่างจากฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดที่ได้จากอาหารเหลวชนิดอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สารสกัด

จากอาหารเหลว SDB เท่านั้นที่มีฤทธิ์ยับยั้ง *Pestalotiopsis* sp. จึงคัดเลือกอาหารเหลว SDB ไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

ตารางที่ 35 ผลของชนิดของอาหารเหลวเลี้ยงราแอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830 ต่อความสามารถในการผลิตสารยับยั้งการเจริญร่าก่อโรคพืช

| อาหารเหลว | ระยะยับยั้งร่าก่อโรคพืช (ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน, เซนติเมตร) | | | |
|------------|--|---|---|---|
| | <i>A. brassicicola</i> | <i>C. gloeosporioides</i> | <i>F. oxysporum</i> | <i>Pestalotiopsis</i> sp. |
| 0.5xPDB | - | - | - | - |
| PDB | 0.10 \pm 0.05 ^{a,1} | 0.12 \pm 0.06 ^{a,1} | - | - |
| YMB | 0.16 \pm 0.05 ^{a,2} | 0.19 \pm 0.07 ^{a,2} | 0.17 \pm 0.08 ^{a,1} | - |
| LNB | - | - | - | - |
| SDB | 0.27\pm0.05^{b,3} | 0.28\pm0.04^{b,3} | 0.03\pm0.09^{b,2} | 0.11\pm0.06^a |

หมายเหตุ - : ไม่พบระยะยับยั้ง;

^{a-b} ที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$);

¹⁻³ ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

การศึกษาผลของค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น (5, 6, 7, 8 และ 9) ของอาหารเหลว SDB เตรียมด้วยน้ำทะเลความเค็ม 10 ppt เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ในการเลี้ยงราทะเลสายพันธุ์ BUEN 830 ต่อการผลิตสารยับยั้งร่าก่อโรคพืช (ตารางที่ 36) พบว่าสารสกัดที่ได้จากอาหารเหลวที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6 และ 7 มีฤทธิ์ยับยั้งร่าก่อโรคพืชได้ดี แต่สารสกัดจากอาหารเหลวที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6 เท่านั้นที่พบฤทธิ์ยับยั้ง *Pestalotiopsis* sp. ประกอบกับค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 6 ใกล้เคียงกับค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเหลว SDB จึงเลือกค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6 ไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป เพื่อให้การเตรียมอาหารเหลวสะดวกยิ่งขึ้น

ตารางที่ 36 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเหลวเลี้ยงราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830 ต่อความสามารถในการผลิตสารยับยั้งการเจริญร่าก่อโรคพืช

| ค่าความเป็นกรด-ด่าง | ระยะยับยั้งร่าก่อโรคพืช (ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน, เซนติเมตร) | | | |
|---------------------|--|---|---|---|
| | <i>A. brassicicola</i> | <i>C. gloeosporiodes</i> | <i>F. oxysporum</i> | <i>Pestalotiopsis</i> sp. |
| 5 | 0.32 \pm 0.08 ^{b,3} | 0.17 \pm 0.07 ^{a,2} | 0.29 \pm 0.10 ^{b,2} | - |
| 6 | 0.37\pm0.07^{c,3} | 0.26\pm0.05^{b,3} | 0.37\pm0.05^{c,2} | 0.11\pm0.07^a |
| 7 | 0.34 \pm 0.07 ^{c,3} | 0.31 \pm 0.09 ^{a,3} | 03.6 \pm 0.10 ^{a,2} | - |
| 8 | 0.21 \pm 0.06 ^{b,2} | 0.10 \pm 0.07 ^{a,12} | 0.12 \pm 0.08 ^{a,1} | - |
| 9 | 0.10 \pm 0.07 ^{a,1} | 0.09 \pm 0.06 ^{a,1} | 0.13 \pm 0.08 ^{a,1} | - |

หมายเหตุ - : ไม่พบระยะยับยั้ง;

^{a-c} ที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$);

¹⁻³ ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

การศึกษาความเร็วของการเขย่า (0, 50, 100, 150 และ 200 รอบ/นาที่) เลี้ยงราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830 ในอาหารเหลว SDB เตรียมด้วยน้ำทะเลความเค็ม 10 ppt ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6 เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที่ บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ต่อการผลิตสารยับยั้งร่าก่อโรคพืช (ตารางที่ 37) พบว่าเมื่อเลี้ยงราเอนโดไฟท์โดยเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที่ สารสกัดยับยั้งการเจริญของร่าก่อโรคพืชได้ทุกชนิด และพบว่าสารสกัดที่ได้โดยการเขย่าที่ความเร็ว 100 และ 200 รอบ/นาที่ มีฤทธิ์ยับยั้ง *C. gloeosporiodes* และ *F. oxysporum* ได้ดีไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่เนื่องจากสารสกัดที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที่ ยับยั้งร่าก่อโรคพืชได้ทุกชนิด จึงคัดเลือกความเร็ว 150 รอบ/นาที่ ไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

ตารางที่ 37 ผลของความเร็วในการเขย่าเลี้ยงราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830 ในการผลิตสารยับยั้งการเจริญร่าก่อโรคพืช

| การเขย่า (รอบ/นาที) | ระยะยับยั้งร่าก่อโรคพืช (ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน, เซนติเมตร) | | | |
|------------------------|--|--|--|---|
| | <i>A. brassicicola</i> | <i>C. gloeosporioides</i> | <i>F. oxysporum</i> | <i>Pestalotiopsis</i> sp. |
| 0 | - | - | - | - |
| 50 | - | 0.10 \pm 0.05 ¹ | - | - |
| 100 | 0.29 \pm 0.06 ^{a, 2} | 0.29 \pm 0.09 ^{a, 2} | 0.28 \pm 0.08 ^{a, 1} | - |
| 150 | 0.36\pm0.05^{b, 3} | 0.32\pm0.06^{b, 2} | 0.38\pm0.08^{b, 2} | 0.10\pm0.09^a |
| 200 | 0.20 \pm 0.07 ^{a, 1} | 0.26 \pm 0.05 ^{ab, 2} | 0.31 \pm 0.07 ^{b, 1} | - |

หมายเหตุ - : ไม่พบระยะยับยั้ง;

^{a-b} ที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$);

¹⁻² ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

การศึกษาผลของอุณหภูมิ (22, 25, 28 และ 30 องศาเซลเซียส) ที่ใช้บ่มราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830 ในอาหารเหลว SDB เตรียมด้วยน้ำทะเลความเค็ม 10 ppt มีความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6 เขย่าที่ 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 4 วัน ในการผลิตสารยับยั้งร่าก่อโรคพืช (ตารางที่ 38) พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้งร่าก่อโรคพืชแต่ละชนิดต่างกัน สารสกัดจากการบ่มราเอนโดไฟท์ที่ 25 และ 28 องศาเซลเซียส มีฤทธิ์ยับยั้ง *A. brassicicola*, *C. gloeosporioides* และ *F. oxysporum* ดี ขณะที่สารสกัดจากการบ่มที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส ยับยั้งเฉพาะ *C. gloeosporioides* ได้ดี ไม่แตกต่างจากสารสกัดจากการบ่มรา 25 และ 28 องศาเซลเซียส

จะเห็นได้ว่าสารสกัดที่ได้จากการบ่ม 25 และ 28 องศาเซลเซียส มีผลต่อฤทธิ์ยับยั้งร่าก่อโรคพืชส่วนใหญ่ได้สูงสุด และฤทธิ์ยับยั้งที่ได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่ได้คัดเลือกการบ่มที่ 28 องศาเซลเซียส ไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไปเนื่องจากช่วยประหยัดพลังงานจากการปรับอุณหภูมิของเครื่อง incubator shaker

ตารางที่ 38 ผลของอุณหภูมิในการเลี้ยงราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830 ต่อความสามารถในการผลิตสารยับยั้งการเจริญร่าก่อโรคพืช

| อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) | ระยะยับยั้งร่าก่อโรคพืช (ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน, เซนติเมตร) | | | |
|----------------------------|--|--|---|---------------------------|
| | <i>A. brassicicola</i> | <i>C. gloeosporioides</i> | <i>F. oxysporum</i> | <i>Pestalotiopsis</i> sp. |
| 22 | 0.22 \pm 0.08 ^{b, 1} | 0.29 \pm 0.10 ^{b, 12} | 0.11 \pm 0.06 ^{a, 1} | - |
| 25 | 0.36\pm0.08 ^{b, 2} | 0.32\pm0.08 ^{b, 2} | 0.33\pm0.05 ^{b, 2} | - |
| 28 | 0.33\pm0.05 ^{a, 2} | 0.29\pm0.07 ^{a, 12} | 0.31\pm0.07 ^{a, 2} | - |
| 30 | 0.18 \pm 0.04 ^{b, 1} | 0.20 \pm 0.08 ^{b, 1} | 0.10 \pm 0.05 ^{a, 1} | - |

หมายเหตุ - : ไม่พบระยะยับยั้ง;

^{a,b} ที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$);

¹⁻² ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

การศึกษาผลของระยะเวลา (2, 4, 7, 10 และ 14 วัน) ที่ใช้บ่มราเอนโดไฟท์ BUEN 830 ในอาหารเหลว SDB เตรียมด้วยน้ำทะเลความเค็ม 10 ppt มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6 เขย่า 150 รอบ/นาที บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส ให้ผลสารยับยั้งร่าก่อโรคพืช (ตารางที่ 39) พบว่าการบ่มราเอนโดไฟท์เป็นเวลา 4 วัน และ 7 วัน มีสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งร่าก่อโรคพืชทุกชนิด การยับยั้ง *Pestalotiopsis* sp. พบฤทธิ์ยับยั้งสูงสุดจากการทดสอบสารสกัดของราเอนโดไฟท์ที่เลี้ยงเป็นเวลา 7 วันเท่านั้น จึงคัดเลือกระยะเวลาในการบ่มราเอนโดไฟท์ในการบ่มที่ 7 วัน ไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

ภาพที่ 9 และ ตารางที่ 40 แสดงสภาวะทางกายภาพเหมาะสมในการเลี้ยงราเอนโดไฟท์ สายพันธุ์ BUEN 830 ที่ส่งผลให้สารยับยั้งที่ได้มีฤทธิ์ยับยั้งร่าก่อโรคพืชเพิ่มขึ้น สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารยับยั้งร่าก่อโรคพืชแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันค่อนข้างน้อย และพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารยับยั้งที่ให้ผลของสารสกัดต่อร่าก่อโรคพืชส่วนใหญ่ คือ ความเค็ม 10 ppt อาหารเหลว SDB ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6 เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดที่ได้จากสภาวะตั้งต้น (Static หรือ Shaking) และภายหลังจากการเลี้ยงราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830 ในสภาวะเหมาะสม (ภาพที่ 9 และตารางที่ 41) พบว่าฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดที่ได้ภายหลังจากการศึกษาสภาวะเหมาะสมส่วนใหญ่ เพิ่มขึ้นประมาณ 1-3 เท่า และ 1.5-4.5 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดที่ได้จากสภาวะตั้งต้นที่มีการเขย่าและตั้งทิ้งไว้ ตามลำดับ

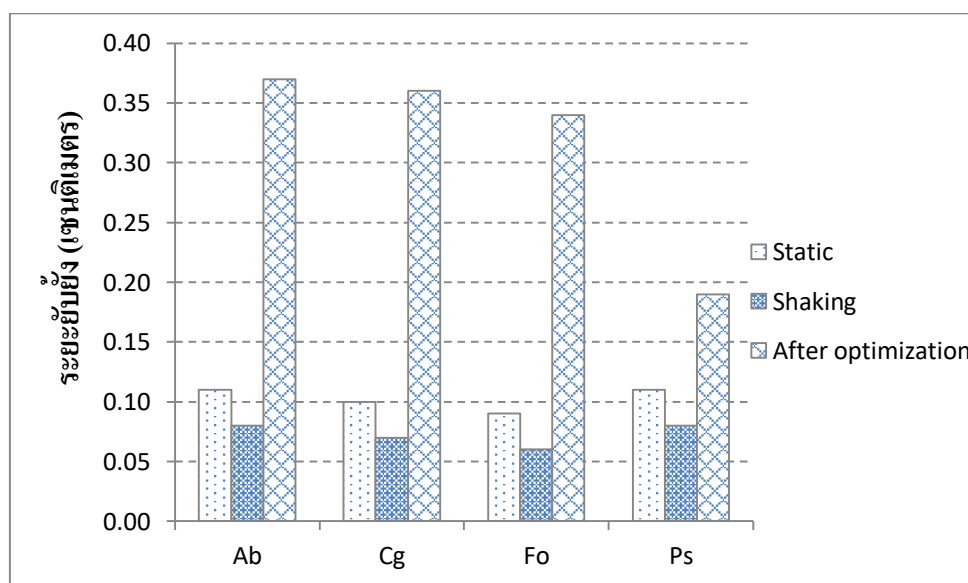
ตารางที่ 39 ผลของระยะเวลาในการเลี้ยงราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830 ต่อความสามารถในการผลิตสารยับยั้งการเจริญร่าก่อโรคพืช

| ระยะเวลา (วัน) | ระยะยับยั้งร่าก่อโรคพืช (ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน, เซนติเมตร) | | | |
|-------------------|--|--|--|--|
| | <i>A. brassicicola</i> | <i>C. gloeosporiodes</i> | <i>F. oxysporum</i> | <i>Pestalotiopsis</i> sp. |
| 2 | 0.16 \pm 0.08 ^{a, 1} | 0.10 \pm 0.07 ^{a, 1} | - | - |
| 4 | 0.33 \pm 0.07 ^{b, 2} | 0.30 \pm 0.07 ^{b, 2} | 0.29 \pm 0.06 ^{b, 1} | 0.12 \pm 0.04 ^{a, 1} |
| 7 | 0.37\pm0.09^{b, 2} | 0.36\pm0.05^{b, 2} | 0.34\pm0.07^{b, 1} | 0.19\pm0.03^{a, 2} |
| 10 | 0.17 \pm 0.07 ^{a, 1} | 0.13 \pm 0.05 ^{a, 1} | - | - |
| 14 | - | - | - | - |

หมายเหตุ - : ไม่พบระยะยับยั้ง;

^{a-b} ที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$);

¹⁻² ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)



ภาพที่ 9 ระยะยับยั้งของสารสกัดจากราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830 จากการศึกษาสภาวะตั้งต้นโดยตั้งทิ้งไว้ (Static) และ เขย่า (Shaking) ด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที และภายหลังการศึกษาสภาวะที่เหมาะสม (After optimization) ในการยับยั้งร่าก่อโรคพืช *A. brassicicola* (Ab), *C. gloeosporiodes* (Cg), *F. oxysporum* (Fo) และ *Pestalotiopsis* sp. (Ps)

ตารางที่ 40 สภาวะทางกายภาพที่เพิ่มฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคพืชของราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830 เมื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดด้วยวิธี disc diffusion

| สภาวะทางกายภาพ | สภาวะทางกายภาพที่เพิ่มฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคพืช | | | | สภาวะทางกายภาพที่เพิ่มฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคพืชส่วนใหญ่ |
|-----------------------------|---|---------------------------|---------------------|---------------------------|---|
| | <i>A. brassicicola</i> | <i>C. gloeosporioides</i> | <i>F. oxysporum</i> | <i>Pestalotiopsis</i> sp. | |
| ความเค็ม (ppt) | 10, 15 | 10, 15 | - | - | 10, 15 |
| ชนิดอาหารเหลว | SDB | SDB | SDB | SDB | SDB |
| ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น | 5, 6, 7 | 6, 7 | 5, 6, 7 | 6 | 6,7 |
| การเขย่า (รอบ/นาที) | 150 | 100, 150, 200 | 150 | 150 | 150 |
| อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) | 25, 28 | 22, 25, 28 | 25, 28 | - | 25, 28 |
| ระยะเวลา (วัน) | 4, 7 | 4, 7 | 4, 7 | 7 | 7 |

หมายเหตุ SDB: Sabouraud dextrose broth; ระดับสภาวะที่ใช้ตัวหนาเป็นระดับสภาวะที่เลือกใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป; - สภาวะทางกายภาพที่ศึกษาไม่มีผลต่อการผลิตสารยับยั้งราก่อโรคพืช

ตารางที่ 41 เปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคพืชของสารสกัดราเอนโคไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830 เมื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดด้วยวิธี disc diffusion

| สถานะทางกายภาพ | สถานะที่ศึกษา | | ฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคพืชที่เพิ่มขึ้น (เท่า) | | | | |
|---------------------------|-----------------------------|-----------------|--|---------------------------|---------------------|---------------------------|------|
| | สถานะตั้งต้น | สถานะที่เหมาะสม | <i>A. brassicicola</i> | <i>C. gloeosporioides</i> | <i>F. oxysporum</i> | <i>Pestalotiopsis</i> sp. | |
| สถานะที่ ตั้งทิ้งไว้ | ความเค็ม (ppt) | 0 | 10 | | | | |
| | อาหารเหลว | PDB | SDB | | | | |
| | ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น | 5 | 6 | | | | |
| | การเขย่า (รอบ/นาที) | 0 | 150 | 2.36 | 2.60 | 2.78 | 0.73 |
| | อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) | 28 | 28 | | | | |
| | ระยะเวลา (วัน) | 4 | 7 | | | | |
| สถานะที่ เขย่าให้อากาศ | ความเค็ม (ppt) | 0 | 10 | | | | |
| | อาหารเหลว | PDB | SDB | | | | |
| | ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น | 5 | 6 | | | | |
| | การเขย่า (รอบ/นาที) | 150 | 150 | 3.63 | 4.14 | 4.67 | 1.38 |
| | อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) | 28 | 28 | | | | |
| | ระยะเวลา (วัน) | 4 | 7 | | | | |

หมายเหตุ ฤทธิ์ยับยั้งที่เพิ่มขึ้น (เท่า) = (ฤทธิ์ของสารสกัดจากสถานะที่เหมาะสม/ฤทธิ์ของสารสกัดจากสถานะตั้งต้น) -1; PDB: Potato dextrose broth;

SDB: Sabouraud dextrose broth

3.6 สภาพที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้งราก่อโรคพืชของราเอนโดไฟท์จากพืชป่าชายเลนสายพันธุ์ BUEN 834

การศึกษาผลของความเค็ม (0, 10, 15, 20 และ 30 ppt) ของอาหารเหลว PDB มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น เท่ากับ 5 เขย่า 150 รอบ/นาที บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ต่อการผลิตสารยับยั้งราก่อโรคพืชของราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 834 ต่อการผลิตสารยับยั้งราก่อโรคพืช (ตารางที่ 42) พบว่าสารสกัดจากอาหารเหลว PDB ความเค็ม 10 ppt ที่มีฤทธิ์ยับยั้ง *A. brassicicola* และ *C. gloeosporioides* ดีที่สุด แตกต่างจากฤทธิ์ยับยั้งที่ระดับความเค็มอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ยกเว้นการยับยั้ง *F. oxysporum* การยับยั้ง *F. oxysporum* ในช่วงความเค็ม 0-20 ppt ไม่ต่างกันและที่ความเค็ม 30 ppt ไม่พบการยับยั้งของสารสกัด สารสกัดจากอาหารเหลวทุกระดับความเค็ม ไม่มีผลในการยับยั้ง *Pestalotiopsis* sp. จึงคัดเลือกความเค็มที่ 10 ppt ใช้ในการทดลองขั้นต่อไป เนื่องจากให้ผลของสารสกัดดีต่อการยับยั้งราก่อโรคพืชส่วนใหญ่ได้ดี

ตารางที่ 42 ผลของความเค็มต่อความสามารถของราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 834 ในการผลิตสารยับยั้งการเจริญราก่อโรคพืช

| ความเค็ม (ppt) | ระยะยับยั้งราก่อโรคพืช (ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน, เซนติเมตร) | | | |
|-------------------|---|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------|
| | <i>A. brassicicola</i> | <i>C. gloeosporioides</i> | <i>F. oxysporum</i> | <i>Pestalotiopsis</i> sp. |
| 0 | 0.21±0.06 ^{b,2} | - | 0.14±0.06 ^{a,1} | - |
| 10 | 0.31±0.07^{c,3} | 0.24±0.05^{b,2} | 0.16±0.05^{a,1} | - |
| 15 | 0.10±0.06 ^{b,2} | 0.10±0.07 ^{a,1} | 0.13±0.07 ^{a,1} | - |
| 20 | 0.14±0.05 ^{a,1} | 0.11±0.06 ^{a,1} | 0.10±0.05 ^{a,1} | - |
| 30 | 0.12±0.06 ^{a,1} | 0.10±0.05 ^{a,1} | - | - |

หมายเหตุ - : ไม่พบระยะยับยั้ง;

^{a-c} ที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$);

¹⁻³ ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

การศึกษานิคของอาหารเหลว (0.5xPDB, PDB, YMB, LNB และ SDB) ที่เตรียมด้วยน้ำทะเลความเค็ม 10 ppt มีความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 5 เขย่าที่ 150 รอบ/นาที บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ในการเลี้ยงราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 834 ต่อการผลิตสารยับยั้งราก่อโรคพืช (ตารางที่ 43) พบว่าสารสกัดจากการเลี้ยงราเอนโดไฟท์ในอาหารเหลว YMB เท่านั้นที่ยับยั้งรา

ก่อโรคพืชที่ศึกษาได้ทุกชนิด YMB ให้ผลยับยั้งดีต่อ *A. brassicicola* และ *Pestalotiopsis* sp. สูงสุด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สารสกัดจากอาหารเหลว 0.5xPDB และ PDB ให้ผลการยับยั้งดีต่อรากก่อโรคพืช รองลงมา จึง คัดเลือกอาหารเหลว YMB ไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

ตารางที่ 43 ผลของชนิดของอาหารเหลวเลี้ยงราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 834 ต่อความสามารถในการผลิตสารยับยั้งการเจริญรากก่อโรคพืช

| อาหารเหลว | ระยะยับยั้งรากก่อโรคพืช (ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน, เซนติเมตร) | | | |
|------------|--|---|---|---|
| | <i>A. brassicicola</i> | <i>C. gloeosporioides</i> | <i>F. oxysporum</i> | <i>Pestalotiopsis</i> sp. |
| 0.5xPDB | 0.38 \pm 0.04 ^{c,2} | 0.28 \pm 0.06 ^{b,2} | 0.22 \pm 0.04 ^{a,2} | - |
| PDB | 0.33 \pm 0.08 ^{b,2} | 0.28 \pm 0.10 ^{b,2} | 0.13 \pm 0.05 ^{a,1} | - |
| YMB | 0.44\pm0.10^{c,3} | 0.16\pm0.09^{b,2} | 0.20\pm0.09^{a,1} | 0.11\pm0.07^a |
| LNB | 0.20 \pm 0.07 ^{a,1} | 0.16 \pm 0.12 ^{a,1} | - | - |
| SDB | 0.20 \pm 0.05 ¹ | - | - | - |

หมายเหตุ 0.5xPDB: Half-strength of potato dextrose broth, PDB: potato dextrose broth, YMB: Yeast malt glucose broth, LNB: Low nutrient broth, SDB: Sabouraud dextrose broth;

- : ไม่พบระยะยับยั้ง;

^{a-c} ที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$);

¹⁻³ ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

การศึกษาผลของค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น (5, 6, 7, 8 และ 9) ของอาหารเหลว YMB ที่เตรียมด้วยน้ำทะเลความเค็ม 10 ppt เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ในการเลี้ยงราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 834 ต่อการผลิตสารยับยั้งรากก่อโรคพืช (ตารางที่ 44) พบว่า สารสกัดที่ได้จากอาหารเหลว YMB ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6 และ 7 มีฤทธิ์ยับยั้งรากก่อโรคพืชได้ทุกชนิด สูงสุด สารสกัดจากอาหารเหลว YMB ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6 เท่านั้นที่มีฤทธิ์ยับยั้ง *Pestalotiopsis* sp. จึงคัดเลือกค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเหลวเท่ากับ 6 ใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

ตารางที่ 44 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเหลวเลี้ยงราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 834 ต่อความสามารถในการผลิตสารยับยั้งการเจริญร่าก่อโรคพืช

| ค่าความเป็นกรด-ด่าง | ระยะยับยั้งร่าก่อโรคพืช (ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน, เซนติเมตร) | | | |
|---------------------|--|--|--|---|
| | <i>A. brassicicola</i> | <i>C. gloeosporioides</i> | <i>F. oxysporum</i> | <i>Pestalotiopsis</i> sp. |
| 5 | 0.31 \pm 0.06 ^{c,3} | 0.24 \pm 0.05 ^{c,2} | 0.18 \pm 0.06 ^{a,1} | - |
| 6 | 0.33\pm0.07^{c,3} | 0.26\pm0.05^{b,23} | 0.22\pm0.04^{b,12} | 0.10\pm0.07^a |
| 7 | 0.36 \pm 0.07 ^{b,3} | 0.30 \pm 0.07 ^{ab,3} | 0.24 \pm 0.05 ^{a,2} | - |
| 8 | 0.22 \pm 0.04 ^{b,2} | 0.16 \pm 0.05 ^{a,1} | - | - |
| 9 | 0.16 \pm 0.05 ^{b,1} | 0.01 \pm 0.03 ^{a,1} | - | - |

หมายเหตุ - : ไม่พบระยะยับยั้ง;

^{a-c} ที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$);

¹⁻³ ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

การศึกษาความเร็วของการเขย่า (0, 50, 100, 150 และ 200 รอบ/นาที่) เลี้ยงราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 834 ในอาหารเหลว YMB เตรียมด้วยน้ำทะเลความเค็ม 10 ppt ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6 บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ต่อการผลิตสารยับยั้งร่าก่อโรคพืช (ตารางที่ 45) พบว่าเมื่อเลี้ยงราเอนโดไฟท์โดยเขย่าที่ความเร็วรอบเท่ากับ 100 รอบ/นาที่ มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของร่าก่อโรคพืชทุกชนิด และสารสกัดที่ได้จากการเลี้ยงราเอนโดไฟท์โดยการเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที่เท่านั้นมีฤทธิ์ยับยั้ง *A. brassicicola* สูงสุด จึงคัดเลือกการเขย่าเลี้ยงราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 834 ที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที่ ไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

การศึกษาผลของอุณหภูมิ (22, 25, 28 และ 30 องศาเซลเซียส) ที่ใช้บ่มราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 834 ในอาหารเหลว YMB เตรียมด้วยน้ำทะเลความเค็ม 10 ppt มีความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 6 เขย่าที่ 150 รอบ/นาที่ เป็นเวลา 4 วัน ในการผลิตสารยับยั้งร่าก่อโรคพืช (ตารางที่ 46) พบว่าสารสกัดที่ได้จากการบ่มราเอนโดไฟท์ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ให้ผลการยับยั้งร่าก่อโรคพืชทุกชนิด จึงคัดเลือกการบ่มราเอนโดไฟท์ที่ 28 องศาเซลเซียส ไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

ตารางที่ 45 ผลของความเร็วในการเขย่าเลี้ยงราเอนโคไฟท์สายพันธุ์ BUEN 834 ในการผลิตสารยับยั้งการเจริญร่าก่อโรคพืช

| การเขย่า (รอบ/นาที) | ระยะยับยั้งร่าก่อโรคพืช (ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน, เซนติเมตร) | | | |
|------------------------|--|---|---|--|
| | <i>A. brassicicola</i> | <i>C. gloeosporioides</i> | <i>F. oxysporum</i> | <i>Pestalotiopsis</i> sp. |
| 0 | - | - | 0.12 \pm 0.06 ¹ | - |
| 50 | 0.16 \pm 0.05 ^{a, 12} | - | 0.14 \pm 0.05 ^{a, 12} | - |
| 100 | 0.19 \pm 0.06 ^{a, 2} | 0.37 \pm 0.08 ^{b, 2} | 0.24 \pm 0.07 ^{a, 3} | - |
| 150 | 0.39\pm0.06^{c, 3} | 0.32\pm0.08^{c, 12} | 0.19\pm0.06^{b, 23} | 0.11\pm0.07^{a, 1} |
| 200 | 0.13 \pm 0.05 ^{b, 1} | 0.29 \pm 0.06 ^{a, 1} | - | - |

หมายเหตุ - : ไม่พบระยะยับยั้ง;

^{a-c} ที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$);

¹⁻³ ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

ตารางที่ 46 ผลของอุณหภูมิในการเลี้ยงราเอนโคไฟท์สายพันธุ์ BUEN 834 ต่อความสามารถในการผลิตสารยับยั้งการเจริญร่าก่อโรคพืช

| อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) | ระยะยับยั้งร่าก่อโรคพืช (ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน, เซนติเมตร) | | | |
|----------------------------|--|---|---|--|
| | <i>A. brassicicola</i> | <i>C. gloeosporioides</i> | <i>F. oxysporum</i> | <i>Pestalotiopsis</i> sp. |
| 22 | 0.19 \pm 0.06 ¹ | - | - | - |
| 25 | 0.32 \pm 0.06 ^{b, 2} | 0.21 \pm 0.06 ^{a, 1} | - | - |
| 28 | 0.30\pm0.07^{c, 2} | 0.29\pm0.06^{bc, 2} | 0.23\pm0.05^b | 0.16\pm0.07^{a, 1} |
| 30 | 0.14 \pm 0.05 ^{a, 1} | - | - | 0.21 \pm 0.06 ^{b, 1} |

หมายเหตุ - : ไม่พบระยะยับยั้ง;

^{a-c} ที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$);

¹⁻³ ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

การศึกษาผลของระยะเวลา (2, 4, 7, 10 และ 14 วัน) ต่อการผลิตสารยับยั้งราก่อโรคพืชของรา เอนโดไฟท์ BUEN 834 ในอาหารเหลว YMB เติรียมด้วยน้ำทะเลความเค็ม 10 ppt มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6 เขย่า 150 รอบ/นาที บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 47) พบว่าการบ่มรา เอนโดไฟท์เป็นเวลา 4, 7 และ 10 วัน ยับยั้งราก่อโรคพืชได้ทุกชนิด แต่ที่ 7 วันยับยั้งได้สูงสุด โดยเฉพาะอย่างยิ่งกับ *A. brassicicola* และ *C. gloeosporioides* ต่างจากการบ่มที่ระยะเวลาอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จึงคัดเลือกระยะเวลาในการบ่มราเอนโดไฟท์ในการบ่มที่ 7 วัน ไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

ตารางที่ 47 ผลของระยะเวลาในการเลี้ยงราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 834 ต่อความสามารถในการผลิตสารยับยั้งการเจริญราก่อโรคพืช

| ระยะเวลา (วัน) | ระยะยับยั้งราก่อโรคพืช (ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน, เซนติเมตร) | | | |
|-------------------|---|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| | <i>A. brassicicola</i> | <i>C. gloeosporioides</i> | <i>F. oxysporum</i> | <i>Pestalotiopsis</i> sp. |
| 2 | 0.12±0.06 ¹ | - | - | - |
| 4 | 0.28±0.06 ^{b,2} | 0.27±0.07 ^{b,2} | 0.19±0.06 ^{a,2} | 0.17±0.05 ^{a,1} |
| 7 | 0.33±0.07^{b,2} | 0.33±0.07^{b,3} | 0.27±0.05^{a,3} | 0.22±0.04^{a,2} |
| 10 | 0.14±0.07 ^{a,1} | 0.12±0.04 ^{a,1} | 0.13±0.05 ^{a,1} | 0.18±0.06 ^{a,1} |
| 14 | - | - | - | - |

หมายเหตุ - : ไม่พบระยะยับยั้ง;

^{a-c} ที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$);

¹⁻³ ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

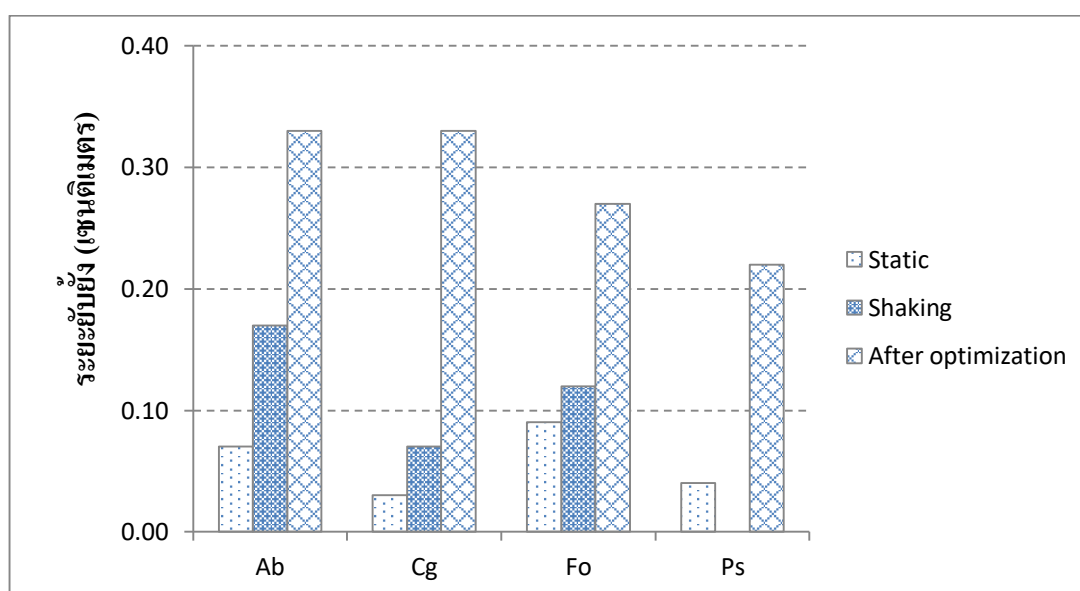
ตารางที่ 48 แสดงสภาวะทางกายภาพเหมาะสมในการเลี้ยงราเอนโดไฟท์ สายพันธุ์ BUEN 834 ให้ผลิตสารยับยั้งราก่อโรคพืชทุกชนิด คือ ความเค็ม 10 ppt อาหารเหลว YMB ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6 เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

ตารางที่ 48 สภาวะทางกายภาพที่เพิ่มฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคพืชของราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 834 เมื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดด้วยวิธี disc diffusion

| สภาวะทางกายภาพ | สภาวะทางกายภาพที่เพิ่มฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคพืช | | | | สภาวะทางกายภาพที่เพิ่มฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคพืชส่วนใหญ่ |
|-----------------------------|---|---------------------------|---------------------|---------------------------|---|
| | <i>A. brassicicola</i> | <i>C. gloeosporioides</i> | <i>F. oxysporum</i> | <i>Pestalotiopsis sp.</i> | |
| ความเค็ม (ppt) | 10 | 10 | 0, 10, 15, 20 | - | 10 |
| ชนิดอาหารเหลว | YMB | 0.5xPDB, PDB, YMB | 0.5xPDB | YMB | YMB |
| ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น | 5, 6, 7 | 6, 7 | 6, 7 | 6 | 6 |
| การเขย่า (รอบ/นาที) | 150 | 100, 150 | 100, 150 | 100 | 100, 150 |
| อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) | 25, 28 | 28 | 28 | 28, 30 | 28 |
| ระยะเวลา (วัน) | 4, 7 | 7 | 7 | 7 | 7 |

หมายเหตุ PDB: Potato dextrose broth, 0.5x PDB: Haft strength PDB, YMB: Yeast malt glucose broth.; ระดับสภาวะที่ใช้ตัวหนาเป็นระดับสภาวะที่เลือกใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป; - สภาวะทางกายภาพที่ศึกษาไม่มีผลต่อการผลิตสารยับยั้งราก่อโรคพืช

เปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดที่ได้จากสภาวะตั้งต้น (Static หรือ Shaking) กับฤทธิ์ของสารสกัดที่ได้ภายหลังจากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสม (ภาพที่ 10 และตารางที่ 49) จากการเปรียบเทียบระยะยับยั้งที่ได้ภายหลังจากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสม กับสารสกัดจากสภาวะตั้งต้น ที่ตั้งทิ้งไว้ พบว่าฤทธิ์ *C. gloeosporiodes* ของสารสกัดจากราเอนโคไฟท์สายพันธุ์ BUEN 834 เพิ่มขึ้นสูงสุดถึง 10 เท่า ส่วนฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคพืชชนิดอื่นเพิ่มขึ้นประมาณ 2-4.5 เท่า และเมื่อเปรียบเทียบกับฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดจากสภาวะตั้งต้นที่เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบ/นาที พบว่าฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคพืชทุกชนิดเพิ่มขึ้นประมาณ 1-3.5 เท่า ยกเว้นฤทธิ์ยับยั้ง *Pestalotiopsis* sp. ที่เพิ่มขึ้นจากไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเป็นมีฤทธิ์ยับยั้ง



ภาพที่ 10 ระยะยับยั้งของสารสกัดจากราเอนโคไฟท์สายพันธุ์ BUEN 834 จากการศึกษาสภาวะตั้งต้นโดยตั้งทิ้งไว้ (Static) และ เขย่า (Shaking) ด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที และภายหลัง การศึกษาสภาวะที่เหมาะสม (After optimization) ในการยับยั้งราก่อโรคพืช *A. brassicicola* (Ab), *C. gloeosporiodes* (Cg), *F. oxysporum* (Fo) และ *Pestalotiopsis* sp. (Ps)

ตารางที่ 49 เปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคพืชของสารสกัดราเอ็นโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 834 เมื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดด้วยวิธี disc diffusion

| สถานะทางกายภาพ | สถานะที่ศึกษา | | ฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคพืชที่เพิ่มขึ้น (เท่า) | | | | |
|---------------------------|-----------------------------|-----------------|--|---------------------------|---------------------|---------------------------|------|
| | สถานะตั้งต้น | สถานะที่เหมาะสม | <i>A. brassicicola</i> | <i>C. gloeosporioides</i> | <i>F. oxysporum</i> | <i>Pestalotiopsis</i> sp. | |
| สถานะที่ ตั้งทิ้งไว้ | ความเค็ม (ppt) | 0 | 10 | | | | |
| | อาหารเหลว | PDB | YMB | | | | |
| | ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น | 5 | 6 | | | | |
| | การเขย่า (รอบ/นาที) | 0 | 100 | 3.71 | 10.00 | 2.00 | 4.50 |
| | อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) | 28 | 28 | | | | |
| | ระยะเวลา (วัน) | 4 | 7 | | | | |
| สถานะที่ เขย่าให้อากาศ | ความเค็ม (ppt) | 0 | 10 | | | | |
| | อาหารเหลว | PDB | YMB | | | | |
| | ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น | 5 | 6 | | | | |
| | การเขย่า (รอบ/นาที) | 150 | 100 | 0.94 | 3.71 | 1.25 | UC |
| | อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) | 28 | 28 | | | | |
| | ระยะเวลา (วัน) | 4 | 7 | | | | |

หมายเหตุ ฤทธิ์ยับยั้งที่เพิ่มขึ้น (เท่า) = (ฤทธิ์ของสารสกัดจากสถานะที่เหมาะสม/ฤทธิ์ของสารสกัดจากสถานะตั้งต้น) -1; PDB: Potato dextrose broth, YMB: Yeast malt glucose broth; UC (Uncalculated): ไม่สามารถคำนวณได้ เนื่องจากไม่พบการยับยั้งในสถานะตั้งต้น

3.7 การศึกษาการเปรียบเทียบสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้งราก่อโรคพืชของราจากป่าชายเลนสายพันธุ์ต่าง ๆ

ตารางที่ 50 เปรียบเทียบสภาวะเหมาะสมที่คัดเลือกจากผลของสารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคพืชทั้ง 4 ชนิดที่ดี พบว่าความเค็มที่เหมาะสมในการผลิตสารยับยั้งราก่อโรคพืชของราทะเลส่วนใหญ่คือ 15 ppt ขณะที่ราเอนโดไฟท์ส่วนใหญ่ชอบความเค็ม 10 ppt และพบว่าราเอนโดไฟท์ สายพันธุ์ BUEN 121 ผลิตสารยับยั้งประสิทธิภาพสูงเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่ไม่มีความเค็ม (0 ppt) และอาหารเหลวที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้งราก่อโรคพืชของราทะเลและราเอนโดไฟท์ เป็นอาหารที่มีความสมบูรณ์ (Rich nutrient media) ได้แก่ PDB, YMB และ SDB ส่วนอาหารเหลวที่มีสารอาหารต่ำ (Low nutrient media) ไม่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้งราก่อโรคพืชของราจากป่าชายเลน ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้งราก่อโรคพืชส่วนใหญ่คือ 6 ความเร็วรอบของการเขย่าที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 100-150 รอบ/นาที โดยราทะเลสายพันธุ์ BUCS 004 และราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 121 การเขย่าที่เหมาะสมคือด้วยความเร็ว 100 รอบ/นาที อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้งราก่อโรคพืชของราป่าชายเลนส่วนใหญ่คือ 28 องศาเซลเซียส ยกเว้นราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 ใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมเท่ากับ 25 องศาเซลเซียส และราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 121 ใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมเท่ากับ 22 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการบ่มที่เหมาะสมเท่ากับ 7 วัน มีผลต่อการเพิ่มฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชของราจากป่าชายเลนส่วนใหญ่ ยกเว้นราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 121 มีระยะเวลาที่เหมาะสมเท่ากับ 4 วัน

3.8 การเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคพืชของสารสกัดที่ได้จากราป่าชายเลนแต่ละสายพันธุ์

เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคพืชของสารสกัด ที่ได้ภายหลังการเลี้ยงราจากป่าชายเลนแต่ละสายพันธุ์ในสภาวะเหมาะสมที่ได้จากการศึกษา (ตารางที่ 51) พบว่าราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 ผลิตสารยับยั้งราก่อโรคพืชทุกชนิดได้ดีเป็นอันดับแรก เมื่อเปรียบเทียบกับฤทธิ์ของสารสกัดที่ได้จากราป่าชายเลนสายพันธุ์อื่นๆ สารสกัดที่ได้ฤทธิ์ยับยั้ง *A. brassicicola* และ *C. gloeosporioides* สูงสุด และราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 121 และ BUEN 830 ผลิตสารยับยั้งราก่อโรคพืชได้ดีใกล้เคียงกันเป็นอันดับที่สองรองจากราสายพันธุ์ BUSK 055-1 แต่สายพันธุ์ BUEN 830 ยับยั้ง *C. gloeosporioides* ซึ่งเป็นราก่อโรคสำคัญได้ดีกว่า จึงคัดเลือกราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 และราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830 ไปศึกษารูปแบบการเจริญ ขยายขนาดการหมักและหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดต่อการเจริญของราก่อโรคพืช

ตารางที่ 50 สภาวะทางกายภาพที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้งราก่อโรคพืชของราจากป่าชายเลนแต่ละสายพันธุ์

| สภาวะทางกายภาพ ที่เหมาะสม | ราจากป่าชายเลน | | | | |
|------------------------------|----------------|---------------|-------------|-------------|-------------|
| | ราทะเล | | ราเอนโดไฟท์ | | |
| | BUCS 004 | BUSK 055-1 | BUEN 121 | BUEN 830 | BUEN 834 |
| ความเค็ม (ppt) | 15 | 15 | 0 | 10 | 10 |
| ชนิดอาหารเหลว | YMB | PDB | PDB | SDB | YMB |
| ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น | 6 | 6 | 5 | 6 | 6 |
| การเขย่า (รอบ/นาที) | 100 | 150 | 100 | 150 | 150 |
| อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) | 28 | 25 | 22 | 28 | 28 |
| ระยะเวลา (วัน) | 7 | 7 | 4 | 7 | 7 |

ตารางที่ 51 ฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคพืชของสารสกัดจากราจากป่าชายเลนแต่ละสายพันธุ์ เมื่อเลี้ยงจากราป่าชายเลนภายหลังการศึกษาสภาวะเหมาะสม

| สารสกัดจาก ราป่าชายเลน | ระยะยับยั้งราก่อโรคพืช (ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน, เซนติเมตร) | | | |
|---------------------------|---|--------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|
| | <i>A. brassicicola</i> | <i>C. gloeosporioides</i> | <i>F. oxysporum</i> | <i>Pestalotiopsis</i> sp. |
| BUCS 004 | 0.17 \pm 0.05 ^{a,1} | 0.20 \pm 0.07 ^{a,1} | 0.17 \pm 0.07 ^{a,1} | 0.14 \pm 0.05 ^{a,1} |
| BUSK 055-1 | 0.58 \pm 0.10 ^{ab,4} | 0.62 \pm 0.09 ^{b,3} | 0.52 \pm 0.08 ^{a,4} | 0.49 \pm 0.07 ^{a,2} |
| BUEN 121 | 0.31 \pm 0.09 ^{b,23} | 0.23 \pm 0.09 ^{a,1} | 0.28 \pm 0.06 ^{ab,23} | 0.22 \pm 0.07 ^{a,2} |
| BUEN 830 | 0.31 \pm 0.07 ^{b,3} | 0.36 \pm 0.05 ^{b,2} | 0.34 \pm 0.07 ^{b,3} | 0.19 \pm 0.03 ^{a,1} |
| BUEN 834 | 0.33 \pm 0.07 ^{b,23} | 0.33 \pm 0.07 ^{b,2} | 0.27 \pm 0.05 ^{a,2} | 0.22 \pm 0.04 ^{a,1} |

หมายเหตุ - : ไม่พบระยะยับยั้ง;

^{a-b} ที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$);

¹⁻⁴ ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

2. การศึกษาความสัมพันธ์ของการเจริญกับความสามารถในการผลิตสารยับยั้งราก่อโรคพืชของรากป่าชายเลน

จากการศึกษาความสัมพันธ์ของการเจริญ โดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง (กราฟเส้น) กับฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดที่ได้ภายหลังการหาสภาวะเหมาะสม ที่ระยะเวลาต่าง ๆ (กราฟแท่ง) ของราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 (ภาพที่ 11) พบว่าราทะเลมีน้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้น หลังจากบ่มเป็นเวลา 7 วันและสูงสุดที่เวลา 10 วัน เมื่อบ่มราทะเลมากกว่า 10 วัน พบน้ำหนักเซลล์แห้งลดลงเล็กน้อยก่อนจะคงที่เมื่อบ่มเป็นเวลา 14-28 วัน ส่วนฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดพบว่าเมื่อบ่มราทะเลเป็นเวลา 7-10 วันพบฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคพืชสูงสุด โดยที่เวลา 7 วันเป็นระยะเวลาเดียวกับที่ราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูง สารสกัดที่ได้จากการเลี้ยงราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 มากกว่า 10 วัน ฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคพืชที่ได้ลดลงเล็กน้อย

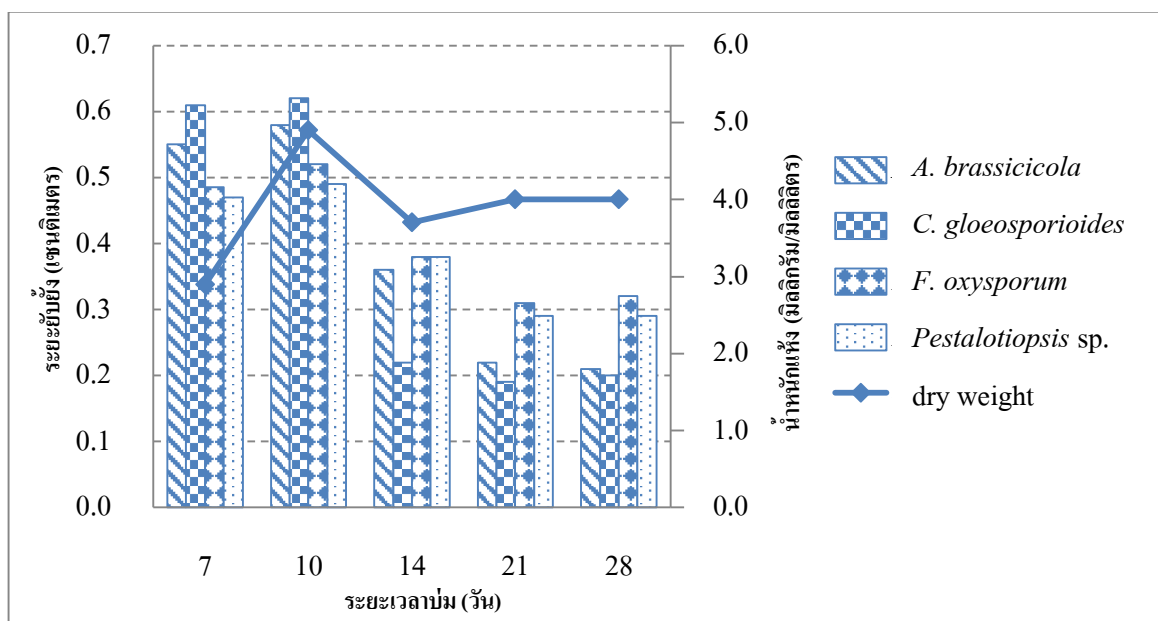
จากการศึกษาความสัมพันธ์ของการเจริญ โดยการหาน้ำหนักแห้ง กับฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดที่ได้ภายหลังการหาสภาวะเหมาะสมที่ระยะเวลาต่างๆ ของราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830 (ภาพที่ 12) พบว่าราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830 มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงขึ้นต่อเนื่องในระยะแรก และพบน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดที่ระยะเวลา 7 วัน หลังจากนั้นน้ำหนักเซลล์แห้งเริ่มลดลงเล็กน้อยก่อนที่จะคงที่เมื่อเลี้ยงราเอนโดไฟท์เป็นเวลา 10-14 วัน ส่วนฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดที่ระยะเวลาต่างๆ พบว่าฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคพืชเพิ่มขึ้นมากหลังจากการบ่มนานกว่า 4 วัน สารสกัดจากราเอนโดไฟท์มีกิจกรรมยับยั้งและน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด เมื่อบ่มเป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นฤทธิ์ยับยั้งลดลงเล็กน้อยและคงที่

จะเห็นได้ว่าการเจริญของรากป่าชายเลน มีผลต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและพบว่าเมื่อรากป่าชายเลนมีการเจริญสูง เป็นช่วงเวลาเดียวกับที่รากป่าชายเลนผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคพืชสูง

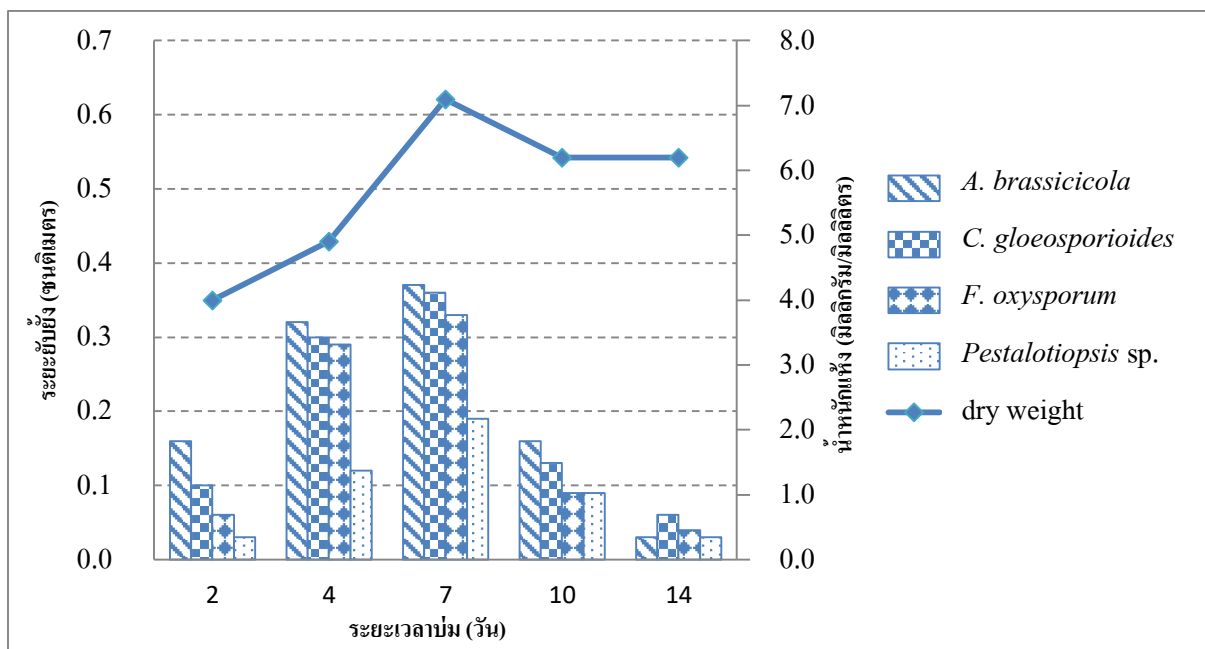
3. การศึกษาผลของการใช้สภาวะเหมาะสมกับการเลี้ยงรากป่าชายเลนในการขยายขนาดการหมัก

(Scale up)

การศึกษาผลผลิตในรูปของสารสกัดจากการเลี้ยงราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 และเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830 ด้วยสภาวะเหมาะสมในอาหารเหลวปริมาตร 50 มิลลิลิตร (ก่อนการขยายขนาดการหมัก) และในอาหารเหลวปริมาตร 1000 มิลลิลิตร (ภายหลังขยายขนาดการหมัก) คำนวณผลผลิตที่ได้ต่อปริมาตรของอาหารเหลวที่ใช้ (น้ำหนัก/ปริมาตร) (ตารางที่ 52) พบว่าสารสกัดที่ได้ก่อนขยายขนาดการหมักแตกต่างจากภายหลังการขยายขนาดการหมักโดยพบว่า ราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 ให้ผลผลิตก่อนและหลังขยายขนาดการหมักประมาณ 240 มิลลิกรัม/ลิตร และ 274 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ ส่วนราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830 ให้ผลผลิตก่อนและหลังขยายขนาดการหมักประมาณ 211 มิลลิกรัม/ลิตร และ 236 มิลลิกรัม/ลิตร



ภาพที่ 11 ระยะยับยั้งราก่อโรคพืช (เซนติเมตร) และน้ำหนักแห้งเซลล์ (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) จากการเลี้ยงราทะเลสาบพันธุ์ BUSK 055-1 ในสภาวะที่เหมาะสม (15 ppt, PDB, pH 6, 150 rpm, 25°C) เป็นเวลา 7, 10, 14, 21 และ 28 วัน



ภาพที่ 12 ระยะยับยั้งราก่อโรคพืช (เซนติเมตร) และน้ำหนักแห้งเซลล์ (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) จากการเลี้ยงราแอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830 ในสภาวะที่เหมาะสม (10 ppt, SDB, pH 6, 150 rpm, 28°C) เป็นเวลา 2, 4, 7, 10 และ 14 วัน

ตารางที่ 52 ผลผลิต (Yield) ของராபாயเลนจากการศึกษา ก่อนและหลังขยายขนาดการหมัก

| สภาวะเหมาะสมที่ศึกษา | รจากปாயเลน | น้ำหนักสาร (มิลลิกรัม/ลิตร) |
|----------------------|------------|-----------------------------|
| ก่อนขยายขนาดการหมัก | BUSK 055-1 | 240±11 |
| | BUEN 830 | 211±9 |
| หลังขยายขนาดการหมัก | BUSK 055-1 | 274±0 |
| | BUEN 830 | 236±0 |

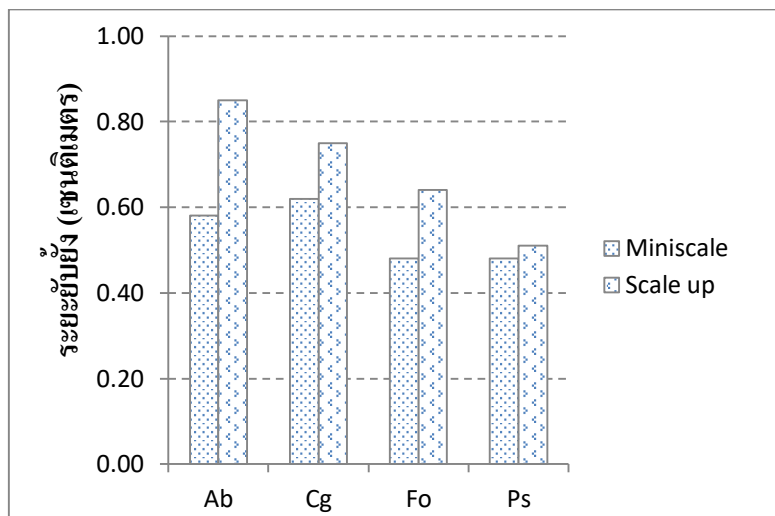
หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ภาพที่ 13 และภาพที่ 14 แสดงการเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคพืชชนิดต่างๆ ของสารสกัดที่ได้ก่อนและภายหลังการขยายขนาดการหมัก พบว่าภายหลังจากขยายขนาดการหมักสารสกัดที่ได้มีฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคพืชทุกชนิดเพิ่มขึ้น ยกเว้น *Pestalotiopsis* sp. ที่ให้ผลยับยั้งใกล้เคียงกัน โดยสารสกัดที่ได้ภายหลังการขยายขนาดการหมักราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 แสดงฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคพืชทุกชนิดได้มากขึ้นประมาณ 0.2-0.4 เท่า ของสารสกัดที่ได้ก่อนขยายขนาดการหมัก

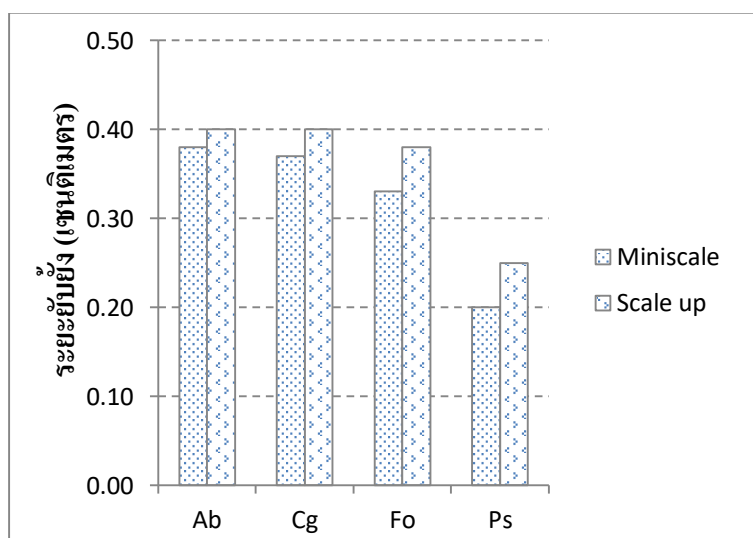
สารสกัดที่ได้ก่อนและภายหลังการขยายขนาดการหมักราแอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830 มีฤทธิ์ยับยั้งใกล้เคียงกัน ในกรณี *A. brassicicola* และ *C. gloeosporioides* ขณะที่ฤทธิ์ยับยั้ง *F. oxysporum* และ *Pestalotiopsis* sp. ของสารสกัดที่ได้ภายหลังการขยายขนาดการหมักสูงกว่าฤทธิ์ยับยั้งที่ได้ก่อนการขยายขนาดการหมักเล็กน้อย

4. การหาค่า Minimum inhibition concentration (MIC) ของสารสกัดภายหลังการขยายขนาดการหมัก ในการยับยั้งราก่อโรคพืช

ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 และแอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830 เปรียบเทียบกับยา fluconazole ด้วยวิธี agar dilution แสดงในตารางที่ 53 ในการยับยั้งการเจริญเส้นใยของราก่อโรคพืช 4 สายพันธุ์ พบค่า MIC ของยา fluconazole ต่อการยับยั้งการเจริญของ *A. brassicicola* และ *C. gloeosporioides* เท่ากับ 256 และ 1024 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ การยับยั้ง *F. oxysporum* และ *Pestalotiopsis* sp. มีค่า MIC เท่ากับ 2048 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร



ภาพที่ 13 ระยะเวลาที่ยัง *A. brassicicola* (Ab), *C. gloeosporioides* (Cg), *F. oxysporum* (Fo) และ *Pestalotiopsis* sp. (Ps) ของสารสกัดจากการเลี้ยงราทะเลสาบพันธุ์ BUSK 055-1 ในสภาวะที่เหมาะสมก่อน (Mini scale) และภายหลังการขยายขนาดการหมัก (Scale up)



ภาพที่ 14 ระยะเวลาที่ยัง *A. brassicicola* (Ab), *C. gloeosporioides* (Cg), *F. oxysporum* (Fo) และ *Pestalotiopsis* sp. (Ps) ของสารสกัดจากการเลี้ยงราออน โคไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830 ในสภาวะที่เหมาะสมก่อน (Mini scale) และภายหลังการขยายขนาดการหมัก (Scale up)

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดจากราป่าชายเลนกับฤทธิ์ยับยั้งของยา fluconazole ต่อราก่อโรคพืช พบว่าสารสกัดจากราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 มีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับยา fluconazole เมื่อทดสอบกับ *C. gloeosporioides* คือ 1024 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และสารสกัดจากราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 มีประสิทธิภาพเป็นครึ่งหนึ่งของยา fluconazole เมื่อทดสอบกับ *F. oxysporum* และ *Pestalotiopsis* sp. ส่วนสารสกัดจากราแอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830 มีประสิทธิภาพน้อยกว่ายา fluconazole อย่างน้อย 2 เท่า ขึ้นกับชนิดราก่อโรคพืชที่ทดสอบ

ตารางที่ 53 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากราป่าชายเลนและยา fluconazole ใน การยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืช

| ราก่อโรคพืช | ค่า MIC (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และประสิทธิภาพของสารสกัด เทียบกับยา fluconazole | | | | | |
|---------------------------|--|--|------------|-------------|----------|-------------|
| | Fluconazole | | BUSK 055-1 | | BUEN 830 | |
| | MIC | | MIC | ประสิทธิภาพ | MIC | ประสิทธิภาพ |
| <i>A. brassicicola</i> | 256 | | 2048 | 1/8 | 4096 | 1/16 |
| <i>C. gloeosporioides</i> | 1024 | | 1024 | 1 | 4096 | 1/4 |
| <i>F. oxysporum</i> | 2048 | | 4096 | 1/2 | >4096 | >1/2 |
| <i>Pestalotiopsis</i> sp. | 2048 | | 4096 | 1/2 | 4096 | 1/2 |

หมายเหตุ ทดสอบด้วยวิธี agar dilution บนอาหาร PDA/DW เมื่อบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ค่าประสิทธิภาพคำนวณได้จากค่า MIC ของยา fluconazole/ ค่า MIC ของสารสกัดที่ได้จากราในระบบนิเวศป่าชายเลน

บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผล

สรุปผลการทดลอง

จากการทดสอบยืนยันประสิทธิภาพของราจากป่าชายเลนในการยับยั้งราก่อโรคพืชบนอาหารทดสอบ PDA/DW และ PDA/SW ด้วยวิธีการเลี้ยงเชื้อร่วมกัน แสดงให้เห็นว่าราจากป่าชายเลนทุกสายพันธุ์ที่นำมาศึกษามีประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคพืช และแต่ละสายพันธุ์สามารถยับยั้งราก่อโรคพืชแต่ละชนิดได้ต่างกัน เมื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากราป่าชายเลนโดยใช้สภาวะตั้งต้นสองสภาวะ คือสภาวะตั้งต้นที่ตั้งทิ้งไว้ (Static) และสภาวะตั้งต้นที่เขย่า (Shaking) ด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที พบว่าสารสกัดจากราป่าชายเลนส่วนใหญ่มีฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชเพิ่มขึ้นเมื่อมีการเขย่า

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงราจากป่าชายเลนให้ผลิตสารยับยั้งราก่อโรคพืช โดยใช้สภาวะทางกายภาพต่างๆ ได้แก่ ความเค็มของอาหารเหลว ชนิดของอาหารเหลว ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเหลว ความเร็วในการเขย่า อุณหภูมิ และระยะเวลาที่เหมาะสม ตามลำดับ พบว่าความเค็มที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้งของราจากป่าชายเลนแต่ละสายพันธุ์แตกต่างกัน โดยราทะเลมีความเค็มที่เหมาะสม 15 ppt ขณะที่ราเอนโดไฟท์ชอบความเค็มในช่วงต่ำกว่า ระหว่าง 0-10 ppt ชนิดของอาหารเหลวที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้งราก่อโรคพืชเป็นอาหารที่มีสารอาหารสมบูรณ์ ได้แก่ PDB, YMB และ SDB ราจากป่าชายเลนส่วนใหญ่ที่ศึกษายกเว้นราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 121 ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นที่เหมาะสมเท่ากับ 6 ความเร็วในการเขย่าที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 100-150 รอบ/นาที อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 25-28 องศาเซลเซียส และระยะเวลาที่เหมาะสมคือ 7 วัน

ภายหลังการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมพบว่าสารสกัดจากราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 และราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830 มีฤทธิ์สูงสุดสองอันดับแรก เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดที่ได้กับสารสกัดจากการศึกษาสภาวะตั้งต้น พบว่าสภาวะทางภาพที่เหมาะสมส่งผลให้ราจากป่าชายเลนผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเพิ่มขึ้น พบฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคพืชเพิ่มขึ้นสูงสุดถึง 10 เท่า จากสารสกัดของราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830

เมื่อใช้สภาวะที่เหมาะสมเลี้ยงราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 และราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830 ในอาหารเหลวปริมาตร 50 มิลลิลิตร (ก่อนการขยายขนาดการหมัก) และ 200 มิลลิลิตร (ภายหลังการขยายขนาดการหมัก) พบว่าให้ผลต่างกันเพียงเล็กน้อย

การศึกษาค่า MIC ของสารสกัดต่อราก่อโรคพืชพบว่าอยู่ในช่วง 1024 - >4096 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยยับยั้ง *C. gloeosporioides* DOAC 0786 ก่อโรคแอนแทรกโนสได้ดีที่สุด

อภิปรายผลการทดลอง

รากจากป่าชายเลนเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพขนาดใหญ่ (Lin et al., 2001; Sridhar, 2004; Bugni & Ireland, 2004) และเป็นรากกลุ่มหนึ่งที่ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการเกษตรเพื่อควบคุมรากก่อโรคพืช (Elavarasi, Sathiya, Rathna, & Kalaiselvam, 2012) การยับยั้งรากก่อโรคพืชอาจเกิดจาก 2 กลไก ได้แก่ การผลิตเอนไซม์ออกมายับยั้งการเจริญของรากก่อโรคพืช หรือการผลิตสารทุติยภูมิเพื่อยับยั้งการเจริญของรากก่อโรคพืช (Pal & Gardener, 2006; Mishra et al., 2011) ซึ่งรากจากป่าชายเลน และรากในระบบนิเวศทางทะเลอื่นๆ จะขับสารทุติยภูมิออกมาออกเซลล์ (Secondary metabolite) เพื่อป้องกันตนเองจากสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงหรือป้องกันตนเองจากสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ในระบบนิเวศนั้น (Rodrigues et al., 2011; Kansoh et al., 2010; Li, Lan, Lam, Yang, & Zhu, 2011)

จากการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากรากจากป่าชายเลนที่เลี้ยงโดยใช้สภาวะตั้งต้นนิ่งไว้ (Static) และสภาวะตั้งต้นที่เขย่า (Shaking) ด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที พบว่าสารสกัดจากรากจากป่าชายเลนส่วนใหญ่มีฤทธิ์ยับยั้งรากก่อโรคพืชเพิ่มขึ้นเมื่อเลี้ยงในสภาวะตั้งต้นที่เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที ปัจจัยที่แตกต่างระหว่างสองสภาวะตั้งต้นนี้คือ ความเร็วรอบในการเขย่าทำให้ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหารเหลวแตกต่างกัน

จากการศึกษาสภาวะความเค็มที่เหมาะสมของอาหารเหลว พบว่าความต้องการความเค็มในการสร้างสารยับยั้งเป็นความต้องการเฉพาะตัว สามารถแบ่งกลุ่มของรากจากป่าชายเลนที่ต้องการความเค็มที่เหมาะสมต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ของรากจากป่าชายเลนออกเป็น 3 ลักษณะได้แก่ รากที่ผลิตสารออกฤทธิ์ได้ดีในน้ำจืด (0 ppt) รากทะเลจากต้นจากที่ผลิตสารออกฤทธิ์ดีเมื่อมีความเค็มต่ำในช่วง 0-10 ppt และรากเอนโดไฟท์จากพืชชายเลนที่ผลิตสารออกฤทธิ์ดีเมื่อความเค็มอยู่ในช่วง 10-20 ppt รากเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 121 เป็นรากเพียงสายพันธุ์เดียวในการศึกษาครั้งนี้ ที่ผลิตสารยับยั้งรากก่อโรคพืชได้ดีในอาหารเหลวที่ไม่มีความเค็ม การที่รากป่าชายเลนต้องการความเค็มในการผลิตสารออกฤทธิ์แตกต่างกัน สอดคล้องกับ Masuma et al. (2001) และ Bugni & Ireland (2004) ที่รายงานไว้ว่าค่าความเค็มที่ส่งผลให้รากทะเลผลิตสารออกฤทธิ์ที่มีประสิทธิภาพสูง คือการเลี้ยงในอาหารที่ผสมน้ำทะเลร้อยละ 20-60 Kerzaon et al. (2007) รายงานการผลิต gliotoxin ปริมาณสูงจากการเลี้ยง *Aspergillus fumigatus* ในอาหารเหลวที่เตรียมด้วยน้ำทะเล (30 ppt) ขณะที่ Huang et al. (2011b) รายงานว่ารากจากระบบนิเวศทางทะเลส่วนใหญ่ (ร้อยละ 61.7 จากทั้งหมด 47 สายพันธุ์) สามารถผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีในอาหารที่ไม่มีความเค็ม Motti et al. (2007) รายงานรากในระบบนิเวศทางทะเล *Emericella niduland* ผลิต unguinol ที่มีประสิทธิภาพสูงต่อการยับยั้ง pyruvate phosphate dikinase ของพืช C4 ในอาหารที่ไม่มีความเค็ม การที่รากในระบบนิเวศทางทะเล ผลิตสารออกฤทธิ์ได้ดีในอาหารที่ไม่มีความเค็ม อาจเนื่องจากในสภาพแวดล้อมทางทะเลเราต้องใช้พลังงานส่วนหนึ่งไปควบคุมออกไมซิส ทำให้ประสิทธิภาพในการผลิตสารทุติยภูมิลดลงหรือมีอัตราการผลิตช้าลง (Bugni & Ireland, 2004)

จากการศึกษาพบว่าอาหารที่มีสารอาหารสมบูรณ์ (Rich nutrient media) เป็นอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้งราก่อโรคพืช สอดคล้องกับการผลิต unguinol ประสิทธิภาพสูงจากการเลี้ยงราในระบบนิเวศทางทะเล *Emericella niduland* ในอาหารที่มีอาหารสมบูรณ์ (Motti et al., 2007) ราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 และราเอนโคไฟท์สายพันธุ์ BUEN 121 ใช้อาหาร PDB เป็นอาหารที่เหมาะสม ราทะเลสายพันธุ์ BUCS 004 และราเอนโคไฟท์สายพันธุ์ BUEN 834 ใช้อาหาร YMB เป็นอาหารที่เหมาะสม ส่วนราเอนโคไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830 เป็นราสายพันธุ์เดียวจากการศึกษาในครั้งนี้ที่ใช้อาหาร SDB เป็นอาหารที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารยับยั้งราก่อโรคพืช อย่างไรก็ตามอาหารทั้งสามชนิดนี้จัดเป็น rich media มีรายงานว่าอัตราส่วนของ Carbon : Nitrogen ในอาหารมีผลโดยตรงต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ของราในแง่ของประสิทธิภาพ จำนวนชนิด หรือปริมาณของสารออกฤทธิ์ที่ได้ (Kumar et al., 200; Casas López et al., 2003; Miao et al., 2006) อาหารเหลวที่เหมาะสมทั้ง 3 ชนิด มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาล glucose ซึ่งเหมาะสมต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Gogoi et al., 2008) เมื่อพิจารณาจากสูตรอาหารพบว่าอาหารเหลวแต่ละชนิดมีปริมาณแหล่งคาร์บอนสูง คือ อาหาร PDB และ SDB มีปริมาณ glucose เท่ากับ 20 กรัม/ลิตร และ YMB มีเท่ากับ 10 กรัม/ลิตร จากปริมาณของแหล่งคาร์บอนข้างต้นน่าจะมากเพียงพอต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของราจากป่าชายเลน จากการสำรวจรายงานการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของราในระบบนิเวศทางทะเล พบข้อมูลเกี่ยวกับปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมส่งผลให้ราจากระบบนิเวศทางทะเลผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้มากกว่าหนึ่งชนิด และถ้าปริมาณของแหล่งคาร์บอนต่ำ จะส่งผลให้ราในระบบนิเวศทางทะเลผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้น้อยชนิด หรือทำให้้อัตราการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพลดลง (Miao et al., 2006; Xiong et al., 2009) เป็นไปได้ว่าการใช้ปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม ทำให้กระบวนการเมทาบอลิซึมของ glucose สร้าง ATP เพียงพอต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Xiong et al., 2009)

อาหารเหลวที่มีสารอาหารสมบูรณ์ทั้ง 3 ชนิด คือ PDB, YMD และ SDB มีแหล่งไนโตรเจนเป็น peptone 5 กรัม/ลิตร และ tryptone 5 กรัม/ลิตร PDB มี potato starch เป็นแหล่งไนโตรเจน เนื่องจากชนิดของแหล่งไนโตรเจนในอาหารทั้ง 3 ชนิด แตกต่างกันทำให้ไม่สามารถระบุได้ว่าปริมาณไนโตรเจนมีมากน้อยกว่ากันเพียงใด อย่างไรก็ตามปริมาณไนโตรเจนที่มีเพียงพอต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของราจากป่าชายเลน มีรายงานการใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ ชนิดของแหล่งไนโตรเจน และอัตราส่วนของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมส่งผลต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยตรง ทำให้ราผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้มากกว่าหนึ่งชนิด (Xiong et al., 2009; Kiran et al., 2009) นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงการใช้ peptone หรือ yeast extracts ในสัดส่วน 5 กรัม/ลิตร ซึ่งเท่ากับแหล่งไนโตรเจนของอาหาร YMB และ SDB ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ว่าเหมาะสมต่อการผลิต 3-methyl-N-(2-phenylethyl)-butanamide และ cyclo (D-pro-D-phe) ของราจากระบบนิเวศทางทะเล *Letendreaa helminthicola* และส่งผลให้ราสายพันธุ์ดังกล่าวมีการเจริญสูงสุดอีกด้วย (Yang et al., 2007)

ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น (Initial pH) ของอาหารเหลวที่เหมาะสมต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นปัจจัยสำคัญอีกประการหนึ่งที่ส่งผลต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Singh, 2003; Chen, Zhao, Chen, & Li., 2008) ค่า pH เริ่มต้นมีผลโดยตรงต่อหน้าที่ของเซลล์เมมเบรน รวมถึงรูปร่างและโครงสร้างของเมมเบรน การขนส่งไอออน โดยเฉพาะการขนส่งสารอาหารผ่านเซลล์ รวมถึงสารตั้งต้นของการผลิตสารชีวโมเลกุลของเซลล์ (Shu & Lung, 2004; Arora & Chandra, 2010) นอกจากนี้ยังพบว่าค่า pH ที่จำเป็นต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมของรามิค่าอยู่ระหว่าง 5-6 (Wahlker & White, 2011) สอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้ การที่ค่า pH เริ่มต้นของอาหารเหลวใกล้เคียงกับ 6 ส่งผลดีต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพนั้นอาจเกี่ยวข้องกับสมดุลของโปรตรอนในเซลล์ และเป็นค่า pH ที่เหมาะสมต่อการดำเนินกิจกรรมของเอนไซม์ในกระบวนการเมแทบอลิซึม ดังการศึกษากิจกรรมของกลุ่มเอนไซม์ที่ย่อยเซลลูโลส ได้แก่ exoglucanase, endoglucanase และ β -glucosidase จากราบก *Paecilomyces variotii* ที่ศึกษาผลของค่า pH เริ่มต้น 3-8 ของอาหารเหลวเลี้ยงรา *P. variotii* ต่อการดำเนินกิจกรรมของเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด พบว่าอยู่ระหว่าง 5-6 กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเมื่อค่า pH เริ่มต้นอยู่ระหว่าง 7-8 และไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์เมื่อค่า pH เริ่มต้นอยู่ระหว่าง 3-4 (Hussaina et al., 2012) ค่า pH เริ่มต้นที่ 6 ใกล้เคียงกับสภาวะที่เป็นกลาง สอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้ มีรายงานการผลิตสารออกฤทธิ์ที่มีประสิทธิภาพหรือการผลิตสารในปริมาณสูง เมื่อเลี้ยงราในสภาวะที่มีค่า pH ใกล้เคียงกับสภาวะที่เป็นกลาง (Rubini et al., 2005; Kiran et al., 2009) นอกจากนี้ยังมีรายงานการผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงจากการเลี้ยงราในระบบนิเวศทางทะเล *Penicillium viridicatum* ด้วยอาหารเหลวที่มีค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 6 (Kansoh et al., 2010) เช่นเดียวกับการผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงจากการเลี้ยงเชื้อราในระบบนิเวศทางทะเล *Dothideomycete* sp. HQ 316564 ที่พบว่าค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 6 ส่งผลให้ราทะเลสายพันธุ์นี้ผลิตสารในปริมาณสูง (Liu, Lei, & Li, 2013) พบการผลิตสารออกฤทธิ์ในปริมาณสูงจากราเอนโดไฟท์ในพืชบก *Fusarium* sp. DF2 โดยการเลี้ยงด้วยอาหารที่มีค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 6 เช่นกัน และยังพบการเจริญของราเอนโดไฟท์สายพันธุ์นี้สูงสุดที่ค่า pH ดังกล่าวอีกด้วย (Gogoi et al., 2008) จากรายงานที่สำรวจมาจะเห็นว่าอาหารเหลวที่เหมาะสมมีค่า pH เริ่มต้น 6 หรือใกล้เคียงกับ 6

ความเร็วรอบที่เหมาะสมในการเขย่า เป็นปัจจัยสำคัญประการหนึ่งในการเลี้ยงราจากระบบนิเวศทางทะเลให้ผลิตสารทุติยภูมิ ความเร็วรอบในการเขย่ามีความสัมพันธ์กับปริมาณออกซิเจนที่ละลายลงสู่อาหารเหลวที่ใช้เลี้ยงเชื้อ อาหารเหลวที่มีปริมาณออกซิเจนละลายอยู่เพียงพอส่งผลให้ราจากระบบนิเวศทางทะเล สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคพืชเพิ่มขึ้น ซึ่งในกระบวนการหมักเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นสารปฏิชีวนะนั้น จุลินทรีย์ต้องการออกซิเจนในปริมาณสูง (Stanbury, Whitaker, & Hall, 1995) ส่วนใหญ่รามิกระบวนการหายใจแบบใช้ออกซิเจน ในเซลล์ร่าทั่วไปออกซิเจนทำหน้าที่ร่วมกับ oxidative enzymes ในกระบวนการ oxidation ของแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ โดยเฉพาะ glucose ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนหลัก (Walker & White, 2011) ทำให้เซลล์ได้รับพลังงาน ได้สารตั้งต้นเพื่อ

ใช้ในการสังเคราะห์สารปฐมภูมิ (Primary metabolite) ที่จำเป็นต่อการเจริญ รวมทั้งสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สารทุติยภูมิ (Secondary metabolite) (Stanbury et al., 1995) ดังเช่นสารที่สกัดได้ในการศึกษาครั้งนี้ มีรายงานว่าการละลายของออกซิเจนที่เหมาะสมในอาหารเหลวและอัตราการขนส่งออกซิเจนเข้าสู่เซลล์ นอกจากจะส่งผลต่อการเจริญแล้วยังส่งผลต่อการผลิตสารทุติยภูมิของราอีกด้วย (Garcia-Ochoa & Gomez, 2009) จากการสำรวจรายงานในกลุ่มของราทะเล ไม่พบการรายงานปริมาณออกซิเจนในอาหารเหลวที่เหมาะสมต่อการเจริญหรือการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ พบเพียงข้อมูลทั่วไปที่กล่าวถึงปริมาณที่เหมาะสมในกระบวนการหมัก ที่ส่งผลต่อการผลิตสารทุติยภูมิของจุลินทรีย์ในห้องปฏิบัติการ คือการเลี้ยงจุลินทรีย์ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250-500 มิลลิลิตรที่มีอาหารเหลวปริมาตร 50-100 มิลลิลิตร และบ่มด้วยเครื่องเขย่า (Stanbury et al., 1995) การขยายขนาดของการหมักจาก 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตรเป็น 200 มิลลิลิตร ในการศึกษาไม่ทำให้ความสามารถในการยับยั้งราก่อโรคพืชลดลงแต่พบการยับยั้งเพิ่มขึ้นเล็กน้อย เนื่องจากออกซิเจนเข้าไปละลายในอาหารเหลวที่ใช้เลี้ยงราได้มากขึ้น ดังนั้นการเพิ่มกำลังการผลิตในระดับอุตสาหกรรมจึงจำเป็นต้องคำนึงถึงปัจจัยสำคัญนี้ จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าราจากป่าชายเลนมีความเร็วรอบของการเขย่าที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 100-150 รอบ/นาที สอดคล้องกับความเร็วรอบที่เหมาะสมในการศึกษาอื่นๆที่มีรายงานอยู่ระหว่าง 100-150 รอบ/นาที เช่นกัน (Maria et al., 2005; Lin et al., 2005; Miao et al., 2006; Malpure, Shah, & Juvekar, 2006; Yang et al., 2007; Chen et al., 2008; Xiong et al., 2009; Jeon et al., 2013; Wijesekara et al., 2013) อย่างไรก็ตามมีรายงานส่วนน้อยที่แสดงผลการศึกษาของความเร็วยุบต่ำได้แก่ การศึกษาความเร็วในการเขย่าที่เหมาะสมของราในระบบนิเวศทางทะเล *Varicosporina ramulosa* ที่ 65 รอบ/นาที ส่งผลให้ราสายพันธุ์นี้ผลิตสารออกฤทธิ์บางชนิดสูงสุด (Mabrouk et al., 2008)

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้งราก่อโรคพืชของราจากป่าชายเลน ส่วนใหญ่อยู่ในช่วง 22-28 องศาเซลเซียส ราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 และราแอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830 ใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมเท่ากับ 25 องศาเซลเซียส สอดคล้องกับการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตสารยับยั้งแบคทีเรียของราจากระบบนิเวศทางทะเล *Arthrinium* c. f. *sacchaicola* ที่พบว่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ส่งผลให้ราสายพันธุ์นี้ผลิตสารยับยั้งแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงสุด (Miao et al., 2006) และที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เหมาะสมต่อการผลิต 3-methyl-N-(2-phenylethyl)-butanamide ในปริมาณสูงของราระบบนิเวศทางทะเล *Letendreaa helminthicola* (Yang et al., 2007) เมื่อเลี้ยงด้วยอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ยังส่งผลให้ราแอนโดไฟท์จากพืชบก *Fusarium* sp. DF2 ผลิตสารออกฤทธิ์ปริมาณสูงแตกต่างจากการบ่มราแอนโดไฟท์ที่อุณหภูมิอื่นๆ (Gogoi et al., 2008) ราทะเลสายพันธุ์ BUCS 004 และราแอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEM 834 ใช้อุณหภูมิที่เหมาะสม 28 องศาเซลเซียส ซึ่งจากการศึกษาของ Huang et al. (2011b) ที่ไม่ได้ทำการศึกษาผลของอุณหภูมิโดยตรง แต่ใช้อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ในการศึกษาผลของความเค็มที่เหมาะสมต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราทะเล จากผลการศึกษาที่

ได้ในครั้งนี้ราเอนโดไฟฟ้าจากพืชป่าชายเลนสายพันธุ์ BUEN 121 ใช้อุณหภูมิที่เหมาะสม 22 องศาเซลเซียส ก่อนข้างแตกต่างจากการศึกษาในราจากระบบนิเวศทางทะเลส่วนใหญ่ แต่สอดคล้องกับการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของราจากระบบนิเวศทางทะเล *Aspergillus ustus* MSF23 ที่รายงานว่าอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ส่งผลให้ราทะเลสายพันธุ์นี้ ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของราจากป่าชายเลน จากการศึกษาผลของอุณหภูมิ (15, 20, 25, 30, 35 และ 40 องศาเซลเซียส) ในการบ่มรา *P. variotii* ต่อการดำเนินกิจกรรมของกลุ่มเอนไซม์ย่อยเซลลูโลส พบกิจกรรมของเอนไซม์ดังกล่าวสูงเมื่อบ่มรา *P. variotii* ที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส และพบกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ส่วนอุณหภูมิ 15-20 องศาเซลเซียส ไม่พบกิจกรรมของกลุ่มเอนไซม์ย่อยเซลลูโลส (Hussaina et al., 2012)

ค่า MIC ของสารสกัดที่พบในการศึกษานี้ (1024 - >4096 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) นับว่าสูงพอสมควร เมื่อเทียบกับสารสกัดจากรานาเกลือ มีรายงานว่า ค่า MIC ในการยับยั้ง *C. gloeosporioides* DOAC 0782 ของสารสกัดจากรานาเกลือ อยู่ระหว่าง 512-≥2048 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (unpublished) อย่างไรก็ตามหากพิจารณาเฉพาะการยับยั้ง *C. gloeosporioides* DOAC 0782 ค่า MIC 1024 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับยา fluconazole แต่เนื่องจากการทดลองนี้ไม่ได้ทดสอบกับสารเคมี เช่น benomyl หรือ mancozep ที่เกษตรกรนิยมใช้มาเชื้อรา (Ambang et al., 2011; Bahraminejad, Abasi, & Fazlali, 2011) จึงยังบอกไม่ได้แน่ชัดถึงประสิทธิภาพที่แท้จริง ประกอบกับการที่ราที่ทดสอบไม่สร้างสปอร์หรือสร้างสปอร์ยาก ผู้วิจัยจึงคัดแปลงวิธีมาตรฐานที่ใช้สปอร์แขวนลอยในการทดสอบมาเป็นการใช้ชิ้นรูนที่มีสายใยราแทน ทำให้การเปรียบเทียบประสิทธิภาพกับงานวิจัยอื่น ซึ่งมีอยู่น้อยยากยิ่งขึ้น

5.3. สรุปและข้อเสนอแนะ

โดยสรุปจากการศึกษาพบว่าการผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคพืชของราทะเลทั้งที่อยู่ในรูปอิสระในดินจากและเอนโดไฟท์ในใบพืชชายเลน สามารถถูกกระตุ้นให้สร้างเพิ่มขึ้นและออกฤทธิ์เพิ่มขึ้นได้ โดยการเลี้ยงในอาหารเหลวที่สภาวะเหมาะสม ราทะเลทั้ง 2 ประเภทนี้ต้องการสารอาหารที่สมบูรณ์ และออกซิเจนเป็นสภาวะหลัก ส่วนสภาวะอื่นๆ เช่นความเค็ม ความเป็นกรด-ด่าง แตกต่างกันไปขึ้นกับสายพันธุ์ ดังนั้นการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตผลิตภัณฑ์ชีวภาพจากราสายพันธุ์ใหม่ๆ ก่อนจะนำไปใช้เพื่อการผลิตให้ได้สารออกฤทธิ์ปริมาณสูงๆ จึงเป็นขั้นตอนจำเป็น และหากสามารถลดต้นทุนการผลิตโดยใช้หางนมหรือกากน้ำตาลที่ราคาถูกกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อทางการค้าก็จะดียิ่งขึ้น

5.4. ผลผลิต

งานวิจัยนี้ได้ นักศึกษาด้านการศึกษาราทะเลและการนำไปใช้ประโยชน์เพิ่มขึ้น 1 คน

บรรณานุกรม

- Abd-Alla, M. A., El-Mohamedy, R. S. R., & Badeaa, R. J. (2006). Effect of some volatile compounds on black mold disease on onion bulbs during storage. *Agriculture and Biological Sciences*, 2, 384-390.
- Abdel-Wahab, A. M. (2005). Diversity of marine fungi from Egyptian Red Sea mangrove. *Botanica Marina*, 48, 348-355.
- Abdel-Wahab, A. M., Asolkar, R. N., Inderbizin, P., & Fenical, W. (2007). Secondary metabolite chemistry of the marine-derived fungus *Massarina* sp. strain CNT-016. *Phytochemistry*, 68, 1212-1218.
- Abu-Elteen, K. H., & Hamad, M. (2011). Antifungal agents for use in human therapy. In K. Kavanagh (Ed.), *Fungi Biology and Applications* (pp. 279-311). New Delhi: John Wiley & Sons.
- Adebola, M. O., & Amadi, J. E. (2010). Screening three *Aspergillus* species for antagonistic activities against the cocoa black pod organism (*Phytophthora palmivora*). *Agriculture and Biology Journal of North America*, 1, 362-365.
- Adrio, J. L., & Demain, A. L. (2003). Fungal biotechnology. *International Microbiology*, 6, 191-199.
- Ambang, Z., Ndongo, B., Essono, G., Ngoh, J. P., Kosma, P., Chewachong, G. M., & Asanga, A. (2011). Control of leaf spot disease caused by *Cercospora* sp. on groundnut (*Arachis hypogaea*) using methanolic extracts of yellow oleander (*Thevetia peruviana*) seeds. *Australian Journal of Crop Science*, 5, 227-232.
- Ananda, K., & Sridhar, K. R. (2002). Diversity of endophytic fungi in the roots of mangrove species on the west coast of India. *Canadian Journal of Microbiology*, 48, 871-878.
- Alias, S. A., Zainuddin, N., & Jones, E. B. G. (2010). Biodiversity of marine fungi in Malaysian mangroves. *Botanica Marina*, 53, 545-554.
- Arivudainambi, U. S., Anand, T. D., Shanmugaiah, V., Karunakaran, C., & Rajendran, A. (2011). Novel bioactive metabolites producing endophytic fungus *Colletotrichum gloeosporioides* against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 61, 340-345.

- Arora, D. S., & Chandra, P. (2010). Assay of antioxidant potential of two *Aspergillus* isolates by different methods under various physio-chemical conditions. *Brazilian Journal of Microbiology*, *41*, 765-777.
- Bahraminejad, S., Abbasi, S., & Fazlali, M. (2011). In vitro antifungal activity of 63 Iranian plant species against three different plant pathogenic fungi. *African Journal of Biotechnology*, *10*, 16193-16201,
- Banerjee, D. (2011). Endophytic fungal diversity in tropical and subtropical plants. *Microbiology*, *6*, 54-62.
- Banos, B. S., Lopez, M. H., Monola, E. B., & Wilson, C. L. (2003). Effect of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose level and quality of papaya fruit. *Crop Protection*, *22*, 1087-1092.
- Barata, M. (2006). Marine fungi from Mira River salt marsh in Portugal. *Revista Iberoamericana de Micologia*, *23*, 179-184.
- Bhakuni, D. S., & Rawat, D. S. (2005). *Bioactive marine natural products*. New Delhi: Anamaya.
- Bhimba, B. V., Franco, A. D., Jose, G. M., Mathew, J. M., & Joel, E. Y. (2011). Characterization of cytotoxic compound from mangrove derived fungi *Irpex hydnoides* VB4. *Tropical Biomedicine*, *1*, 223-226.
- Bhimba, B. V., Pushpam, A. C., Arumugam, P., & Prakash, S. (2012). Phthalate derivatives from the marine fungi *Phoma herbarum* VB 7. *International Journal of Biological and Pharmaceutical Research*, *3*, 507-512.
- Blakeman, J. P. (1978). Microbial competition for nutrients and germination of fungal spores. *Annals of Applied Biology*, *89*, 151–155.
- Blunt, J. W., Copp, B. R., Hu, W. P., Munro, M. H., Northcote, P. T., & Prinsep, M. R. (2008). Marine natural products. *Natural Products Report*, *25*, 35-94.
- Both, M., Csukai, M., Stumpf, M. P., & Spanu, P. D. (2005). Gene expression profiles of *Blumeria graminis* indicate dynamic changes to primary metabolism during development of an obligate biotrophic pathogen. *Plant Cell*, *17*, 2107-2122.
- Brent, K. J., & Hollomon, D. W. (2007). *Fungicide resistance in crop pathogen: How can it be managed* (2nd ed.). Brussels: FRAC Monograph.

- Buatong, J., Phongpaichit, S., Rukachaisirikul, V., & Sakayaroj, J. (2011). Antimicrobial activity of crude extracts from mangrove fungal endophytes. *Microbiology Biotechnology*, *27*, 3005-3008.
- Bugni, T. S., & Ireland, C. M. (2004). Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms. *Natural Product Reports*, *21*, 143-163.
- Burns, J. L., Saiman, L., Whittier, S., Larone, D., Krzewinski, J., Liu, Z., Marshall, S. A., & Jones, R. N. (2000). Comparison of agar diffusion methodologies for antimicrobial susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Clinical Microbiology*, *38*, 1818-1822.
- Cabrera, G. M., Roberti, M. J., Wright, J. E., & Seldes, A. M. (2002). Cryptoporic and isocryptoporic acids from the fungal cultures of *Polyporus arcularius* and *Polyporus ciliatus*. *Phytochemistry*, *61*, 89-93.
- Carlile, M. J., Watkinson, S. C., & Gooday, G. W. (2001). *The Fungi*. London: Academic Press.
- Carroll, G. (1988). Fungal endophytes in stem and leaves from latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology*, *69*, 2-9.
- Casas López, J. L., Sánchez Pérez, J. A., Fernández Sevilla, J. M., Acién Fernández, F. G., Molina Grima, E., & Chisti, Y. (2003). Production of lovastatin by *Aspergillus terreus*: effects of the C: N ratio and the principal nutrients on growth and metabolite production. *Enzyme and Microbial Technology*, *33*, 270-277.
- Celar, F. (2003). Competition for ammonium and nitrate forms of nitrogen between some phytopathogenic and antagonistic soil fungi. *Biological Control*, *28*, 19-24.
- Chantal, O., Claude, H., Jarmila, N., Jamshid, F., Floriane, L. H., & Claude, A. (2006). Colonization of tomato root by pathogenic and nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strains inoculated together and separately into the soil. *Applied and Environment Microbiology*, *72*, 1523 – 1531.
- Charudattan, R., Chandramohan, S., & Wyss, G. S. (2002). Biological Control. In W. B. Wheeler (Ed.), *Pesticides in Agriculture and the Environment* (pp. 25-58). New York: Marcel Dekker.
- Chen, G., Lin, Y., Wen, L., Vrijmoed, L. L. P., & Jones, E. B. G. (2003a). Two new metabolites of a marine endophytic fungus (No. 1893) from an estuarine mangrove on the south China sea coast. *Tetrahedron*, *59*, 4907-4909.

- Chen, L. Y., Price, T. V., & Park-Ng, Z. (2003b). Conidial dispersal by *Alternaria brassicae* on Chinese cabbage (*Brassica pekinensis*) in the field and under simulated conditions. *Plant Pathology*, *52*, 536-545.
- Chen, W., Zhao, Z., Chen, S. F., & Li, Y. Q. (2008). Optimization for the production of exopolysaccharide from *Fomes fomentarius* in submerged culture and its antitumor effect in vitro. *Bioresource Technology*, *99*, 3187-3197.
- Chen, Z. S., Pan, J. H., Tang, W. C., Chen, Q. J., & Lin, Y. C. (2009). Biodiversity and biotechnological potential of mangrove-associated fungi. *Forestry Research*, *20*, 63-72.
- Chinworrungsee, M., Kittakoop, P., Isaka, M., Rungrod, A., Tanticharoen, M., & Thebtaranonth, Y. (2001). Antimalarial Halorosellinic acid from the marine fungus *Halorosellinia oceanica*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, *11*, 1965-1969.
- Choma, I. M., & Grzelak, E. M. (2011). Bioautography detection in thin-layer chromatography. *Chromatography A*, *1218*, 2684-2691.
- Cribb, A. B., & Cribb, J. W. (1995). Marine fungi from Queens-land-II. *Botanica Marina*, *3*, 97-107.
- Daferner, M., Anke, T., & Sterner, O. (2002). Zopfiellamides A and B, antimicrobial pyrrolidinone derivatives from the marine fungus *Zopfiella latipes*. *Tetrahedron*, *58*, 7781 - 7784.
- Ding, G., Jiang, L. H., Guo, L. D., Chen, X. L., Zhang, H., & Che, Y. S. (2008). Pestalazines and pestalamides, bioactive metabolites from the plant pathogenic fungus *Pestalotiopsis theae*. *Natural Products*, *71*, 1861- 1865.
- Davidson, B. S. (1995). New dimensions in natural products research: cultured marine microorganism. *Current Opinion in Biotechnology*, *6*, 284-291.
- Davies, T. A., Kelly, L. M., Jacobs, M. R., & Appelbaum, P. C. (2000). Antipneumococcal activity of telithromycin by agar dilution, microdilution, E-test and disk diffusion. *Clinical Microbiology*, *38*, 1444-1448.
- Dickinson, M. (2003). *Molecular plant pathology*. New York: BIOS Scientific.
- Dita, M. A., Walwijk, C., Buddenhagen, I. W., Souza Jr, M. T., & Kema, G. H. J. (2010). A molecular diagnostic for tropical race 4 of the banana fusarium wilt pathogen. *Plant Pathology*, *59*, 348-357.
- Dobrestov, S., Dahm, H. U., & Qiu, P. Y. (2006). A review: inhibition of biofouling by marine microorganisms and their metabolites. *Biofouling*, *22*, 43-54.

- Donato, D. C., Kauffman, J. B., Murdiyarso, D., Kurnianto, S., Stidham, M., & Kanninen, M. (2011). Mangrove among the most carbon rich forest in the tropics. *Nature Geoscience*, *4*, 293–297.
- Duarte, K., Rocha-Santos, T. A. P., Freitas, A. C., & Duarte, A. C. (2012). Analytical techniques for discovery of bioactive compounds from marine fungi. *Trends in Analytical Chemistry*, *34*, 97-110.
- Elavarasi, A., Rathna, G. S., & Kalaiselvam, M. (2012). Taxol producing mangrove endophytic fungi *Fusarium oxysporum* from *Rhizophora annamalayana*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, *2*, 1081-1085.
- Elinberg, J., Enkegaard, A., Vestergaard, S., & Jensen, B. (2000). Biocontrol of pests on plant crops in Denmark: Present status and future potential. *Biocontrol Science and Technology*, *10*(6), 703-716.
- Espinoza, J. G., Briceño, E. X., Keith, L. M., & Latorre, B. A. (2008). Canker and twig dieback of blueberry cause by *Pestalotiopsis* spp. And a *Truncatella* sp. in Chile. *Plant Disease*, *92*, 1407-1414.
- Faulkner, D. J. (1994). Marine natural products. *Natural Product Reports*, *11*, 355–394.
- Faulkner, D. J. (2001). Marine natural products. *Natural Product Reports*, *18*, 1- 49.
- Fenical, W., & Jensen, P. R. (1993). Marine microorganisms: a new biomedical resource. In D. H. Attaway, & O. R. Zaborsky (Eds.), *Marine Biotechnology* (pp. 419-457). New York: Plenum Press.
- Freeman, S., Horowitz, S., & Sharon, A. (2001). Pathogenic and nonpathogenic lifestyles in *Colletotrichum acutatum* from strawberry and other plants. *Phytopathology*, *91*, 986-992.
- Freeman, S., Shalev, Z., & Katan, J. (2002). Survival in soil of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* pathogenic on strawberry. *Plant Disease*, *86*, 965-970.
- Frisvad, J. C., Andersen, B., & Thrane, U. (2008). The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi. *Mycological research*, *112*, 231-240.
- Gallo, M. L., Seldes, A. M., & Cabrera, G. M. (2004). Antibiotic long-chain and α , β - unsaturated aldehydes from the culture of the marine fungus *Cladosporium* sp. *Biochemical Systematics and Ecology*, *32*, 545-551.

- Gallardo, G. L., Butler, M., Gallo, M. L., Rodríguez, M. A., Eberlin, M. N., & Cabrera, G. M. (2006). Antimicrobial metabolites produced by an intertidal *Acremonium furcatum*. *Phytochemistry*, *67*, 2403-2410.
- Gao, P., Liu, Y. P., & Liu, S. G. (2004). Effects of dp-B on ATPase activity of insect plasma membrane. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *80*, 157-162.
- Gao, S. S., Li, X. M., Li, C. S., Proksch, P., & Wang, B. G. (2011). Penicisteroids A and B, antifungal and cytotoxic polyoxygenated steroids from the marine alga-derived endophytic fungus *Penicillium chrysogenum* QEN-24S. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, *21*, 2894-2897.
- Garcia-Ochoa, F., & Gomez, E. (2009). Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. *Biotechnology Advances*, *27*, 153-176.
- Georgiou, D. C., Patsoukis, N., Papapostolou, I., & Zervoudakis, G. (2006). Sclerotial metamorphosis in filamentous fungi is induced by oxidative stress. *Integrative and Comparative Biology*, *46*, 691-712.
- Giri, C., Ochieng, E., Tieszen, L. L., Zhu, Z., Singh, A., Loveland, T., Masek, J., & Duke, N. (2011). Status and distribution of mangrove forests of the world using earth observation satellite data. *Global Ecology and Biogeography*, *20*, 154-159.
- Gogoi, D. K., Boruah, H. P. D., Saikia, R., & Bora, T. C. (2008). Optimization of process parameters for improved production of bioactive metabolite by a novel endophytic fungus *Fusarium* sp. DF2 isolated from *Taxus wallichiana* of north east India. *Microbiology Biotechnology*, *24*, 79-87.
- Gopinath, K., Radhakrishnan, N. V., & Jayaraj, J. (2006). Effect of propiconazole and difenoconazole on the control of anthracnose of chili fruit caused by *Colletotrichum capsici*. *Crop Protection*, *25*, 1024-1031.
- Greve, H., Schupp, P. J., Eguereva, E., Kehraus, S., Kelter, G., Maier, A., Fiebig, H. H., & König, G. M. (2008). Apralactone A and a new stereochemical class of curvularins from the marine fungus *Curvularia* sp. *European Journal of Organic Chemistry*, *2008*, 5085-5092.

- Gupta, V. K., Pandey, A., Kumar, P., Pandey, B. K., Gaur, R. K., Bajpai, V., Sharma, N., & Sharma, S. (2010). Genetic characterization of mango anthracnose pathogen *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. by random amplified polymorphic DNA analysis. *African Journal of Biotechnology*, *9*, 4009-4013.
- Haject, A. E. (2004). *Natural enemies: An introduction to biological control*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Hawksworth, D. L. (2000). Fresh water and marine lichen-forming fungi. In K. D. Hyde, W. H. Ho, & S. B. Pointing (Eds.), *Aquatic mycology across the millennium Fungal Diversity*, *5*, 1-7.
- He, P., Chintamanani, S., Chen, Z., Zhu, L., Kunkel, B. N., Alfano, J. R., Tang, X., & Zhou, J. M. (2004). Activation of a COI1-dependent pathway in *Arabidopsis* by *Pseudomonas syringae* type III effectors and coronatine. *The Plant Journal*, *37*, 589-602.
- Huang, C. H., Pan, J. H., Chen, B., Yu, M., Haung, H. B., Zhu, X., Lu, Y. J., She, Z. G., & Lin, Y. C. (2011a). Three bianthraquinone derivatives from the mangrove endophytic fungus *Alternaria* sp. ZJ9-6B from the south China sea. *Marine Drugs*, *9*, 832-843.
- Huang, H., She, Z., Lin, Y., Vrijmoed, L. L. P., & Lin, W. (2007). Cyclic peptides from an endophytic fungus obtained from a mangrove leaf (*Kandelia candel*). *Natural Products*, *70*, 1696-1699.
- Huang, J., Lu, C., Qian, X., Huang, Y., Zheng, Z., & Shen, Y. (2011b). Effect of salinity on the growth, biological activity and secondary metabolites of some marine fungi. *Acta Oceanologica Sinica*, *30*, 118-123.
- Huang, Z., Cai, X., Sho, C., She, Z., Xia, X., Chen, Y., Yang, J., Zhou, S., & Lin, Y. (2008). Chemistry and weak antimicrobial activities of phomopsins produced by mangrove endophytic fungus *Phomopsis* sp. ZSU-H76. *Phytochemistry*, *69*, 1604-1608.
- Hussaina, A., Shrivastava, A., Jainb, S. K., Baghelc, R. K., Ranid, S. & Agrawale, M. K. (2012). Cellulolytic enzymatic activity of soft rot filamentous fungi *Paecilomyces variotii*. *Advances in Bioresearch*, *3*, 10 – 17.
- Hyde, K. D., & Alias, S. A. (2000). Biodiversity and distribution of fungi associated with decomposing *Nypa fruticans*. *Biodiversity and Conservation*, *9*, 393-402.
- Imhoff, J. F., Labes, A., & Wiese, J. (2011). Bio-mimicking the microbial treasures of the ocean: new natural products. *Biotechnology Advances*, *29*, 468-482.

- Isaka, M., Yangchum, A., Intamas, S., Kocharin, K., & Jones, E. B. G. (2009). Aigialomycins and related polyketide metabolites from the mangrove fungus *Aigialus parvus* BCC 5311. *Tetrahedron*, *65*, 4396-4403.
- Jabeen, N., Ahmed, N., Ghani, M. Y., & Sofi, P. A. (2009). Role of phenolic compound in instance to chili wilt. *Biometry and Crop Science*, *4*, 52-61.
- Jacobs, K., Holtzman, K., & Seifert, K. A. (2005). Morphology phylogeny and biology of *Gliocephalis hyaline*, a biotrophic contact mycoparasite of *Fusarium* species. *Mycologia*, *97*, 111-120.
- Jeffries, P. (1995). Biology and ecology of mycoparasitism. *Canadian Journal of Botany*, *73*, 1284-1290.
- Jeon, J., Julianti, E., Oha, H., Park, W., Oh, D. C., Oh, K. B., & Shin, J. (2013). Stereochemistry of hydroxy-bearing benzolactones: Isolation and structural determination of chrysoarticulins A–C from a marine-derived fungus *Chrysosporium articulatum*. *Tetrahedron Letters*, *54*, 3111-3115.
- Jin, H., Geng, Y. C., Yu, Z. Y., Tao, K., & Hou, T. P. (2009). Lead optimization and anti-plant pathogenic fungi activity of daphneolone analogues from *Stellera chamaejasme* L. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *93*, 133-137.
- Johnson, G., Cooke, T., & Mead, A. (1993). Infection and quiescence of mango stem-end rot pathogens. *Acta Horticulture*, *341*, 329-336.
- Jones, E. B. G., Pilantanapak, A., Chatmala, I., Sakayaroj, J., Phongpaichit, S., & Choeyklin, R. (2006). Thai marine fungal diversity. *Science and Technology*, *28*, 687-708.
- Jones, E. B. G., & Pang, K. L. (2012). Introduction marine fungi. In E. B. G. Jones, & K. L. (Eds.), *Marine fungi: And fungal-like organisms* (pp. 1-16). Berlin: Walter de Gruyter GmbH.
- Jones, E. B. G., Sakayaroj, J., Suetrong, S., Somrithipol, S., & Pang, K. L. (2009). Classification of marine Ascomycota, anamorphic taxa and Basidiomycota. *Fungal Diversity*, *35*, 1-203.
- Junji, N. (2006). Black spot on flowering cabbage caused by *Alternaria brassicicola* (Schwein.) Wiltshire in Japan. *Phytopathology*, *72*, 200-201.
- Kader, A. A. (2002). Postharvest technology of horticultural crops. *Agriculture and natural resources communications Services*. University of California, USA.

- Kansoh, A. L., Khattab, O. H., Abd-Elrazek, Z. M., & Motawea, H. M. (2010). Broad spectrum antimicrobial agent from a local isolate of marine fungus strain. *Applied Sciences Research*, 6, 580-588.
- Kathiresan, K., & Bingham, B. L. (2001). Biology of mangrove and mangrove ecosystem. *Advances in Marine Biology*, 40, 81-251.
- Keith, L. M., Velásquez, M. E., & Zee, F. T. (2006). Identification and characterization of *Pestalotiopsis* spp. causing scab disease of guava (*Psidium guajava*) in Hawaii. *Plant Disease*, 90, 16-23.
- Kemen, E., Kemen, A. C., Rafiqi, M., Hempel, U., Mendgen, K., Hahn, M., & Voegelé, R. T. (2005). Identification of a protein from rust fungi transferred from haustoria into infected plant cells. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18, 1130–1139.
- Kerzaon, I., Grovel, O., Pont, T. R. D., Pape, P. L., & Pouchus, Y. F. (2007). Effects of seawater on growth and gliotoxin excretion of marine strains of *Aspergillus fumigatus* Fres. *Toxicon*, 51, 398-405.
- Khewkhom, N., Shangchote, S., & Sangsiri, T. (2010). Infection of mangosteen (*Garcinia mangostana*) by fruit diseases in the east of Thailand. *Agricultural Science*, 41, 275-278.
- Klepzig, K. D., Moser, J. C., Lombardero, F. J., Hofstetter, R. W., & Ayres, M. P. (2001). Symbiosis and competition: complex interactions among beetles, fungi and mites. *Symbiosis*, 30, 83-96.
- Kiran, G. S., Hema, T. A., Gandhimathi, R., Selvin, J., Thomas, T. A., Ravji, T. R., & Natarajaseenivasan, K. (2009). Optimization and production of a biosurfactant from the sponge-associated marine fungus *Aspergillus ustus* MSF3. *Biointerfaces*, 73, 250-256.
- Köhl, J., & Wolf, J. V. D. (2005). *Alternaria brassicicola* and *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in organic seed production of Brassicaceae: epidemiology and seed infection. *Wageningen: Plant Research International*, 363, 1-27.
- Kohlmeyer, J. (1984). Tropical marine fungi. *P.S.Z.N.I. Marine Ecology* 5, 329-378.
- Kohlmeyer, J., Hawksworth, D. L., & Volkmann-Kohlmeyer, B. (2004). Observation on to marine and maritime “borderline” lichens: *Mastodia tessellate* and *Collempsidium pelvetiae*. *Mycological Progress*, 3, 51-56.
- Kohlmeyer, J., & Kohlmeyer, E. (1979). *Marine mycology-the higher fungi*. New York: Academic Press.

- Kosta, S., Jain, R., & Tiwari, A. (2008). Marine fungi: potential source of pharmacological compounds. *Pharmacologyonline*, *1*, 1-3.
- Kumar, M. S., Jana, S. K., Senthil, V., Shashanka, V., Kumar, S. V., & Sadhukhan, A. K. (2000). Repeated fed-batch process for improving lovastatin production. *Process Biochemistry*, *36*, 363-368.
- Kumaresan, V., & Suryanarayanan, T. S. (2001). Occurrence and distribution of endophytic fungi in a mangrove community. *Mycological Research*, *105*, 1388–1391.
- Kumaresan, V., & Suryanarayanan, T. S. (2002). Endophyte assemblages in young, mature and senescent leaves of *Rhizophora apiculata*: evidence for the role of endophytes in mangrove litter degradation. *Fungal Diversity*, *9*, 81-91.
- Li, H. J., Lan, W. J., Lam, C. K., Yang, F., & Zhu, X. F. (2011). Hirsutane sesquiterpenoids from the marine-derived fungus *Chondrostereum* sp. *Chemistry and Biodiversity*, *8*, 317-324.
- Li, W. C., Zhou, J., Guo, S. Y., & Guo, L. D. (2007). Endophytic fungi associated with lichens in Baihua mountain of Beijing, China. *Fungal Diversity*, *25*, 69-80.
- Lin, X., Haung, Y., Fang, M., Wang, J., Zheng, Z., & Su, W. (2005). Cytotoxic and antimicrobial metabolites from marine Lignicolous fungi, *Diaporthe* sp. *FEMS Microbiology letters*, *251*, 53-58.
- Lin, Y., Wu, X., Deng, Z., Wang, J., Zhou, S., Vrijmoed, L. L. P., & Jones, E. B. G. (2002). The metabolites of the fungus *Verruculina enalia* No. 2606 from a salt lake in the Bahamas. *Phytochemistry*, *59*, 469-471.
- Lin, Y., Wu, X., Feng, S., Jiang, G., Luo, J., Zhou, S., Vrijmoed, L. L. P., Jones, E. B. G., Krohn, K., Steingrover, K., & Zsila, F. (2001). Five unique compounds: Xyloketal from mangrove fungus *Xylaria* sp. from the South China Sea coast. *Organic Chemistry*, *66*, 6252-6256.
- Lin, Z., Zhu, T., Fang, Y., & Gu, Q. (2008a). ¹H ¹³C NMR assignments of two new indolic enamide diastereomers from a mangrove endophytic fungus *Aspergillus* sp. *Magnetic Resonance in Chemistry*, *46*, 1212-1216.
- Lin, Z., Zhu, T., Fang, Y., Gu, Q., & Zhu, W. (2008b). Polyketides from *Penicillium* sp. JP-1 an endophytic fungus associated with the mangrove plant *Aegiceras corniculatum*. *Phytochemistry*, *69*, 1273-1278.

- Liu, Y., Tortora, G., Ryan, M. R., Lee, H. M., & Goulb, L. M. (2002). Potato dextrose agar antifungal susceptibility testing for yeast and mold: evaluation of phosphate effect on antifungal activity of CMT-3. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy*, *46*, 1455-1461.
- Liu, J. Y., Huang, L. L., Ye, Y. H., Zou, W. X., Guo, Z. J., & Tan, R. X. (2006). Antifungal and new metabolites of *Myrothecium* sp. Z16, a fungus associated with white croaker *Argyrosomus argentatus*. *Applied Microbiology*, *100*, 195-202.
- Liu, D., Li, X. M., Meng, L., Li, C. S., Gao, S. S., Shang, Z., Proksch, P., Huang, C. G., & Wang, B. G. (2011). Nigerapyrones A-H, α -pyrone derivatives from the marine mangrove-derived endophytic fungus *Aspergillus niger* MA-132. *Natural Products*, *74*, 1787-1791.
- Liu, H., Lei, X. L., & Li, N. (2013). Highly regioselective synthesis of betulone from betulin by growing cultures of marine fungus *Dothideomycete* sp. HQ 316564. *Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *88*, 32-35.
- Mabrouk, A. M., Kheiralla, Z. H., Hamed, E. R., Youssry, A. A., & Aty, A. E. (2008). Production of some biologically active secondary metabolites from marine-derived fungus *Varicosporina ramulosa*. *Malaysian Journal of Microbiology*, *4*, 14-24.
- Macintosh, D. J., & Ashton, E. C. (2002). A review of mangrove biodiversity conservation and management. *Center of tropical ecosystem research*, University of Aarhus, Denmark.
- MacKinnon, S. L., Keifer, P., & William, A. A. (1999). Components from the phytotoxic extracts of *Alternaria brassicicola*, a black spot pathogen of canola. *Phytochemistry*, *51*, 215-221.
- Malpure, P. P., Shah, A. S., & Juvekar, A. R. (2006). Antioxidant and anti-inflammatory activity of extract obtained from *Aspergillus candidus* MTCC 2202 broth filtrate. *Indian Journal of Experimental Biology*, *44*, 468-473.
- Maria, G. L., Sridhar, K. R., & Raviraja, N. S. (2005). Antimicrobial and enzyme activity of mangrove endophytic fungi of southwest coast of India. *Agricultural Technology*, *1*, 67-80.
- Masuma, R., Yamaguchi, Y., Noumi, M., Omura, S., & Michio, N. (2001). Effect of seawater concentration on hyphal growth and antimicrobial metabolite production in marine fungi. *Mycoscience*, *42*, 455-459.
- Miao, L., Kwong, T. F. N., & Qian, P. Y. (2006). Effect of culture conditions on mycelial growth, antibacterial activity, and metabolite profiles of the marine-derived fungus. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *72*, 1063-1073.

- Mishra, B. K., Mishra, R. K., Mishra, R. C., Tiwari, A. K., Yadav, R. S., & Dikshit, A. (2011). Biocontrol efficacy of *Trichoderma viride* isolates against fungal plant pathogen causing disease in *Vigna radiata* L. *Applied Science Research*, 3, 361-369.
- Molinski, T. F., Dalisay, D. S., Lievens, S. L., & Saludes, J. P. (2009). Drug development from marine natural products. *Nature Reviews Drug Discovery*, 8, 69-85.
- Mondali, N. K., Mojumdar, A., Chatterje, S. K., Banerjee, A., Datta, J. K., & Gupta, S. (2009). Antifungal activities and chemical characterization of Neem leaf extracts on the growth of some selected fungal species in vitro culture medium. *Applied Sciences and Environmental Management*, 13, 49-53.
- Motti, C. A., Bourne, D. G., Burnell, J. N., Doyle, J. R., Haines, D. S., Liptrot, C. H., Llewellyn, L. E., Ludke, S., Muirhead, A., & Tapiolas, D. M. (2007). Screening marine fungi for inhibitors of the C₃ plant enzyme pyruvate phosphate dikinase: unguinol as a potential novel herbicide candidate. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 1921-1927.
- Muto, M., Takahashi, H., Ishihara, K., Yuasa, H., & Haung, J. W. (2005). Control of black leaf spot (*Alternaria brassicicola*) of crucifers by extracts of black nightshade (*Solanum nigrum*). *Plant Pathology Bulletin*, 14, 25-34.
- Olivian, C., Humbert, C., Nahalkova, J., Fatehi, J., Haridon, F. L., & Alabouvette, C. (2006). Colonization of tomato root by pathogenic and nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strain inoculated together and separately into the soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 1523-1531.
- Omokolo, N. D., Nankeu, D. J., Niemenak, N., & Boudjeko, T. (2003). Variation of β -1, 3-glucanase, chitinase and polyphenoloxidase activities on cacao pods upon *Phytophthora megakarya* inoculation. *African Crop Science*, 11, 97-106.
- Otvos, L., & Cudic, M. (2007). Broth Microdilution antibacterial assays of peptides. In G. Fields (Ed.), *Peptide Characterisation and Application Protocols, Methods in Molecular Biology* (pp. 309-346). New Jersey: Human Press.
- Pal, K. K., & Gardener, B. M. (2006). Biological control of plant pathogens. *The Plant Health Instructor*, 1-25.
- Park, C., Paulitz, T. C., & Baker, R. (1987). Biocontrol of Fusarium wilt of cucumber resulting from interactions between *Pseudomonas putida* and nonpathogenic isolates of *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology*, 78, 190-194.

- Park, J. H., Park, J. H., Choi, G. J., Lee, S. W., Jang, K. S., Choi, Y. H., Cho, K. Y., & Kim, J. C. (2003). Screening for antifungal endophytic fungi against six plant pathogenic fungi. *Mycobiology*, *31*, 179-182.
- Photital, W., Lumyong, S., Lumyong, P., McKenzie, E. H. C., & Hyde, K. D. (2004). Are some endophytes of *Musa acuminata* latent pathogens? *Fungal Diversity*, *16*, 131-140.
- Pilantanapak, A., Jones, E. B. G., & Eaton, E. A. (2005). Marine fungi on *Nypa fruticans* in Thailand. *Botanica Marina*, *48*, 1-9.
- Pillay, V., Polya, G. M., & Spangenberg, G. C. (2011). Optimisation of an in vitro antifungal protein assay for the screening of potential antifungal proteins against *Leptosphaeria maculans*. *Microbiological Methods*, *84*, 121-127.
- Prapagdee, B., Kuekulvong, C., & Mongkolsuk, S. (2008). Antifungal potential of extracellular metabolites produced by *Streptomyces hygroscopicus* against phytopathogenic fungi. *Biological Sciences*, *4*, 330-337.
- Rasooli, I., & Abyaneh, M. R. (2004). Inhibition effects of Thyme oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Food Control*, *15*, 479-483.
- Renner, M. K., Jensen, P. R., & Fenical, W. (1998). Neomangicols: structures and absolute stereochemistries of unprecedented halogenated sesterterpenes from a marine fungus of the genus *Fusarium*. *Organic Chemistry*, *63*, 8346-8354.
- Rodrigues, A. P., Carvalho, A. S., Santos, Alves, C. N., do Nascimento, J. L., & Silva, E. O. (2011). Kojic acid, a secondary metabolite from *Aspergillus* sp., acts as an inducer of macrophage activation. *Cell Biology International*, *35*, 335-343.
- Rohlfs, M., & Churchill, A. C. (2011). Fungal secondary metabolites as modulators of interactions with insects and other arthropods. *Fungal Genetics and Biology*, *48*, 23-34.
- Rossmann, A. Y., & Palm, M. E. (2008). Systematics of plant pathogenic fungi: why it matters. *Plant Disease*, *92*, 1376-1386.
- Rowe, R. C. (1980). Comparative pathogenicity and host ranges of *Fusarium oxysporum* isolates causing crown and root rot of greenhouse and field-grown tomatoes in North America and Japan. *Phytopathology*, *70*, 1143-1148.

- Rubini, M. R., Rute, T. S. R., Pomella, A.W., Cristina, S. M., Arajo, L. W., Santos, D. R. D., & Azevedo, J. L. (2005). Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Thebroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso* causal agent of Witches' Broom disease. *Biological Sciences*, 1, 24-33.
- Rukachaisirikul, V., Rodglin, A., Phongpaichit, S., Buatong, J., & Sakayaroj, J. (2011). α - Pyrone and seiricuprolide derivatives from the mangrove -derived fungi *Pestalotiopsis* spp. PSU-MA92 and PSU-MA119. *Phytochemistry Letters*, 5, 13-17.
- Rungjindamai, N., Pinruan, U., Choeyklin, R., Hattori, T., & Jones, E. B. G. (2008). Molecular characterization of basidiomycetous endophytes isolated from leaves, rachis and petioles of the oil palm, *Elaeis guineensis*, in Thailand. *Fungal Diversity*, 33, 139-161.
- Russell, P. E. (2005). A century of fungicide evolution. *Agricultural Science*, 143, 11-25.
- Sakayaroj, J., Jones, E. B. G., Chatmala, I., & Phongpaichit, S. (2004). Marine fungi. In E. B. G. Jones, M. Tanticharoen, & K. D. Hyde (Eds.), *Thai Fungal Diversity* (pp. 107-117). Thailand: BIOTEC.
- Sakayaroj, J., Supaphon, O., Jones, E. B. G., & Phongpaichit, S. (2011). Diversity of higher marine fungi at Hat Khanom-Ko Thale Tai Nation Park, Southern Thailand. *Songklanakarin Journals Scien Technology*, 33, 15-22.
- Sangeetha, C. G., & Rawal, R. D. (2008). Nutrition studies of *Collectotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. and Sacc. The incitant of mango anthracnose. *Agricultural Sciences*, 4, 717-720.
- Schilingmann, G., Milne, L., Williams, D. R., & Carter, G. T. (1998). Cell wall active antifungal compounds produced by the marine fungus *Hypoxylon oceanicum* LL-15G256. II. Isolation and structure determination. *Antibiotics*, 51, 303-316.
- Schmit, J. P., & Shearer, C. A. (2003). A checklist of mangrove-associated fungi, their geography and know host plants. *Mycotoxin*, 80, 423-477.
- Seo, C., Sohn, J. H., Oh, H., Kim, B. Y., & Ahn, J. S. (2009). Isolation of the protein tyrosine phosphatase 1B inhibitory metabolite from the marine-derived fungus *Cosmospora* sp. SF-5060. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 19, 6095-6097.
- Sharma, R. R., Singh, D., & Singh, R. (2009). Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biological Control*, 50, 205-221.

- Shearer, C. A., Descals, E., Kohlmeyer, B., Kohlmeyer, J., Marvanova, L., Padgett, D., Porter, D., Raja, H. A., Schmit, J. P., Thorton, H. A., & Voglymayr, H. (2007). Fungal diversity in aquatic habitats. *Biodiversity and Conservation*, *16*, 149-167.
- Shresta, S. K., Mathur, S. B., & Munk, L. (2000). *Alternaria brassicae* in seeds of rapeseed and mustard, its location, transmission from seed to seedlings and control. *Science and Technology*, *28*, 75-84.
- Shu, C. H., & Lung, M. Y. (2004). Effect of pH on the production and molecular weight distribution of exopolysaccharide by *Antrodia camphorata* in batch cultures. *Process Biochem* *39*, 931–937.
- Singh, C. J. (2003). Optimization of an extracellular protease of *Chrysosporium keratinophilum* and its potential in bioremediation of keratinic wastes. *Mycopathologia*, *156*, 151-156.
- Sridhar, K. R. (2004). Mangrove fungi in India. *Current Science*, *86*, 1586-1587.
- Srinon, W., Chuncheen, K., Jirattiwatukul, K., Soyong, K., & Kanokmedhakul, S. (2006). Efficacies of antagonistic fungi against Fusarium wilt disease of cucumber and tomato and the assay of its enzyme activity. *Agricultural Technology*, *2*, 191-201.
- Stanbury, P. F., Whitaker, A., & Hall, S. J. (1995). *Principles of fermentation technology* (2nd ed.). Oxford: Elsevier Science.
- Steinkellner, S., Mhammerler, R., & Vierheilig, H. (2005). Microconidia germination of the tomato pathogen *Fusarium oxysporum* in the presence of root exudates. *Plant Interactions*, *1*, 23-30.
- Stone, J. K., Bacon, C. W., & White, J. F. (2000). An overview of endophytic microbes endophytism defined. In C. W. Bacon, & J. F. White (Eds.), *Microbial endophytes* (pp. 3-29). New York: Marcel Dekker.
- Strange, R. N. (2003). *Introduction to Plant Pathology*. New York: John Wiley & Sons.
- Strobel, G. A., & Long, D. M. (1998). Endophytic microbes embody pharmaceutical potential. *ASM News*, *64*, 263-268.
- Subramani, R., Kumar, R., Prasad, P., William, A., & Retheesh, S. T. (2013). Cytotoxic and antibacterial substances against multi-drug resistant pathogens from marine sponge symbiont: Citrinin, a secondary metabolite of *Penicillium* sp. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, *3*, 291-296.

- Sun, H. H., Mao, W. J., Chen, Y., Guo, S. D., Li, H. Y., Qi, X. H., Chen, Y. L., & Xu, J. (2009a). Isolation, chemical characteristics and antioxidant properties of the polysaccharides from marine fungus *Penicillium* sp. F23-2. *Carbohydrate Polymers*, 78, 117-124.
- Suryanarayanan, T. S., Venkatachalam, A., Thirunavukkarasu, N., Ravishankar, J. P., Doble, M., & Geetha, V. (2010). Internal mycobiota of marine macro algae from the Tamilnadu coast: distribution, diversity and biotechnological potential. *Botanica Marina*, 53, 457-468.
- Suryanto, D., Potonah, S., & Munir, E. (2010). Control of fusarium wilt of chili with chitinolytic bacteria. *Biosciences*, 17, 5-8.
- Takken, F., & Rep, M. (2010). The arms race between tomato and *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant Pathology*, 11, 309-314.
- Tanaka, M., Yoshimura, M., Suto, M., Yokota, A., Asano, K., Sukara, E., & Tomita, F. (2002). Production of lepidimoide by an endophytic fungus from polysaccharide extracted from *Abelmoschus* sp.: Identification of the product and the organism producing it. *Bioscience and Bioengineering*, 93, 531-536.
- Tarman, K., Lindequist, U., Wende, K., Porzel, A., Arnold, N., & Wessjohann, L. A. (2011). Isolation of a new natural product and cytotoxic and antimicrobial activities of extracts from fungi of Indonesian marine habitats. *Marine Drugs*, 9, 294-306.
- Tarman, K., Palm, G. J., Porzel, A., Merzweiler, K., Arnold, N., Wessjohann, L. A., Unterseher, M., & Lindequist, U. (2012). Helicascolide C, a new lactone from an Indonesian marine algicolous strain of *Daldinia eschscholzii* (Xylariaceae, Ascomycota). *Phytochemistry Letters*, 5, 83-86.
- Than, P. P., Jeewon, R., Hyde, K. D., Pongsupasamit, S., Mongkolporn, O., & Taylor, P. W. J. (2008). Characterization and pathogenicity of *Colletotrichum* species associated with anthracnose on chili (*Capsicum* spp.) in Thailand. *Plant Pathology*, 57, 562-572.
- Trisuwan, K., Rukachaisirikul, V., Sukpondma, Y., Phongpaichit, S., Preedanon, S., & Sakayaroj, J. (2009). Lactone derivatives from the marine-derived fungus *Penicillium* sp. PSU-F44. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 57, 1100-1102.
- Tsui, C. K. M., & Hyde, K. D. (2004). Biodiversity of fungi on submerged wood in a stream and estuary in the Tai Ho Bay, Hong Kong. *Fungal Diversity*, 15, 205-220.
- Uchaida, J. Y. (2004). *Pestalotiosis* sp. In M. L. Elliott, T. K. Broschat, T. Y. Uchaida, & G. W. Simone (Eds.), *Disease and disorders of ornamental palms* (pp. 27-28). St. Paul: American Phytopathological Society.

- U'Ren, J. M., Lutzoni, F., Miadlikowska, J., & Arnold, A. E. (2010). Community analysis reveals close affinities between endophytic and endolichenic fungi in mosses and lichens. *Microbial Ecology*, *60*, 340–353.
- Vrijmoed, L. L. P. (2000). Isolation and culture of higher filamentous fungi. In K. D. Hyde, & S. B. Pointing (Eds.), *Marine mycology a practical approach* (pp. 1-20). Hong Kong: Fungal Diversity Press.
- Walker, G. M., & White, N. A. (2011). Introduction to Fungal Physiology. In K. Kavanagh (Ed.), *Fungi: Biology and Application* (pp. 1-34). New Delhi: John Wiley & Sons.
- Wegulo, S. N., Zwingman, M. V., Breathnach, J. A., & Baenziger, S. P. (2011). Economic returns from fungicide application to control foliar fungal diseases in winter wheat. *Crop Protection*, *30*, 685-692.
- Wen, L., Cai, X., She, Xu, F., Chan, W. L., Vrijmoed, L. L. P., Jones, E. B. G., & Lin, Y. (2009). Three metabolite from the mangrove endophytic fungus *Sporothrix* sp. (#4335) from the south China sea. *Organic Chemistry*, *74*, 1093-1098.
- Wijesekara, I., Li, Y. X., Vo, T. S., Ta, Q. V., Ngo, D. H., & Kim, S. K. (2013). Induction of apoptosis in human cervical carcinoma hela cells by neoechinulin A from marine-derived fungus *Microsporium* sp. *Process Biochemistry*, *48*, 68-72.
- Wixom, R. L., & Gehrke, C. W. (2010). *Chromatography: A science of discovery*. Canada: John Wiley & Sons.
- Wu, Z. J., Ouyang, M. A., & Tan, Q. W. (2009). New asperxanthone and asperbiphenyl from the marine fungus *Aspergillus* sp. *Pest Management Science*, *65*, 60–65.
- Xia, L., & Ng, T. B. (2005). An antifungal protein from flageolet beans. *Peptides*, *26*, 2397-2403.
- Xiao, Y. T., Zheng, Z. H., Huang, Y. J., Xu, Q. Y., Su, W. J., & Song, S. Y. (2005). Nematicidal and brine shrimp lethality of secondary metabolites from marine-derived fungi. *Journal of Xiamen University (Nature Science)*, *44*, 847-850.
- Xiong, H., Turunen, O., Pastinen, O., Letsola, M., & Weymarn, N. (2004). Improved xylanase production by *Trichoderma reesei* Rut C-30 grown on L-arabinose-rich plant hydrolysates. *Bioresource Technology*, *96*, 753-759.
- Xiong, H., Qi, S., Xu, Y., Miao, L., & Qian, P. Y. (2009). Antibiotic and antifouling compound production by the marine derived fungus *Cladosporium* sp. F14. *Hydro-Environment Research*, *2*, 264-270.

- Xu, J., Aly, A. H., Wray, V., & Proksch, P. (2011). Polyketide derivatives of endophytic fungus *Pestalotiopsis* sp. Isolated from the Chinese mangrove plant *Rhizophora mucronata*. *Tetrahedron Letters*, *52*, 21-25.
- Xu, J., Kjer, J., Sendker, J., Wray, V., Guan, V., Edrada, R. A., Lin, W., Wu, J., & Proksch, P. (2009a). Chromones from the endophytic fungus *Pestalotiopsis* sp. isolated from the Chinese mangrove plant *Rhizophora mucronata*. *Natural Products*, *72*, 662-665.
- Xu, J., Kjer, J., Sendker, J., Wray, V., Guan, V., Edrada, R. A., Werner, E. G., Bayer, M., Lin, W., Wu, J., & Proksch, P. (2009b). Cytosporones, coumarins, and an alkaloid from the endophytic fungus *Pestalotiopsis* sp. Isolated from the Chinese mangrove plant *Rhizophora mucronata*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, *17*, 7362-7267.
- Xu, J., Lin, Q., Wang, B., Wray, V., Lin, W. H., & Proksch, P. (2011). Pestalotiopamide E, a new amide from the endophytic fungus *Pestalotiopsis* sp. *Natural Products Research*, *13*, 373-376.
- Yang, L. H., Miao, L., Lee, O. O., Li, X., Xiong, H., Pang, K. L., Vrijmoed, L., & Qian, P. Y. (2007). Effect of culture conditions on antifouling compound production of a sponge-associated fungus. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *74*, 1221-1231.
- Yang, L. S., Yaojian, Y. L. H., Hui, Z. Z., Yang, S. S., Wenjin, S., & Mao, S. Y. (2006b) The population fluctuation and biodiversity of endophytic fungi from mangrove plants in different seasons. *Journal of Xiamen University (Natural Science)*, *45*, 95-99.
- Yan, H. J., Gao, S. S., Li, C. S., Li, X. M., & Wang, B. G. (2010). Chemical constituents of a marine derived endophytic fungus *Penicillium commune* G2M. *Molecules*, *15*, 3270-3275.
- Ye, X., & Ng, T. B. (2005). A chitinase with antifungal activity from the mung bean. *Protein Expression and Purification*, *40*, 230-236.
- Yoshida, Y., Sano, R., Wada, T., Takabayashi, J., & Okada, K. (2009). Jasmonic acid control of GLABRA3 links inducible defense and trichome patterning in *Arabidopsis*. *Development*, *136*, 1039-1048.
- Yu, C., Cai, M., Kang, L., Zhang, Y., & Zhou, X. (2012). Significance of seed culture methods on mycelial morphology and production of a novel anti-cancer anthraquinone by marine mangrove endophytic fungus *Halorosellinia* sp. (No. 1403). *Process Biochemistry*, *47*, 422-427.

- Yu, J. H., & Keller, N. (2005). Regulation of secondary metabolism in filamentous fungi. *Annual Reviews Phytopathology*, *43*, 437-458.
- Zainuddin, N., Alias, S. A., Lee, C. W., Ebel, R., Othman, N. A., Mukhtar, M. R., & Awang, K. (2010). Antimicrobial activities of marine fungi from Malaysia. *Botanica Marina*, *53*, 507-513.
- Zhang, G., Sun, S., Zhu, T., Lin, Z., Gu, J., Li, D., & Gu, Q. (2011). Antiviral isoindolone derivatives from an endophytic fungus *Emericella* sp. Associated with *Aegiceras corniculatum*. *Phytochemistry*, *72*, 1436-1442.
- Zhang, J. Y., Tao, L. Y., Liang, Y. J., Chen, L. M., Mi, Y. J., Zheng, L. S., Wang, F., She, Z. G., Lin, Y. C., To, K. K., & Fu, L. W. (2010). Anthracenedione derivatives as anticancer agents isolated from secondary metabolites of the mangrove endophytic fungi. *Marine Drugs*, *8*, 1469-1481.
- Zhang, M., Wang, W. L., Fang, Y. C., Zhu, T. J., Gu, Q. Q., & Zhu, W. M. (2008b). Cytotoxic alkaloids and antibiotic nordammarane triterpenoids from the marine-derived fungus *Aspergillus sydowi*. *Natural Products*, *71*, 985-989.
- Zhang, S. Y., Li, Z. L., Bai, J., Wang, Y., Zhang, L. M., Wu, X., & Hua, H. M. (2012). A new perylenequinone from a halotolerant fungus, *Alternaria* sp. M6. *Chinese Journal of Natural Medicines*, *10*, 68-71.
- Zhu, F., & Lin, Y. (2006). Marinamide, a novel alkaloid and its methyl ester produced by the application of mixed fermentation technique to two mangrove endophytic fungi from the South China sea. *Chinese Science Bulletin*, *51*, 1426-1430.

ภาคผนวก

สารเคมีและยาปฏิชีวนะ

1. การเตรียมสารยา fluconazole ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

ชั่งยา fluconazole ชนิดผง 40.96 มิลลิกรัม ละลายยาใน 100% DMSO ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จะได้ยา fluconazole ความเข้มข้น 40.96 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ใน 100% DMSO เป็นความเข้มข้นสำหรับการใช้งาน (working stock) และเจือจางต่อด้วยอาหารทดสอบ (PDA) ด้วยอัตราส่วน 1 : 10 ในจานเพาะเชื้อ 24 หลุม ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จะได้อาหารทดสอบที่มีความเข้มข้นของยา 4096 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (หลุมที่ 1) คู่ออาหารหลุมที่ 1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ถ่ายลงหลุมที่ 2 และเจือจางด้วยอาหารทดสอบในอัตราส่วน 1 : 1 ทำให้ได้อาหารทดสอบที่มีความเข้มข้นของยา 4096 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เจือจางด้วยอาหารทดสอบในอัตราส่วน 1 : 1 ในหลุมถัดไปเรื่อย ๆ และให้อาหารทดสอบหลุมสุดท้ายมีความเข้มข้นเท่ากับ 32 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

2. การเตรียมสารสกัดที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

น้ำหนักของสารสกัดที่ได้จากการขยายขนาดการหมักราทะเล BUSK 055-1 และราเอนโดไฟท์จากพืชป่าชายเลน BUEN 830 ในอาหารเหลวปริมาตร 1 ลิตร พบน้ำหนักสารสกัดเท่ากับ 274.20 และ 235.50 มิลลิลิตร ตามลำดับ เนื่องจากสารสกัดที่ได้ค่อนข้างเหนียว ยากต่อการแบ่งเพื่อชั่งน้ำหนักในปริมาณน้อย จำเป็นต้องละลายสารทั้งหมดใน 100% DMSO ปริมาตร 4 มิลลิลิตร (เป็นปริมาตรต่ำสุดที่ละลายสารสกัดให้เป็นเนื้อเดียวกัน) จะได้สารสกัดราทะเล BUSK 055-1 และราเอนโดไฟท์จากพืชป่าชายเลน BUEN 830 ในตัวทำละลาย 100% DMSO ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้น (Stock solution) 68.550 และ 58.875 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นเจือจางสารสกัดให้มีความเข้มข้นสำหรับการใช้งาน (working stock) ใน 100% DMSO ให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 40.96 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (ความเข้มข้นสำหรับการใช้งานเป็น 10 เท่า ของค่าความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้หาค่า MIC) โดยใช้สมการ $C1V1 = C2V2$ และเจือจางต่อด้วยอาหารทดสอบ (PDA/DW) ด้วยอัตราส่วน 1:10 ในจานเพาะเชื้อ 24 หลุม ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จะได้อาหารทดสอบที่มีความเข้มข้นของสารสกัด 4096 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เจือจางด้วยอาหารทดสอบในอัตราส่วน 1:1 ในหลุมถัดไปเรื่อย ๆ และให้อาหารทดสอบสุดท้ายมีความเข้มข้นเท่ากับ 32 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร