



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งของราทะเลและราเอนโดไฟท์จากพืชป่าชายเลน

ที่มีต่อราสาเหตุโรคพืช

**Study on Inhibitory Activity of Marine and Endophytic Fungi
from Mangrove Plants against Fungal Phytopathogens**

ดร. อภิรดี ปิณฑนภาคย์

เมษายน 2554

สัญญาเลขที่ MRG5280096

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งของราทะเลและราเอนโดไฟท์จากพืชป่าชายเลน

ที่มีต่อราสาเหตุโรคพืช

**Study on Inhibitory Activity of Marine and Endophytic Fungi
from Mangrove Plants against Fungal Phytopathogens**

ดร. อภิรดี ปลั่งชนภาคย์

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ง
สารบัญภาพ	จ
สารบัญตาราง	ช
บทที่ 1 บทนำ.....	1
บทที่ 2 รายงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
ป่าชายเลนและพืชชายเลน.....	4
ราทะเล.....	5
ราเอนโดไฟท์.....	6
ราโรคพืช.....	7
สารออกฤทธิ์ชีวภาพจากราและสารยับยั้งรา.....	8
การศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างราทดสอบกับราโรคพืชและการยับยั้งราโรคพืช.....	15
การควบคุมโรคพืชที่มีสาเหตุจากรา.....	15
บทที่ 3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง.....	17
บทที่ 4 ผลการทดลองราทะเล	25
บทที่ 5 ผลการทดลองราเอนโดไฟท์.....	78
บทที่ 6 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง	105
เอกสารอ้างอิง	110
ภาคผนวก	122

บทคัดย่อ

ได้ศึกษาราทะเล (marine derived fungi) จากไม้ที่เก็บจากป่าชายเลน 65 สายพันธุ์ และศึกษาราเอนโดไฟท์จากใบพืชชายเลน 36 สายพันธุ์ ในการยับยั้งราโรคพืช 5 ชนิด คือ *Colletotrichum capsici* DoAC 1511, *C. gloeosporioides* DoAC 0782, *Fusarium oxysporum* DoAC 1808, *F. subglutinans* DoAC 0761 และ *Pestalotiopsis* sp. DoAC 1098 และพิจารณาระดับ antibiosis (การยับยั้งการเจริญของราโรคพืชโดยราทดสอบ) ใน dual culture บนอาหารชนิดต่างๆ พบราทะเลจากไม้ร้อยละ 96.9 ยับยั้งราโรคพืชได้น้อย 1 ชนิด และร้อยละ 41.5 สามารถยับยั้งราโรคพืชทั้ง 5 ชนิด ขณะที่จำนวนราเอนโดไฟท์ที่ยับยั้งราโรคพืชได้น้อย 1 ชนิดและยับยั้งราโรคพืชทั้ง 5 ชนิด เท่ากับร้อยละ 83.3 และร้อยละ 13.9 ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ผล antibiosis พบว่า ราทะเลจำนวน 20 สายพันธุ์และราเอนโดไฟท์จำนวน 6 สายพันธุ์ให้ผล antibiosis ได้ดีสุดต่อราโรคพืช และพบว่าอาหารที่เตรียมจากน้ำกลั่นให้ผลดีกว่าอาหารสูตรเดียวกันที่เตรียมจากน้ำทะเล แม้ว่าจะเลี้ยงบนอาหารชนิดต่างๆกัน เมื่อนำราทะเล 16 สายพันธุ์และราเอนโดไฟท์ 5 สายพันธุ์ มาเลี้ยงในอาหารเหลว 4 ชนิด ที่ตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 28°C และสกัดสารออกฤทธิ์ชีวภาพ ได้ราที่สารสกัดยับยั้งการเจริญราโรคพืชที่ทำการศึกษาได้ดีที่สุด 5 สายพันธุ์ โดยเป็นสารสกัดจากราทะเล 3 สายพันธุ์ คือ *Saagaromyces ratnagiriensis* BUCS 032-1, *S. ratnagiriensis* BUCS 032-2 และ *Astrosphaeriella striatispora* BUCS 055-1 ซึ่งยับยั้งการเจริญราโรคพืชทั้ง 5 ชนิดได้ดี และเป็นราเอนโดไฟท์ที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญราโรคพืชดี 2 สายพันธุ์ ได้แก่ unidentified BUEN 829 และ *Colletotrichum* sp. BUEN 830 โดยสามารถยับยั้งการเจริญของราโรคพืช 5 และ 4 ชนิดตามลำดับ ในระดับอ่อนถึงปานกลาง สารสกัดที่เตรียมจากราทะเล *S. ratnagiriensis* BUCS 032-2 และ *A. striatispora* BUCS 055-1 สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์รา *F. oxysporum* และ *F. subglutinans* ได้ด้วย

คำสำคัญ: ราทะเล ราเอนโดไฟท์ ราโรคพืช ปรปักษ์ สารยับยั้งรา

Abstract

Marine-derived fungi which were 65 lignicolous marine and 36 endophytic fungi isolated from mangrove plants, were investigated for their inhibitory activities against 5 fungal phytopathogens; *Colletotrichum capsici* DoAC 1511, *C. gloeosporioides* DoAC 0782, *Fusarium oxysporum* DoAC 1808, *F. subglutinans* DoAC 0761 and *Pestalotiopsis* sp. DoAC 1098 on different media. Almost (96.9%) of marine fungi inhibited at least one fungal phytopathogen and 41.5% inhibited all 5 fungal phytopathogens. While inhibition by endophytic marine fungi against at least one fungal phytopathogen and all five phytopathogens were 83.3 and 13.9%, respectively. It was found that media using distilled water showed inhibitory result better than the same media using seawater. Twenty marine strains and 6 endophytic strains exhibited the best antibiosis results when grown on several types of media. Sixteen marine derived fungi and 5 endophytic fungi were selected for broth culture under static condition at 28°C, and extracts were prepared by organic solvent extraction. Extracts from 3 lignicolous marine fungi; *Saagaromyces ratnagiriensis* BUCS 032-1, *S. ratnagiriensis* BUCS 032-2 and *Astrosphaeriella striatispora* BUCS 055-1; strongly inhibited growth of all 5 fungal phytopathogens. Two endophytic fungi; unidentified BUEN 829 and *Colletotrichum* sp. BUEN 830 inhibited 5 and 4 fungal phytopathogens, respectively but at the lower level than those of lignicolous strains. Crude extracts from *S. ratnagiriensis* BUCS 032-2 and *A. striatispora* BUCS 055-1 also showed spore germination inhibition against spores of *F. oxysporum* and *F. subglutinans*.

Keywords: marine-derived fungi, endophyte, fungal phytopathogen, antibiosis, antifungus

กิตติกรรมประกาศ

รายงานวิจัยฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ได้ด้วยความกรุณาของ ศ.ดร.วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ ม.มหิดล อาจารย์ที่ปรึกษาและนักวิทยาศาสตร์ที่ปรึกษาของโครงการ ขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง สำหรับการเสียสละเวลาอันมีค่าให้คำแนะนำที่มีประโยชน์ ตลอดจนการช่วยเหลือตรวจแก้ไขและอำนวยความสะดวกในการทำวิจัยตลอดโครงการ

ขอขอบพระคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา ที่ให้ทุนอุดหนุนโครงการวิจัย ตลอดระยะเวลา 2 ปี ภายใต้รหัสโครงการ MRG 5280096

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 ลักษณะโคโลนีของราโรคพืชบนอาหาร potato dextrose agar	8
ภาพที่ 2 ระดับของปฏิสัมพันธ์ ที่เกิดขึ้นเมื่อเลี้ยงราทะเลร่วมกับราโรคพืช.....	22
ภาพที่ 3 ร้อยละของราทะเลที่แสดงผล antibiosis ต่อจำนวนชนิดราโรคพืช	25
ภาพที่ 4 เปรียบเทียบจำนวนสายพันธุ์ราทะเลที่ให้ผล strong antibiosis เมื่อเลี้ยงร่วมกับราโรคพืชบนอาหารแข็งชนิดต่างๆ ที่เตรียมจากน้ำกลั่นและน้ำทะเล.....	55
ภาพที่ 5 ระดับความแรง antibiosis ของ <i>Saagaromyces ratnagiriensis</i> BUCH 032-1 เมื่อเลี้ยงร่วมกับราโรคพืช	56
ภาพที่ 6 ระดับความแรง antibiosis ของ <i>Astrosphaeriella striatispora</i> BUSK 057-3 เมื่อเลี้ยงร่วมกับราโรคพืช	57
ภาพที่ 7 ระดับความแรง antibiosis ของ <i>Verruculina enalia</i> BUCH 215-1 เมื่อเลี้ยงร่วมกับราโรคพืช	58
ภาพที่ 8 ระดับความแรง antibiosis ของ <i>Saagaromyces ratnagiriensis</i> BUCH 032-1 เมื่อเลี้ยงร่วมกับราโรคพืช <i>F. subglutinans</i>	59
ภาพที่ 9 ระดับความแรง antibiosis ของ <i>Astrosphaeriella striatispora</i> BUSK 055-1 เมื่อเลี้ยงร่วมกับราโรคพืช <i>C. gloeosporioides</i>	60
ภาพที่ 10 การยับยั้งการเจริญเส้นใยราโรคพืช <i>F. subglutinans</i> ของสารสกัดจากราทะเล	65
ภาพที่ 11 การยับยั้งการเจริญเส้นใยราโรคพืช <i>F. oxysporum</i> ของสารสกัดจากราทะเล.....	65
ภาพที่ 12 การยับยั้งการเจริญเส้นใยราโรคพืช <i>F. subglutinans</i> และ <i>C. gloeosporioides</i> บนอาหาร PDA ของสารสกัดจากราทะเล.....	66
ภาพที่ 13 ลักษณะผิดปกติของปลายยอดเส้นใยราโรคพืช เมื่อทดสอบกับสารสกัดราทะเล	71
ภาพที่ 14 ลักษณะปลายเส้นใยที่เปลี่ยนไปของราโรคพืชที่ผลทดสอบกับสารสกัดเป็นลบ ขณะที่การทดสอบ antibiosis ให้ผลเป็นบวก.....	72
ภาพที่ 15 ลักษณะปลายเส้นใยที่เปลี่ยนไปของราโรคพืช <i>C. gloeosporioides</i> เมื่อทดสอบกับสารสกัดจากราทะเล.....	73
ภาพที่ 16 ผลของสารสกัดจากราทะเลที่เลี้ยง 14 วัน ต่อการงอกของสปอร์ราโรคพืช <i>F. oxysporum</i> บนอาหาร potato dextrose agar	76

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

ภาพที่ 17	ผลของสารสกัดจากราทะเล <i>S. ratnagiriensis</i> BUCS 032-2 ต่อการงอกของสปอร์ ราโรคพืช บนอาหาร potato dextrose agar	76
ภาพที่ 18	ลักษณะของรา BUEN 805 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ	78
ภาพที่ 19	ลักษณะของรา BUEN 813 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ	79
ภาพที่ 20	ลักษณะของรา <i>Alternaria</i> sp. BUEN 816 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ	80
ภาพที่ 21	ลักษณะของรา Oomycete like BUEN 827 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ	81
ภาพที่ 22	ลักษณะของรา <i>Colletotrichum</i> sp. BUEN 830 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ	82
ภาพที่ 23	ลักษณะของรา BUEN 836 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ	83
ภาพที่ 24	ลักษณะของรา <i>Phomopsis</i> sp. BUEN 846 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ	84
ภาพที่ 25	ร้อยละของราเอนโดไฟท์ที่แสดงผล antibiosis ต่อจำนวนชนิดราโรคพืช	85
ภาพที่ 26	ระดับความแรง antibiosis 4+ เมื่อเลี้ยงราเอนโดไฟท์ BUEN 813 ร่วมกับราโรคพืช	95
ภาพที่ 27	ระดับความแรง antibiosis เมื่อเลี้ยงราเอนโดไฟท์ BUEN 830 ร่วมกับราโรคพืช <i>C. capsici</i>	96
ภาพที่ 28	ระดับความแรง antibiosis เมื่อเลี้ยงราเอนโดไฟท์ BUEN 836 ร่วมกับราโรคพืช <i>C. gloeosporioides</i>	97
ภาพที่ 29	การยับยั้งการเจริญเส้นใยราโรคพืช <i>C. gloeosporioides</i> บนอาหาร LNA ของสาร สกัดที่เตรียมจากราเอนโดไฟท์.....	99
ภาพที่ 30	ลักษณะปลายเส้นใยที่เปลี่ยนแปลงไปของปลายเส้นใยราโรคพืช เมื่อทดสอบกับ สารสกัดที่เตรียมจากราเอนโดไฟท์	101
ภาพที่ 31	ลักษณะปลายเส้นใยที่เปลี่ยนแปลงไปของปลายเส้นใยราโรคพืช เมื่อเลี้ยงร่วมกับรา เอนโดไฟท์	103

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ตัวอย่างราทะเลและสารออกฤทธิ์ชีวภาพที่ราผลิตขึ้น.....	11
ตารางที่ 2 ตัวอย่างราเอนโคไฟท์จากพืชชายเลนและสารออกฤทธิ์ชีวภาพที่ราผลิตขึ้น.....	12
ตารางที่ 3 ตัวอย่างชนิดอาหารและสารอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงราทะเลเพื่อสกัดสารออกฤทธิ์ชีวภาพ.....	14
ตารางที่ 4 ราทะเลที่นำมาศึกษา.....	18
ตารางที่ 5 ราเอนโคไฟท์ที่นำมาศึกษา	19
ตารางที่ 6 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งราโรคพืช.....	20
ตารางที่ 7 ระดับ antibiosis ของราทะเล บนอาหารแข็งชนิดต่างๆ ที่มีต่อราโรคพืช.....	26
ตารางที่ 8 ระดับ antibiosis ที่ดีที่สุดบนอาหารแข็งของราทะเล 20 สายพันธุ์ ต่อราโรคพืช.....	48
ตารางที่ 9 อาหารเลี้ยงเชื้อและจำนวนราทะเลที่ให้ผล antibiosis ระดับต่างๆ.....	53
ตารางที่ 10 การยับยั้งการเจริญเส้นใยราโรคพืชของสารสกัดจากราทะเลที่เตรียมจากการหมักเป็นเวลา 14 วัน และ 28 วัน.....	62
ตารางที่ 11 การยับยั้งการเจริญของเส้นใยราโรคพืชของสารสกัดจากราทะเลที่เตรียมจากการหมักเป็นเวลา 14 วัน	64
ตารางที่ 12 ความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงเส้นใยราโรคพืชได้กลี้องจุลทรรศน์กับผลทดสอบกับสารสกัดจากราทะเลและผล antibiosis บนอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	68
ตารางที่ 13 ลักษณะเส้นใยราโรคพืชได้กลี้องจุลทรรศน์ เมื่อทดสอบสารสกัด	69
ตารางที่ 14 การยับยั้งการงอกของสปอร์ราโรคพืช <i>Fusarium</i> spp. ของสารสกัดจากราทะเล ...	75
ตารางที่ 15 คุณสมบัติราของทะเลที่คัดเลือก.....	77
ตารางที่ 16 การยับยั้งการเจริญราโรคพืช ของสารสกัดจากราทะเลที่เตรียมจากการหมักเป็นเวลาต่างๆกัน.....	77
ตารางที่ 17 ระดับ antibiosis ของราเอนโคไฟท์ บนอาหารแข็งชนิดต่างๆ ที่มีต่อราโรคพืช...	86
ตารางที่ 18 อาหารเลี้ยงเชื้อและจำนวนราเอนโคไฟท์ที่ให้ผล antibiosis ระดับต่างๆ.....	93
ตารางที่ 19 ระดับ antibiosis ของราเอนโคไฟท์ที่ดีที่สุด บนอาหารแข็งชนิดต่างๆ ที่มีต่อราโรคพืช.....	94

สารบัญตาราง (ต่อ)

	หน้า
ตารางที่ 20 การยับยั้งการเจริญเส้นใยราโรคพืชของสารสกัดจากราเอนโดไฟท์ที่เตรียมจาก การหมัก เป็นเวลา 14 วันและ 28 วัน.....	98
ตารางที่ 21 ลักษณะลักษณะเส้นใยของราโรคพืชได้กลี้องจุลทรรศน์ ที่แสดงลักษณะต่างๆ เมื่อทดสอบสกัดจากราเอนโดไฟท์	100
ตารางที่ 22 ลักษณะเส้นใยราโรคพืชได้กลี้องจุลทรรศน์เมื่อเลี้ยงร่วมกับรา เอนโดไฟท์ BUEN 830 และ BUEN 836 ใน dual culture.....	102
ตารางที่ 23 การยับยั้งการงอกของสปอร์ของราโรคพืชของสารสกัดจากราเอนโดไฟท์	104

บทที่ 1

บทนำ

ราทะเล (marine fungi) แบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ obligate marine fungi และ facultative marine fungi (Kohlmeyer and Kohlmeyer, 1979) ราคุ่ม obligate marine fungi เป็นราที่เจริญและสร้างสปอร์ในทะเลหรือแหล่งน้ำกร่อย (Kohlmeyer and Kohlmeyer, 1979) ส่วนใหญ่เป็นราชั้นสูงในไฟลัม Ascomycota และ Basidiomycota รวมถึงรูปอะนามอร์ฟ (anamorph) ซึ่งเป็นรูปไม่อาศัยเพศของ Ascomycota และ Basidiomycota ราในไฟลัม Ascomycota พบได้มากที่สุด ตามด้วยราคุ่มอะนามอร์ฟ ส่วนราทะเลในไฟลัม Basidiomycota พบได้น้อย ราคุ่ม facultative marine fungi เป็นราบกหรือราน้ำจืดที่อาศัยและอาจสร้างสปอร์ได้ในสภาวะแวดล้อมทางทะเล (Kohlmeyer and Kohlmeyer, 1979) ส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มอะนามอร์ฟ ในรายงานระยะหลังๆ นิยมเรียกราทะเลทั้ง 2 กลุ่มรวมกัน ว่าเป็น marine-derived fungi เนื่องจากราที่พบในระบบนิเวศทางทะเลรวมราที่มาจากบนบกเข้าไปด้วย (Bugni and Ireland, 2004) การแบ่งกลุ่มของราทะเลอาจแบ่งได้ตามชนิดสัณฐานหรือแหล่งที่อยู่ และมีชื่อเรียกแตกต่างกันไป

ราเอนโดไฟท์เป็นราที่เจริญในเนื้อเยื่อของพืช ส่วนใหญ่เป็นราคุ่มอะนามอร์ฟ พบได้ในส่วนต่างๆ เช่นใบ ราก ลำต้น พืชที่มีราเอนโดไฟท์อาศัยอยู่จะมีลักษณะปกติ เอนโดไฟท์หลายชนิดสามารถพบได้บนโฮสต์มากกว่า 1 ชนิด และในโฮสต์ต่างชนิดพบเอนโดไฟท์เด่นต่างชนิดกัน (Kumaresan and Suryanarayanan, 2001) ราเอนโดไฟท์จากพืชชายเลนถูกจัดให้เป็นราทะเลประเภทหนึ่ง (Miller, 2000; Lin *et al.*, 2010) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าส่วนใหญ่เป็นกลุ่มอะนามอร์ฟที่ไม่สร้างสปอร์ในสภาวะปกติ ทำให้จัดจำแนกได้ยาก ต้องใช้วิธีการทางพันธุศาสตร์ร่วมด้วยเพื่อใช้ในการบ่งชี้สายพันธุ์

การจัดจำแนกชนิดราทะเลทางทางสัณฐานวิทยาใช้วิธีเดียวกับการจัดจำแนกราชั้นสูงอื่นๆ คือใช้ลักษณะและขนาดของสปอร์แบบอาศัยเพศ สปอร์แบบไม่อาศัยเพศ รวมทั้งลักษณะฟรูตบอดี ซึ่งมีลักษณะและชื่อเรียกแตกต่างกันไปตามไฟลัมหรือกลุ่มของราในการจัดจำแนก ราในไฟลัม Ascomycota สร้างสปอร์แบบอาศัยเพศ ที่เรียกว่าแอสโคสปอร์ (ascospore) ภายในแอสคัส ซึ่งมีลักษณะคล้ายถุง ส่วนใหญ่แอสคัสสร้างอยู่ในฟรูตบอดีซึ่งเป็นเนื้อเยื่อราที่พันกันแน่นอีกชั้นหนึ่ง ราไฟลัม Basidiomycota สร้างสปอร์แบบอาศัยเพศที่เรียกว่า เบซิไดโอสปอร์ (basidiospore) บนโครงสร้างเรียกว่าเบสิเดียม ฟรูตบอดีเรียกรของราทะเลที่พบมีขนาดเล็กกว่าราบกมาก ส่วนราคุ่มอะนามอร์ฟเป็นกลุ่มระยะช่วงชีวิตที่สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ สร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศเรียกว่าโคนิเดีย (conidia) บนก้านชูที่เรียกว่าโคนิดิโอฟอร์ บางครั้งมีฟรูตบอดีห่อหุ้ม

ราทะเลและราเอนโดไฟท์เป็นราคุ่มสำคัญ เนื่องจากมีรายงานว่าสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ชีวภาพที่เป็นสาร secondary metabolite หลายประเภทรวมทั้งสารยับยั้งรา การสร้างสารออกฤทธิ์

ชีวภาพต้องอาศัยปัจจัยที่เหมาะสมหลายประการในการสร้าง แต่การรายงานค่าหรือปัจจัยที่เหมาะสมจะแตกต่างกันไปขึ้นกับชนิดของราและสภาวะที่ศึกษา เช่น สร้างในสภาวะขาดสารอาหารภายใต้สภาวะทางเคมีและฟิสิกส์ที่เหมาะสม (Bu'lock, 1975) หรือในสภาวะ static ที่เรียกว่า still culture คือตั้ง culture ไว้โดยไม่ต้องมีการเขย่า (Zhang *et al.*, 2007) นอกจากสารอาหาร และ pH แล้ว ความเค็ม อุณหภูมิ และปริมาณออกซิเจน เป็นสิ่งจำเป็นมากสำหรับราทะเล (Miller, 2000) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าราทะเลในป่าชายเลนเจริญและสร้างสารเมตาบอไลต์ รวมทั้งสร้างสารออกฤทธิ์ชีวภาพได้ ทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อน้ำกลั่นและในอาหารเลี้ยงเชื้อปกติ (Abbanat *et al.*, 1998) เช่นเดียวกับสามารถสร้างได้ในน้ำทะเลเทียม (Gallo *et al.*, 2004) หรือน้ำกลั่นที่ผสมน้ำทะเลในอัตราส่วนต่างๆ (Lin *et al.*, 2005) ปัจจุบันรายงานการศึกษาผลของปัจจัยต่างๆที่มีอิทธิพลต่อการสร้าง secondary metabolite ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ชีวภาพของราทะเลหรือราเอนโดไฟท์โดยตรงยังมีผู้ศึกษาน้อย

ผักและผลไม้เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของไทย แต่มักประสบปัญหาพืชเป็นโรคจากการทำลายของจุลินทรีย์กลุ่มต่างๆ โดยมีราเป็นสาเหตุใหญ่ (ศศิธร วุฒิวิชัย, 2545) การยับยั้งโรคพืชจากราสามารถกระทำได้ 2 วิธี วิธีแรกคือการใช้ราในการควบคุมราปรสิตที่เป็นสาเหตุของโรคพืชโดยตรง โดยราอาจหลังสารหรือเอนไซม์บางชนิดออกมาภายนอก เพื่อยับยั้งการเจริญของราปรสิต (antibiosis) หรืออาจใช้วิธีแทงเส้นใยเข้าไปในเส้นใยฝ่ายตรงข้ามเพื่อทำลายราปรสิต (Mycoparasite) (Adams, 1990; Srinon *et al.*, 2006; Koitabashi and Tsushima 2007) และวิธีที่สอง คือ การใช้สารสกัดหรือเอนไซม์จากราหรือสิ่งมีชีวิตประเภทต่างๆทั้งจากบกและในทะเล ทำลายราที่เป็นสาเหตุโรคพืช (Hostettmann and Marston, 1994; Intana *et al.*, 2005; Xie *et al.*, 2008) การใช้สารสกัดจากราในการยับยั้งราที่เป็นสาเหตุโรคพืช (antifungal activity) มีรายงานไว้น้อยมากเมื่อเทียบกับวิธีแรก ตัวอย่างสารสกัดยับยั้งราโรคพืชที่มาจากราชั้นสูง เช่นจาก *Trichoderma virens* (Intana *et al.* 2005) ไคเลนส์ (Shahi *et al.*, 2001) เบสิดิโอมัยซีส (Qiang *et al.*, 2005) รากาฟองน้ำในทะเล (Xie *et al.*, 2008)

ประเทศไทยตั้งอยู่ในภูมิภาคเขตร้อน และเป็นแหล่งที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูงแห่งหนึ่งของโลก มีรายงานสิ่งมีชีวิตที่ค้นพบแล้วประมาณ 6-10 % ของโลกในขณะที่ประเทศไทยมีพื้นที่เพียงประมาณ 0.34 % ของพื้นแผ่นดินโลกเท่านั้น (วิสุทธ์ ใบไม้, 2549) ความหลากหลายด้านจุลินทรีย์ โดยเฉพาะราเป็นอีกตัวอย่างหนึ่งที่แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายทางชีวภาพในประเทศไทย ที่ผ่านมามีการสำรวจและค้นพบราชั้นสูงหลายชนิด ที่มีศักยภาพในการใช้ประโยชน์เพื่อการยับยั้งสิ่งมีชีวิตอื่นจากป่าในประเทศไทย แต่อนอกจากราเอนโดไฟท์แล้ว (Boontim *et al.*, 2001; Lumyong *et al.*, 2004) การใช้ประโยชน์จากราชั้นสูงเหล่านี้ ส่วนใหญ่อยู่ระหว่างการศึกษาเบื้องต้น (Jones *et al.*, 2004) เช่นราในมูลสัตว์ (Somrithipol, 2004) ไคเลนส์ (Boonpragob, 2004) และราทะเล (Sakayaroj *et al.*, 2004) เป็นต้น กลุ่มราเอนโดไฟท์จากไม้ในป่าชายเลน เป็นตัวอย่างของราชั้นสูงกลุ่มใหม่ที่เริ่มมีการศึกษาในประเทศไทย เมื่อไม่นานมานี้ (Lumyong *et al.*, 2004) โดยมีรายงานว่าราเอนโดไฟท์สามารถสร้างออกฤทธิ์ชนิดใหม่

ได้หลากหลาย ราเอนโดไฟท์เริ่มเป็นที่สนใจในฐานะแหล่งใหม่ของสารยับยั้งจุลินทรีย์ เนื่องจากการผลิตสารปฏิชีวนะชนิดใหม่ๆที่มีประสิทธิภาพจากแหล่งที่เคยค้นหาเริ่มลดลงจากการพบแต่จุลินทรีย์ชนิดเดิมๆ (Hyde, 2001) การศึกษาราเอนโดไฟท์จากไม้ในป่าชายเลนในประเทศไทยยังอยู่ในระยะของการสำรวจและรวบรวมสายพันธุ์

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาราทะเลและราเอนโดไฟท์รวมทั้งศึกษาผลของสารสกัดจากราทะเลและราเอนโดไฟท์ต่อการงอกของสปอร์ และการเจริญของราโรคพืช ประเมินประสิทธิภาพและความสัมพันธ์ของการใช้ปฏิสัมพันธ์แบบ antibiosis ควบคู่กับลักษณะเส้นใยได้กล้องจุลทรรศน์ ในการศึกษาคัดกรองราที่สามารถสร้างสารยับยั้งราโรคพืช

เพื่อให้มีความชัดเจนของความแตกต่างในการใช้คำ antibiosis และ antifungus ขออธิบายข้อกำหนดดังนี้ antibiosis จะใช้ในกรณีที่การเจริญของราชนิดหนึ่ง มีผลยับยั้งการเจริญของราอีกชนิดหนึ่งเมื่อศึกษาใน dual culture ซึ่งการยับยั้งนั้นอาจเกิดจากการผลิตเอนไซม์หรือสารออกฤทธิ์ชีวภาพออกมายับยั้ง (Dix and Webster, 1995) ขณะที่ antifungus ในรายงานการวิจัยนี้จะหมายถึงการยับยั้งการเจริญของราโรคพืชโดยการใช้สารสกัดจากราทดสอบ เนื่องจากสารสกัดเตรียมด้วย organic solvent และมีการทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลานาน ดังนั้นสารสกัดที่ได้จึงไม่ใช่โปรตีนหรือเอนไซม์ แต่เป็นสารออกฤทธิ์ชีวภาพที่เป็น secondary metabolites

บทที่ 2

รายงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ป่าชายเลนและพืชชายเลน

ป่าชายเลนพบได้ทั่วไปตามพื้นที่ชายฝั่งทะเล บริเวณปากแม่น้ำ อ่าว ทะเลสาบ และเกาะซึ่งเป็นบริเวณที่น้ำทะเลท่วมถึง พบได้ในประเทศแถบโซนร้อน (tropical region) หรือบริเวณกึ่งร้อน (sub-tropical region) (Sarma and Vittal, 2000) ป่าชายเลนที่มีความอุดมสมบูรณ์ ประกอบด้วยพันธุ์ไม้หลายชนิด ป่าชายเลนในประเทศไทยขึ้นอยู่กับกระจัดกระจายตามชายฝั่งทะเลภาคตะวันออก ภาคกลาง และภาคใต้ ข้อมูลการสำรวจในปี พ.ศ. 2529 จากภาพถ่ายดาวเทียมและการสำรวจการใช้ประโยชน์พื้นที่ภาคพื้นดิน ปรากฏว่ามีพื้นที่ป่าชายเลนประมาณ 1,227,674 ไร่ (บุญชนะ กลั่นคำสอน และธงชัย จารุพัฒน์, 2530) แต่จากการสำรวจในปี พ.ศ. 2547 ปรากฏว่า ประเทศไทยมีพื้นที่ป่าชายเลนลดลงมาก (อนุวัฒน์ นทีวัฒนา, 2551)

ป่าชายเลนประกอบด้วยพืชหลายชนิดซึ่งรวมถึงไม้ยืนต้น เถาวัลย์ และสาหร่าย พันธุ์ไม้ส่วนใหญ่หรือเกือบจะทั้งหมดเป็นพันธุ์ไม้ไม่ผลัดใบ มีลักษณะทางสรีรวิทยาและการปรับตัวทางโครงสร้างที่คล้ายกัน พืชที่ขึ้นอยู่ในป่าชายเลนเป็นพวกที่มีความทนทานต่อสภาพความเค็มได้ดี (สนิท อักษรแก้ว 2541) พันธุ์ไม้เด่นและเป็นชนิดสำคัญในป่าชายเลนของประเทศไทย มี 35 วงศ์ 53 สกุล และ 74 ชนิด (Santisuk, 1983)

พืชชายเลนที่นักวิทยาศาสตร์สนใจศึกษา เป็นพืชที่พบมากในป่าชายเลน ตัวอย่างเช่นพืชในแฟมิลี Rhizophoraceae ได้แก่โกงกาง (Rhizophora) โปรง (Ceriops) พังกา (Bruguiera) และถั่ว (Bruguiera) พันธุ์ไม้ในวงศ์ Sonneratiaceae ได้แก่ ลำพู และลำแพน (*Sonneratia* spp.) พันธุ์ไม้ในวงศ์ Acanthaceae ซึ่งเป็นพันธุ์ไม้ที่สำคัญอีกวงศ์หนึ่งประกอบด้วยแสม (*Avicennia* spp.) นอกจากนี้ก็เป็นพันธุ์ไม้ในวงศ์ Meliaceae ซึ่งประกอบด้วยพืชในสกุลตะบูนและตะบัน (*Xylocarpus*) วงศ์ Malvaceae ได้แก่ โพธิ์ทะเล (*Thespesia*) วงศ์ Euphorbiaceae ได้แก่ตาตุ่มทะเล (*Excoecaria agallocha*) และวงศ์ Arecaceae (Palmae) ได้แก่ต้นจาก (*Nypa fruticans*) Watson (1928) จัดแบ่งเขตพันธุ์ไม้ของป่าชายเลนในพื้นที่ทางด้านตะวันตกของประเทศไทยได้ 5 บริเวณโดยใช้ความถี่ของการท่วมถึงของน้ำทะเลเป็นตัวกำหนด บริเวณตอนบนสุดเป็นพื้นที่ที่จะถูกน้ำท่วมถึง ก็ต่อเมื่อน้ำขึ้นสูงสุดเป็นพิเศษเท่านั้น พันธุ์ไม้ที่ขึ้นอยู่บริเวณนี้ส่วนใหญ่เป็นพังกาหัวสุ่มดอกแดง ตาตุ่มทะเล และต้นจาก

2. ราทะเล

ราทะเลสามารถเจริญได้บนซับสเตรทหลายชนิด จึงมีการแบ่งราทะเลตามการเจริญได้บนซับสเตรทออกเป็น 5 กลุ่ม คือกลุ่มที่เจริญบนไม้ (lignicolous) กลุ่มที่เจริญบนสาหร่ายทะเล (algicolous) กลุ่มที่เจริญบนเม็ดทราย (arenicolous) กลุ่มที่เจริญบนใบไม้ (folicolous) กลุ่มที่พบในป่าชายเลน (manglicolous fungi, mangrove fungi) Barghoorn และ Linder (1944) ได้รายงานการศึกษาราทะเลที่เจริญบนไม้เป็นครั้งแรก หลังจากนั้นอีก 35 ปี Kohlmeyer และ Kohlmeyer (1979) รายงานการศึกษาราทะเลชั้นสูงที่เจริญบนไม้ที่อยู่ในน้ำ และเจริญบนซับสเตรทที่เป็นเซลล์โลสอื่นๆ ราทะเลกลุ่มนี้มักเป็นกลุ่ม obligate marine fungi ซึ่งส่วนใหญ่กว่าครึ่งของจำนวนราทะเลทั้งหมดอยู่ในชั้น Ascomycete, order Halosphaeriales (Jones, 1995; Hyde *et al.*, 1998; Sakayaroj *et al.*, 2004) ราในออเดอร์นี้มีรายงานการพบในน้ำทะเลถึง 43 สกุล และบางครั้งพบได้ถึง 133 ชนิด (Jones, 1995) Sakayaroj *et al.* (2004) รวบรวมราทะเล (ไม่นับรวมเอนโดไฟต์จากพืชชายเลน) ที่พบในประเทศไทย 147 สายพันธุ์ เป็นราในไฟลัม Ascomycota 118 ชนิด Basidiomycota 3 ชนิด ราที่สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ 26 ชนิด คิดเป็น 29% ของข้อมูลสายพันธุ์ราทะเลที่มีรายงานไว้ทั่วโลก

ระยะแรกๆ การศึกษาราทะเล (obligate marine) นิยมทำกันบนเศษไม้ เนื่องจากไม้เป็นซับสเตรทโดยธรรมชาติของราทะเลที่พบได้ง่าย โดยเศษไม้ที่ได้นั้นอาจมาจากป่าชายเลนที่อยู่ใกล้ทะเลและตกลงในทะเลโดยตรง หรือถูกแม่น้ำพัดพาต้นไม้และกิ่งไม้มาสู่ทะเล ไม้จะฝังตัวในหาดทรายหรือแทรกอยู่ระหว่างหินในเขตน้ำขึ้นน้ำลง (intertidal zone) หรือบริเวณชายฝั่ง บางส่วนของไม้อาจจมลงใต้ระดับน้ำทะเล ไม้ที่อยู่ในน้ำทะเลหรือน้ำกร่อยเป็นระยะเวลาหนึ่ง จะมีการเจริญของกลุ่มราทะเลชั้นสูงบนไม้นั้น lignicolous fungi จึงเป็นราในระบบนิเวศป่าชายเลนที่พบได้มากที่สุด (Jones and Alias, 1997) และจะพบได้มากในทะเลเขตร้อน มากกว่าเขตอบอุ่นเขตใกล้ขั้วโลกหรือในบริเวณทะเลลึก ซึ่งน้ำมีปริมาณออกซิเจนต่ำ ทำให้การเจริญของราบนเศษไม้ไม่ดี (Kohlmeyer & Kohlmeyer, 1979) นอกจากเศษไม้ถูกน้ำทะเลพัดพามาแล้ว เศษไม้ที่ตกอยู่ใต้ดินหรือกิ่งไม้บนดินที่อยู่ในระดับน้ำขึ้นน้ำลง ก็มีผู้ศึกษากันมาก เนื่องจากสามารถระบุชนิดไม้ได้แน่นอน ราทะเลจากต้นจาก (*Nypa fruticans*) ในเขตน้ำกร่อยซึ่งอยู่บริเวณปากแม่น้ำหรือตอนบนของป่าชายเลน เป็นราทะเลอีกกลุ่มหนึ่งที่มีผู้สนใจศึกษามาก (Hyde, 1988, 1992; Hyde *et al.*, 1999; Besitulo *et al.*, 2002; Pilantanapak *et al.*, 2005) Pilantanapak (2003) รายงานว่ามีราทะเลที่ทราบชนิดแล้ว 65 ชนิดที่พบได้บนต้นจาก

ในระยะหลัง มีการศึกษารามาจากซับสเตรทต่างๆ ในระบบนิเวศทางทะเลหลากหลายมากขึ้น รวมทั้งราเอนโดไฟต์จากพืชชายเลน มีการพบราในกลุ่มอะนามอร์ฟชนิดเดียวกับที่พบได้บนบก (facultative marine fungi) เพิ่มมากขึ้น ในรายงานระยะหลังๆ จึงนิยมเรียกรวมราทะเลกลุ่ม obligate และ facultative marine fungi เข้าด้วยกัน ว่าเป็น marine derived fungi (Bugni and Ireland, 2004) แทนคำว่า marine fungi ที่เรียกกันแต่เดิม

ราเอนโดไฟท์จากพืชชายเลนเป็นราทะเล (marine-derived fungi) ที่พบมากเป็นลำดับสองในป่าชายเลน รากลุ่มนี้กำลังมีผู้สนใจศึกษาเพิ่มขึ้นค่อนข้างมากในต่างประเทศ เนื่องจากพบว่าพืชชายเลน เป็นแหล่งอาศัยที่สมบูรณ์ของราเอนโดไฟท์ (Lin *et al.*, 2010) มีรายงานการค้นพบและจัดจำแนกรากลุ่มนี้มากกว่า 200 ชนิด (Lin *et al.*, 2010) แต่ยังมีรายงานน้อยในประเทศไทย เมื่อเทียบกับพื้นที่ป่าชายเลน

3. ราเอนโดไฟท์

ราเอนโดไฟท์เป็นราที่อาศัยอยู่ร่วมกับพืชโดยไม่ก่อให้เกิดโรคกับพืช (Petrini, 1991) มีรายงานว่าพบอยู่ทั่วไปในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของพืช เช่น ในราก (Hambleton and Currah, 1997; Addy *et al.*, 2005) ลำต้น (Carroll, 1988) กิ่งก้าน (Carroll, 1988; Sieber, 1989; Stefani and Bérubé, 2006) ใบ (Petrini 1991; Dobranic *et al.*, 1995) ราเอนโดไฟท์ส่วนใหญ่เป็นราแอสโคมัยซีสรวมถึงอะนามอร์ฟซึ่งเป็นช่วงชีวิตที่ไม่อาศัยเพศ (Kumaresan and Suryanarayanan, 2001; Rodriguez *et al.*, 2009) ราเอนโดไฟท์สามารถกระตุ้นให้โฮสต์มีความต้านทานต่อแมลงศัตรูพืชเพิ่มขึ้น (Webber, 1981) รวมถึงสามารถสร้างสารที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ทางเภสัชกรรม (Strobel, 2003) Rodriguez *et al.* (2009) แบ่งราเอนโดไฟท์ออกเป็น 4 class ตามความหลากหลายของโฮสต์ ลักษณะการอาศัยและรูปแบบการแพร่กระจาย ความจำเพาะกับเนื้อเยื่อพืช และปฏิสัมพันธ์กับโฮสต์ Class 1 จัดเป็น Clavicipitaceous endophyte คือเป็นราในแฟมิลี Clavicipitaceae และราที่อาศัยอยู่ร่วมกับแมลงและราชนิดอื่น ส่วนกลุ่มอื่นๆ จัดเป็น non Clavicipitaceous endophyte เป็นกลุ่มที่มีความหลากหลายสูง การวิเคราะห์ทางพันธุศาสตร์พบว่าเป็นกลุ่ม polyphyletic ในขณะที่ Class 3 รวมเอาราเอนโดไฟท์ที่พบในใบพืชเขตร้อนซึ่งมีความหลากหลายสูงไว้ ราในกลุ่มนี้กำลังเป็นที่สนใจศึกษาในแง่ของการผลิตสารออกฤทธิ์ประเภทต่างๆ (Rodriguez *et al.*, 2009) ราเอนโดไฟท์ Class 4 เป็นรากลุ่มที่สร้าง pigment สีน้ำตาลหรือดำ จึงเรียกว่าเป็น dark septate endophytes (DSE) และมักพบอยู่ร่วมกับรากของพืช จึงอาจเรียกว่าเป็น pseudomycorrhizal fungi เอนโดไฟท์ class นี้ยังไม่เป็นที่รู้จักมากนัก ราเอนโดไฟท์ส่วนใหญ่ไม่สร้างสปอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Stefani and Bérubé, 2006) การจัดจำแนกจำเป็นต้องใช้การวิเคราะห์ระดับโมเลกุล ที่ใช้ได้ผลดีคือการวิเคราะห์ ITS rDNA

การศึกษาราเอนโดไฟท์ในระยะแรกเน้นหนักในด้านความหลากหลายทางชีวภาพ (Stefani and Bérubé, 2006) และปฏิสัมพันธ์กับพืชหรือราที่อาศัยร่วม ปฏิสัมพันธ์ที่พบเป็นสภาวะ antagonism มีทั้งลักษณะ hyperparasitism และ antibiosis (Istifadah *et al.*, 2006; Zabalgogazcoa, 2008) แต่ส่วนใหญ่เป็น antibiosis (Cristensen, 1996; Liu *et al.*, 2001; Istifadah *et al.*, 2006) ราเอนโดไฟท์ที่แยกได้ส่วนใหญ่แยกจากพืชทั่วไปทั้งพืชในธรรมชาติและในพืชที่ทำการเพาะปลูก และส่วนใหญ่เป็นพืชในเขตอบอุ่น (Rodriguez and Petrini, 1997) ราเอนโดไฟท์ที่พบเป็นครั้งแรกแยกได้จากสน (Lewis, 1924) ต่อมาจึงมีรายงานจากพืชอื่นๆ ทั้งจากเขตร้อนและเขตอบอุ่น เช่น พืชตระกูลเฟิร์น (Carroll and Carroll,

1978) ไม้พุ่ม พืชใบเลี้ยงคู่ (Arnold *et al.*, 2001; Chareprasert *et al.*, 2006.) พืชใบเลี้ยงเดี่ยว (Hata and Futai, 1996) และพืชในป่าชายเลน เช่น *Rhizophora* sp., *Aegiceras corniculatum*, *Avicennia marina*, *A. officinalis*, *Bruguiera cylindrica*, *Ceriops decandra*, *Excoecaria agallocha*, *Lumnitzera racemosa* (Suryanarayanan *et al.*, 1998, Kumaresan and Suryanarayanan, 2001)

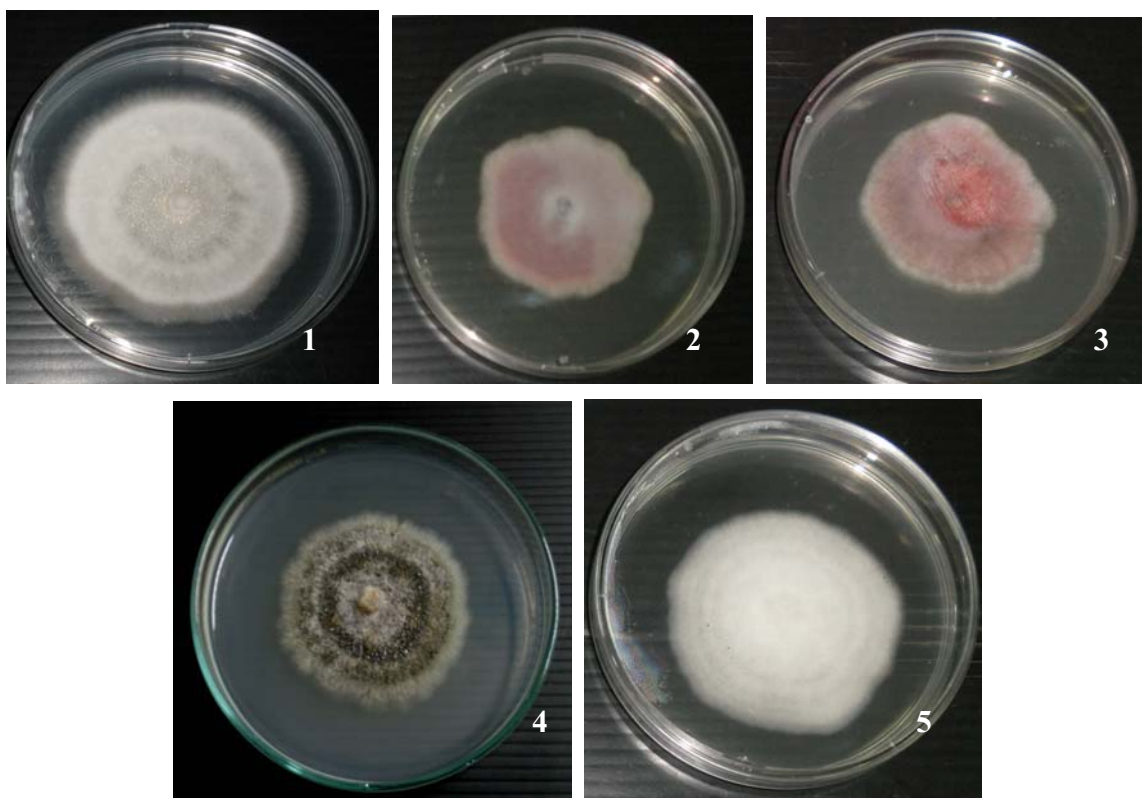
4. ราโรคพืช

จุลินทรีย์หลายชนิด รวมทั้งรา ก่อโรคในพืชและทำลายพืชผลทางการเกษตร ในที่นี้จะกล่าวถึง เฉพาะราโรคพืชที่ใช้ในการทดลอง

Pestalotiopsis (ภาพที่ 1/1) เป็นสาเหตุของโรคและก่อให้เกิดความผิดปกติหลายลักษณะในผักและผลไม้หลายชนิด (Snowdon, 1990) เป็นสาเหตุของโรคใบจุด (leaf spot) และโรคอื่น ๆ หลายชนิดในปาล์ม (Uchida, 2004) *P. mangiferae* เป็นสาเหตุของโรคใบจุดของพืช *Mangifera indica* ในประเทศอินเดีย (Rai, 1996)

Fusarium เป็นราที่สมาชิกในกลุ่มหลายสปีชีส์ก่อโรคพืช ตัวอย่างเช่น *Fusarium oxysporum* Schlecht. (ภาพที่ 1/2) มีหลายกลุ่ม หลาย forma specialist (Synder and Hansen, 1940) *F. oxysporum* Schlecht. f. sp. *phaseoli* เป็นสาเหตุของโรคเหี่ยว ในถั่วที่ปลูกในทวีปอเมริกาและทวีปยุโรป (Ribeiro and Hagedorn, 1979) *F. oxysporum* Schlecht. f. sp. *radicis-lycopersici* เป็นสาเหตุโรครากเน่าและเหี่ยวในมะเขือเทศ (Walker and Foster, 1946; Menzies *et al.*, 1990) ในประเทศไทยโรคเหี่ยวในแตงกวาและมะเขือเทศมีสาเหตุมาจาก *F. oxysporum* เช่นกัน (Srinon *et al.*, 2006) ส่วน *F. subglutinans* (ภาพที่ 1/3) เป็นสาเหตุโรครากเน่าในอ้อย

Colletotrichum มีอยู่หลายชนิด (species) เป็นสาเหตุของโรคแอนแทรคโนสในมะเขือเทศ ที่มีลักษณะแตกต่างกันขึ้นกับชนิดรา และพบระบาดทั่วไปทั้งในยุโรป เอเชีย และอเมริกาเหนือ (Sanago, 1997) นอกจากนี้ยังพบเป็นสาเหตุของโรคแอนแทรคโนสในผักและพืชเศรษฐกิจอื่นๆ หลายชนิด (Sanders and Korsten, 2003) ที่มีรายงานในต่างประเทศ เช่น *C. acutatum* เป็นสาเหตุโรคแอนแทรคโนสของอัลมอนต์ (Adaskaveg and Hartin, 1997) *C. capsici* (ภาพที่ 1/4) เป็นสาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพริก *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Penz and sacc. in Penz (ภาพที่ 1/5) เป็นสาเหตุของโรคแอนแทรคโนสในผลโอคาโด (Jeffries *et al.*, 1990) โรคแอนแทรคโนสในผลส้ม (Zulfikar *et al.*, 1996) สตรอเบอรี่ (Denoyes and Baudry, 1995) รวมทั้งผลไม้ในเขตร้อนและเขตอบอุ่นหลายชนิด (Adaskaveg and Hartin, 1997) ในประเทศไทยพบโรคแอนแทรคโนสในพริกเกิดได้ทั้งจาก *C. acutatum*, *C. capsici* และ *C. gloeosporioides* (Than *et al.*, 2008) *Colletotrichum* sp. สามารถทำความสูญเสียกับพืชผลในประเทศไทย ได้ถึงร้อยละ 60 (Somritthipol and Hyde, 2004)



ภาพที่ 1 ลักษณะโคโลนีของราโรคพืชบนอาหาร potato dextrose agar 1. *Pestalotiopsis* sp.; 2. *Fusarium oxysporum*; 3. *F. subglutinans*; 4. *Colletotrichum. capsici*; 5. *C. gloeosporioides*.

5. สารออกฤทธิ์ชีวภาพจากราและสารยับยั้งรา

สารออกฤทธิ์ชีวภาพเป็นสารประเภททุติยภูมิ (secondary metabolite) หมายถึงสารที่จุลินทรีย์รวมทั้งราสร้างขึ้นในสภาวะขาดสารอาหาร ภายใต้สภาวะทางเคมีและฟิสิกส์ที่เหมาะสม (Bu'lock, 1975) Gloer (1997) ประมาณว่าทุกๆ 6 ชนิด จาก 20 ชนิดของสารที่ใช้เป็นยากันทั่วไป ได้มาจากรา ในขณะที่ราที่รู้จักมีเพียงประมาณ 5 % จากที่ประมาณการไว้ว่าจำนวนราในโลกมีประมาณ 1.5 ล้านชนิด ในจำนวนนี้มีเพียง 69,000 ชนิดที่เป็นที่รู้จัก (Hawksworth, 1991, 2001) Kohlmeyer and Kohlmeyer (1979)

ประมาณการไว้ว่าจำนวนราทะเลมีประมาณ 1 % ของรากบก หรือประมาณ 1500 ชนิด สอดคล้องกับที่ Jones and Mitchell (1996) ประมาณการและ Hyde (1998) ประมาณการไว้โดยไม่นับรวมรากกลุ่มไลเคนส์ Hyde *et al.* (2000) และ Sakayaroj *et al.* (2004) รายงานราทะเลที่รู้จักแล้วเพียง 444 ชนิดและ 514 ชนิด ตามลำดับ จึงยังคงมีราและสาารออกฤทธิ์จากราอีกจำนวนมากที่รอการค้นพบ และแม้กระทั่งราที่ค้นพบ และเป็นที่รู้จักแล้ว ก็ยังมีน้อยชนิดที่มีการศึกษาถึงสาารออกฤทธิ์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการศึกษาสาารออกฤทธิ์จากราแหล่งใหม่ๆ เช่นราทะเล ราเอนโดไฟท์ และราเอนโดไฟท์จากพืชชายเลน

สาารทุติยภูมิส่วนใหญ่เป็นสาารออกฤทธิ์ทางชีวภาพซึ่งอาจเป็นสาารยับยั้งแบคทีเรีย สาารยับยั้งรา สาารยับยั้งไวรัส หรือสาารยับยั้งเซลล์มะเร็งและเนื้องอก การที่สาารทุติยภูมิที่ราผลิตขึ้นสัมพันธ์กับแหล่งอาหารในธรรมชาติ (ecological niche) และการมีปฏิสัมพันธ์ระดับ metabolite (metabolic interaction) ของรากับสิ่งแวดล้อมอาจมีผลให้ราสร้างสาารทุติยภูมิได้มากขึ้น (Schulz, 2002) ซึ่งราเอนโดไฟท์มีคุณสมบัติทั้งสองข้อนี้จึงเป็นแหล่งของสาารทุติยภูมิที่สำคัญแหล่งหนึ่ง Guan *et al.* (2005) เสนอว่าราเอนโดไฟท์มีระบบนิเวศที่มีลักษณะเฉพาะ ที่ทำให้ราที่อาศัยอยู่ต้องมีการปรับตัวและแข่งขันเพื่อการเจริญ ทำให้ต้องมีกลไกป้องกันตัวเองรวมทั้งมีการผลิตสาารต่างๆ ที่มีลักษณะเฉพาะและเป็นประโยชน์ต่อตัวราเองออกมา ป่าชายเลนเป็นตัวอย่างหนึ่งของระบบนิเวศที่มีแหล่งอาหารและสภาวะที่เหมาะสม มีลักษณะเฉพาะที่ทำให้ราที่อาศัยอยู่ต้องมีการปรับตัวและแข่งขันเพื่อการเจริญ ทำให้เป็นที่อยู่ของรากลากกลุ่ม Jones and Mitchell (1996) เสนอว่าราทะเลสร้างสาารได้ดี เนื่องจากอาศัยในสภาวะสิ่งแวดล้อมที่คงที่และมีสาารอาหารจำกัด คุณสมบัติที่สำคัญคือการขาดอาหารทำให้ต้องมีกลไกในการปรับตัวเพื่อการอยู่รอด

สาาร metabolite จากราที่พบในราทะเล ที่มีการรายงานระหว่างปี ค.ศ.1970 - 2002 มีจำนวน 222 ชนิด โดย 24 % และ 13 % เป็นสาารที่ได้จากราบนสาหร่ายทะเลและไม้ (Bugni and Ireland, 2004) จึงนับว่าราทะเลจากสาหร่ายและราทะเลจากไม้เป็นรา 2 แหล่งใหญ่ ที่พบมีการสร้างสาารออกฤทธิ์ชีวภาพ อย่างไรก็ตาม สาารจากราทะเลบนไม้ มีผู้ศึกษามากกว่า โดยเฉพาะในช่วง 10 ปีที่ผ่านมา (Miller, 2000; Jensen and Fenical, 2002) Daferner *et al.* (2002) ศึกษาสาาร Zopfiellamides A และ B จากราทะเล *Zopfiella latipes* ในการเป็นสาารยับยั้งจุลชีพ พบว่าสาาร Zopfiellamides A สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ ส่วนสาาร Zopfiellamides B สามารถยับยั้ง *Nematospora coryli* และ *Saccharomyces cerevisiae* Bringmann *et al.* (2003) พบราทะเล *Emericella varicolor* ที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำ สร้างสาาร evariquinone, isomericillin และ stromemycin Lin *et al.* (2005) รายงานการพบสาาร diaphorhelactone จากราทะเลในป่าชายเลน *Diaporthe* sp. Kasetrathat *et al.* (2008) รายงานการพบสาารยับยั้งพลาสมิเดียม และ cytotoxin จากราทะเล *Nodulisporium* sp. San-Martin *et al.* (2008) พบว่า *Geotrichum* sp. สายพันธุ์ที่แยกได้จากตะกอนทะเลสร้างสาาร sterols ได้ Saleem *et al.* (2007) สรุปประเภทของสาารออกฤทธิ์กลุ่มที่พบมาก จากราทะเล (marine – derived fungi) จำนวน 103 สาาร ซึ่งอยู่ในกลุ่ม polyketide, isoprene hybrids, terpenoids, nitrogenous compounds (alkaloids, peptides) และ cerebroside analogues

เอนโดไฟต์ทั้งจากพืชบกและพืชชายเลนเป็นแหล่งของสาร natural products ชนิดใหม่ ๆ เช่นกัน (Guo *et al.*, 2008; Jones *et al.*, 2008) Schmeda-Hirschmann *et al.* (2005) รายงานการสร้าง secondary metabolite ชนิดใหม่ 2 ชนิด จากราเอนโดไฟต์ 2 ชนิด คือ *Penicillium janczewskii* และที่ไม่สามารถจัดจำแนกได้อีก 1 ชนิด ที่หมักใน potato dextrose broth Sutjaritvorakul *et al.* (2011) ศึกษาเอนโดไฟต์ในประเทศไทย พบว่าสารออกฤทธิ์ที่ราผลิตได้ สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบหลายชนิด รวมทั้งยีสต์ *Candida albicans* โดยยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ Zhang *et al.* (2007) รายงานอนุพันธ์ชนิดใหม่ของ naphthoquinoneimine ที่สร้างโดย *Aspergillus niger* สายพันธุ์ที่เป็นเอนโดไฟต์ในสาหร่ายทะเล ตัวอย่างสารที่ราเอนโดไฟต์ผลิตได้แก่สารประเภท terpenoids, steroids, xanthenes, chinones, phenols, isocoumarins, benzopyranones, tetralones, cyclocharasine และ enniatines (Schulz, 2002)

ปัจจุบันยังมีรายงานสารออกฤทธิ์ชนิดใหม่ ที่ผลิตได้จากเอนโดไฟต์และราทะเลอย่างต่อเนื่อง ส่วนเอนโดไฟต์จากพืชชายเลน เริ่มเป็นที่สนใจเมื่อไม่นานมานี้ในฐานะแหล่งใหม่ที่สำคัญของสารออกฤทธิ์ชีวภาพ (Pan *et al.*, 2008) ตัวอย่างสารออกฤทธิ์ชีวภาพอื่นๆ จากราทะเลและเอนโดไฟต์จากพืชชายเลน แสดงใน ตารางที่ 1 และตารางที่ 2 ตามลำดับ

สารยับยั้งราเป็นสารที่มีฤทธิ์ฆ่าราหรือยับยั้งการเจริญของรา รวมถึงยับยั้งการงอกของเส้นใยรา (Cristensen, 1996; Istifadah *et al.*, 2006) สารยับยั้งราชนิดแรกที่ถูกค้นพบ คือ griseofulvin ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของรา แยกได้จากรา *Penicillium griseofulvum* ในดิน (Oxford *et al.*, 1939) สารยับยั้งราชนิดที่สองที่ถูกค้นพบคือ cyclohexamide จากแอคติโนมัยซีต *Streptomyces griseus* (Whiffen *et al.*, 1946) มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของราเช่นเดียวกัน ทั้ง griseofulvin และ cyclohexamide เป็นสารในกลุ่ม polyene macrolide amphopterin B เป็นสารยับยั้งราที่ถูกพบต่อมา เป็นสารกลุ่ม polyene macrolide เช่นกัน และผลิตเพื่อการค้าในปี 1957 ส่วนสารที่มีฤทธิ์ฆ่าราพบในปี 1970 เป็นสารในกลุ่ม lipopeptides นับจากนั้นมามีรายงานการค้นพบและค้นพบสารฆ่ารากรุ่นอื่นๆ ที่ออกฤทธิ์กว้างและปลอดภัยจากทรัพยากรต่างๆ ในธรรมชาติ ทั้งพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ เพิ่มขึ้น

เช่นเดียวกับการหาสารออกฤทธิ์ชีวภาพที่เป็นสารประเภททุติยภูมิ ราทะเลและเอนโดไฟต์เป็นแหล่งที่มีรายงานการค้นพบสารยับยั้งราชนิดใหม่หลากหลายชนิด Nagai *et al.* (2002) รายงานการค้นพบสารยับยั้งราซึ่งเป็นสารประกอบ lactone ชนิดใหม่จากราทะเล *Phoma* sp. Q60596 ยานี้สามารถยับยั้งการเจริญของ *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* และ *Aspergillus fumigatus* ได้ สารยับยั้งราจากเอนโดไฟต์ยังถูกนำมาใช้เป็นสารยับยั้งราโรคพืชชนิดต่างๆ (Liu *et al.*, 2001, Park *et al.*, 2005, Kim *et al.*, 2007)

ตารางที่ 1 ตัวอย่างราทะเลและสารออกฤทธิ์ชีวภาพที่ราผลิตขึ้น

ราทะเล	แหล่งที่อยู่	กิจกรรม	ประเภทสารออกฤทธิ์	อ้างอิง
<i>Helicascus kanaloanus</i>			Helicascoides A and B	Poch and Gloer, 1989
<i>Microascus longirostris</i>	marine sources	enzyme inhibitor	Epoxysuccinates 1,2, 3	Yu <i>et al.</i> , 1995
<i>Kallichroma tethys</i>		antifungal	Isoculmorin	Alam <i>et al.</i> , 1996
<i>Corollospora maritima</i>	sand grain	antibacterial	Corollosporine	Liberra <i>et al.</i> , 1998
<i>Halorosellinia oceanica</i>			Halorosellins A and B	Kittakoop <i>et al.</i> , 2002
<i>Verruculina enalia</i>	mangrove			Lin <i>et al.</i> , 2002
<i>Cladosporium</i> sp.	marine	antibiotic	α , β -unsaturated Aldehydes	Gallo <i>et al.</i> , 2004
<i>Leptosphaeria oraemaris</i>	marine		degraded Polyketidic lactone	Guerriero, 2004
<i>Diaporthe</i> sp.	mangrove	cytotoxic and antimicrobial	Diaporthelactone	Lin <i>et al.</i> , 2005
<i>Massarina</i> sp.	marine mud		Spiromassaritone, Massriphenone	Abdel-Wahab <i>et al.</i> , 2007
<i>Botrytis</i>	marine	enzyme inhibitor	α - Pyrone derivative	Zhang <i>et al.</i> , 2007
<i>Geotrichum</i> sp.	marine sediment		Sterol	San-Martin <i>et al.</i> , 2008
<i>Varicosporina ramulosa</i>	marine	cytotoxic and antimicrobial	N-dibutylphthalate, Ergosterol derivative	Mabrouk <i>et al.</i> , 2008
<i>Aspergillus</i> sp.	seawater	antimicrobial	Asperxanthone, Asperbihenyl	Wu <i>et al.</i> , 2009
<i>Aspergillus ustus</i>	marine		Sesquiterpenoids	Lu <i>et al.</i> , 2009

ตารางที่ 2 ตัวอย่างราเอนโดไฟท์จากพืชชายเลนและสารออกฤทธิ์ชีวภาพที่ราผลิตขึ้น

ราเอนโดไฟท์	แหล่งที่อยู่	กิจกรรม	ประเภทสารออกฤทธิ์	อ้างอิง
Unidentified 1893	<i>Kandelia candel</i>	cytotoxic	Lactone, 5-(p-hydroxy Benzyl)hydantoin), Cyclodipeptide	Chen <i>et al.</i> , 2003
Unidentified 1893	<i>Kandelia candel</i>	cytotoxic	Isochroman	Chen <i>et al.</i> , 2006
<i>Guignardia</i> sp.	marine mangrove plant		Vermistatin	Xia <i>et al.</i> , 2007
<i>Eurotium rubrum</i>	<i>Hibicus tiliaceus</i>		Benzaldehyde	Li <i>et al.</i> , 2008
<i>Penicillium</i> sp.	<i>Aegiceras comiculatum</i>	cytotoxic	Tetramic acid derivatives	Lin <i>et al.</i> , 2008
<i>Nodulisporium</i> sp.		anticancer, antiplasmodium	Nodulisporacid A	Kasettrathat <i>et al.</i> , 2008
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	<i>Rhizophora mucronata</i>		Cytosporones, Courmarins, Alkaloid	Xu <i>et al.</i> , 2009
<i>Aspergillus flavipes</i>	<i>Acanthus ilicifolius</i>	cytotoxic	Cytochalasins	Lin <i>et al.</i> , 2009
<i>Fusarium</i> sp.	marine endohyte		Anthraquinone	Shao <i>et al.</i> , 2010
<i>Halorosellinia</i> sp.	mangrove endophyte	anticancer	Anthracenedione	Zhang <i>et al.</i> , 2010
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	<i>Rhizophora mucronata</i>		Polyketide	Xu <i>et al.</i> , 2011

การสร้าง secondary metabolite ของราต้องอาศัยปัจจัยที่เหมาะสมหลายชนิด เช่นชนิดและปริมาณ สารอาหาร pH อุณหภูมิ และปริมาณออกซิเจน (Jensen and Fenical, 2000) แต่การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของราทะเลในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมีไม่มากนัก มีรายงานว่า ความเค็ม อุณหภูมิ และปริมาณออกซิเจน เป็นสิ่งจำเป็นมากนอกเหนือจากสารอาหาร และ pH (Miller, 2000) แต่ในหลายๆ ครั้ง มีการรายงานค่าหรือปัจจัยที่เหมาะสมแตกต่างกันไปขึ้นกับชนิดของราที่ศึกษา ตัวอย่างเช่น Abbanant *et al.* (1998) และ Motti *et al.* (2007) พบว่าการหมักราเพื่อให้ได้สารออกฤทธิ์ชีวภาพทำใน น้ำกลั่นดีกว่าน้ำทะเล ขณะที่นักวิจัยอื่นๆ ใช้อาหารที่เตรียมจากน้ำทะเลในการหมักราในกลุ่มอะนามอร์ฟ *Cladosporium* sp., *Periconia* sp. และ *Geotrichum* sp. อย่างได้ผลดี (Gallo *et al.*, 2004; Yamada, 2004; San-Martin *et al.*, 2008) และ Abdel- Wahab *et al.* (2007) เลี้ยงราแอสโคมัยซีส *Massarina* sp. ให้ผลิต สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในน้ำทะเล Abbanant *et al.* (1998) รายงานฤทธิ์ของสารสกัดยับยั้งราจากรา ทะเล *Hypoxylon oceanicum* LL-156256 ที่แยกได้จากไม้ในป่าชายเลนประเทศจีน จากการหมักที่ ความเข้มข้นน้ำทะเลต่าง ๆ กันรวมทั้งน้ำกลั่น พบว่าการหมักเพื่อให้ได้สารออกฤทธิ์ ควรทำในน้ำกลั่น ที่อุณหภูมิ 28°C เนื่องจากพบว่าการหมักในน้ำทะเลที่อุณหภูมิต่ำมีแนวโน้มว่าการยับยั้ง การสะสมสาร ออกฤทธิ์ของราได้ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าสารออกฤทธิ์จากราทะเลสามารถผลิตได้ในสภาวะ static หรือที่เรียกว่า still culture คือตั้ง culture ไว้โดยไม่ต้องมีการเขย่า (Zhang *et al.*, 2007) สารประกอบ secondary metabolite ต่างชนิดกันที่ผลิตจากราสายพันธุ์เดียวกัน ต้องการปัจจัยทางกายภาพต่างๆ ในการ สร้างแตกต่างกัน สารประกอบ n- Dibutylphthalate ซึ่งมีฤทธิ์ต้านรา *Fusarium solani* ที่รา *Varicosprina ramulosa* สร้างขึ้นจะสร้างได้ดีที่สุดในสภาวะ อาหารเลี้ยงเชื้อ MS (Malt extract) pH 6 เวลา 8 วัน อุณหภูมิ 24° C โดยอัตราการให้อากาศมีผลไม่แตกต่างกันมากนัก (Mabrouk *et al.*, 2008)

เนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญมาก ในการกระตุ้นการสร้าง secondary metabolite ส่วนใหญ่ราทะเลจะสร้างสารยับยั้งได้ เมื่อเข้าสู่สภาวะขาดอาหารและเชื้อหยุดการเจริญแล้ว Miller (2000) รายงานความสามารถในการสร้างสาร secondary metabolite ของราทะเลในห้องปฏิบัติการ ว่าต้องการสภาวะที่มีแหล่งไนโตรเจนจำกัด ขณะที่ราทะเลบางชนิดสร้าง secondary metabolite เมื่อมี แหล่งคาร์บอนจำกัด Platas *et al.* (1998) รายงานว่าการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่สมบูรณ์แต่เจือจางเป็นวิธีที่ เหมาะสม เช่นเดียวกับปัจจัยอื่นๆ การเลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อราทะเลมีความหลากหลายแตกต่างกันไป ทั้งที่ใช้สารอาหารที่สมบูรณ์และสารอาหารที่มีแหล่งอาหารจำกัด โดยเฉพาะอย่างยิ่งแหล่งไนโตรเจน และคาร์บอน ตัวอย่างอาหารที่ใช้เลี้ยงราทะเล แสดงในตารางที่ 3 ซึ่ง carbon source ส่วนใหญ่จะเป็น glucose ขณะที่สารที่ใช้เป็น nitrogen source จะมีหลากหลาย เช่น yeast extract, peptone, soytone, malt extraxt และมีทั้งที่เตรียมด้วยน้ำทะเลและน้ำกลั่น

ตารางที่ 3 ตัวอย่างชนิดอาหารและสารอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงไรทะเลเพื่อสกัดสารออกฤทธิ์ชีวภาพ

ชนิดอาหาร	กลุ่ม/ชนิดราที่เลี้ยง	แหล่งคาร์บอน	แหล่งไนโตรเจน	สารอื่นๆ	แหล่งน้ำ	อ้างอิง
1. PDB	<i>Massarina tunicata</i>	dextrose 20g/l	potato infusion	-	distilled water	Oh <i>et al.</i> , 1999
2. MS	<i>Varicosporina ramulosa</i>	no data	malt extract 30 g/l peptone 3 g/l	-	80% seawater	Mabrouk <i>et al.</i> , 2008
3. YMG	<i>Massarina</i> sp.	glucose 10 g/l	yeast extract 4 g/l, malt extract 10 g/l	-	seawater	Abdel-Wahub <i>et al.</i> 2007
4. high nutrient	449 marine	dextrose 10 g/l	yeast extract 4 g/l, malt extract 10 g/l	-	seawater	Motti <i>et al.</i> , 2007
5. low nutrient	449 marine	dextrose 2 g/l	yeast extract 0.1 g/l, malt extract 0.2 g/l	-	seawater	Motti <i>et al.</i> , 2007
6. Sabouraud maltose	<i>Hypoxylon oceanicum</i>	glucose 10g/l, maltose 10 g/l	peptone from casein 5.g/l peptone from meat 5 g/l	-	distilled water, seawater	Abbanat <i>et al.</i> , 1998
7.GSP	no data	10 g/l glycerol	soy peptone 5g/l	CaCO ₃ 1 g/l	distilled water, seawater	Abbanat <i>et al.</i> , 1998
8. no data	<i>Periconia</i> sp.	glucose 1%	malt extract 10 g/l, peptone 0.5 g/l	-	artificial seawater	Yamada <i>et al.</i> , 2004
9. no salt medium	no data	dextrose 2 g/l	yeast extract 1 g/l, malt extract 2 g/l	-	deionized water	Motti <i>et al.</i> , 2007
10. no data	<i>Microascus</i> sp.	2% mallases, 3% dextrin	1.5% fish meal, 1.5% protein hydrolysate	-	-	Yu <i>et al.</i> ., 1995
11. enriched seawater	<i>Kallichroma tethys</i>	no data	no data	no data	no data	Alam <i>et al.</i> , 1996
12. no data	<i>Borytis</i>	soluble starch 1%	soytone 0.1%	no data	seawater	Zhang <i>et al.</i> , 2007

6. การศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างรากกับราโรคพืชและการยับยั้งราโรคพืช

การศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างรากกับราโรคพืช ทำได้ทั้งในธรรมชาติและในห้องปฏิบัติการ แต่เนื่องจากการศึกษาในธรรมชาติทำได้ยากกว่า (Istifadah *et al.*, 2006) การศึกษาส่วนใหญ่จึงนิยมทำในห้องปฏิบัติการ โดยเลี้ยงรา 2 สายพันธุ์บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อเดียวกัน (dual culture) (Shearer and Zare-Maivan, 1988; Srinon *et al.*, 2006) อาศัยหลักการที่พบจาก ในธรรมชาติว่า ราตั้งแต่ 2 สายพันธุ์ที่เจริญในที่เดียวกันจะแข่งขันกันเพื่อแย่งทรัพยากรที่มีอยู่จำกัด (interference competition) และหากมีผลให้การเจริญของอีกฝ่ายหนึ่ง (ปรปักษ์) เปลี่ยนไปจากเดิม จะเรียกว่าเกิดภาวะต่อต้านกัน (antagonist) กลไกที่ราใช้มี 2 กลไกคือ กรณีการต้านกันเกิดเมื่อราทั้ง 2 ฝ่ายเจริญมาสัมผัสกันเรียก direct antagonist แต่ถ้าการต้านกันเกิดตั้งแต่ราทั้งสองสายพันธุ์อยู่ห่างกัน จากการที่ฝ่ายหนึ่งสร้างเมตาบอไลต์แพร่มาสู่ราอีกสายพันธุ์หนึ่ง จะเรียกว่าเกิดภาวะ indirect antagonism หรือ antibiosis (Dix and Webster, 1995)

ลักษณะการศึกษการยับยั้งการเจริญราโรคพืชอีกอย่างหนึ่ง ที่ทำกันโดยทั่วไปในห้องปฏิบัติการคือการสกัดสารเมตาบอไลต์จากตัวราหรืออาหารเลี้ยงเชื้อที่สนใจ แล้วนำมายับยั้งราโรคพืชบนจานอาหารหรือในอาหารเหลว ซึ่งหากยับยั้งได้จะสรุปว่าสารสกัดนั้นมี antifungal activity

7. การควบคุมโรคพืชที่มีสาเหตุจากรา

การควบคุมโรคพืชที่มีสาเหตุจากราทำได้หลายวิธี เช่นการควบคุมทางชีวภาพโดยใช้จุลินทรีย์ประเภทต่าง ๆ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นราและการใช้สารฆ่ารา การใช้สารฆ่าราให้ผลดีเมื่อสารนั้นมีฤทธิ์เป็น systemic fungicide เนื่องจากเมื่อใส่ลงในดินพืชจะสามารถดูดซึมไปยังบางส่วนของพืช เช่นใบแก่ ได้ดี ขณะที่ใบอ่อน ดอก และผล จะดูดซึมสารได้เพียงบางส่วน แต่ข้อเสียคือสารเหล่านี้มักจะออกฤทธิ์ดีกับราที่เป็นสาเหตุโรคพืชเพียงชนิดใดชนิดหนึ่งเท่านั้น ในขณะที่พืชผลในฟาร์มหนึ่ง ๆ มีโอกาสถูกทำลายด้วยราหลายชนิด เกษตรกรจึงจำเป็นต้องใช้สารฆ่าราหลายๆ ชนิดพร้อมกัน จึงมีการศึกษาเพื่อหาสารฆ่าราตั้งแต่ 2 ชนิด ซึ่งออกฤทธิ์เสริมกัน ซึ่งจะทำให้ราคือต่อสารฆ่าราช้าลง (Lorbeer, 1996) การศึกษาการควบคุมโรคพืชที่สนใจกันในระยะหลังเป็นการควบคุมทางชีวภาพ มีการสำรวจและรายงานจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆ และสารออกฤทธิ์ชีวภาพที่มีประสิทธิภาพใหม่ๆ อยู่เป็นระยะๆ

การควบคุมราก่อโรคพืชในระยะที่ผ่านมาศึกษากันอย่างกว้างขวางในราที่แยกจากดิน *Trichoderma virens* จำนวน 13 สายพันธุ์ สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใย *Alternaria brassicicola* สายพันธุ์ก่อโรคได้ และเมื่อทดสอบสารสกัดจาก *T. virens* กับสปอร์ของ *A. brassicicola* พบการงอกของสปอร์ *A. brassicicola* เพียง 9.4% ขณะที่ชุดควบคุม พบการงอกของสปอร์ ได้ถึง 98.5% สารสกัดจากราใช้ได้ผลดีทั้งในระดับห้องปฏิบัติการและในแปลงทดลอง (Intana *et al.*, 2005) Srinon *et al.* (2006) พบว่า virulence activity ต่อพืช ของ *Fusarium* 2 สายพันธุ์ ถูกยับยั้งเมื่อนำไปเลี้ยงร่วมกับราอื่นๆ โดย

วิธี dual-culture รา antagonist เหล่านี้สามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ และสารสกัดจากรา antagonist ทั้งหมดสามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ของราโรคพืชได้เช่นเดียวกัน ราบางชนิดยังมีการสร้างสารที่เป็นสารระเหย ที่ยับยั้งราก่อโรคราแป้ง (Koita-bashi and Tsushima, 2007) การศึกษาความเป็นไปได้ของการใช้ราเอนโดไฟท์ *Chaetomium* หลายสปีชีส์ (Istifadah *et al.*, 2006) และราทะเล *Myrothecium* sp. ที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำ *Axinella* ในการยับยั้งราแอสโคมัยซิส *Sclerotinia sclerotiorum* สาเหตุโรคพืชโดยวิธี antagonist พบว่าให้ผลยับยั้ง *S. sclerotiorum* ได้ดีเช่นเดียวกับการใช้สารสกัด (Xie *et al.*, 2008) และมีรายงานว่าราเอนโดไฟท์จากพืชชายเลนสามารถยับยั้งราโรคพืช *Alternaria brassicae* ได้ (Gao *et al.*, 2011)

บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์และวิธีทดลอง

1. ชนิดราที่ใช้ในการทดลอง

การทดลองนี้เป็นการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งของราทะเลและราเอนโดไฟท์ ซึ่งจะเรียกรวมกันว่าราทดสอบในการยับยั้งราโรคพืช ราเหล่านี้ได้แก่

1.1 ราทะเลไฟลัม Ascomycota รวมถึงอะนามอร์ฟจากพืชและไม้ป่าชายเลน จำนวน 65 สายพันธุ์ (ตารางที่ 4) และราเอนโดไฟท์ แยกจากใบพืชชายเลน จำนวน 36 สายพันธุ์ (ตารางที่ 5) ที่เก็บรักษาไว้ ณ ภาควิชา จุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จ. ชลบุรี และที่แยกเพิ่มเติมในการศึกษานี้ ราทะเลส่วนใหญ่เป็นราที่เจริญได้ช้า ให้เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีประมาณ 0.5-1 เซนติเมตร เมื่อเลี้ยงบนอาหาร potato dextrose เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ราเอนโดไฟท์ส่วนใหญ่เจริญเร็ว ให้เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีประมาณ 6 เซนติเมตรหรือมากกว่า เมื่อเลี้ยงบนอาหาร potato dextrose เป็นเวลา 1 สัปดาห์

1.2 ราโรคพืชจำนวน 5 ชนิด เป็นราสาเหตุโรคพืชในผักและผลไม้ ซึ่งเป็นพืชเศรษฐกิจของไทย ที่พบได้บ่อย 5 ชนิด ได้แก่ *Colletotrichum capsici* DoAC 1511, *C. gloeosporioides* DoAC 0782, *Fusarium oxysporum* DoAC 1808, *F. subglutinans* DoAC 0761 และ *Pestalotiopsis* sp. DoAC 1098 ใช้เป็นตัวแทนในการตรวจผลการยับยั้ง โดย 2 สายพันธุ์แรก ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศ.ดร. วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด และรา 3 สายพันธุ์หลัง จัดซื้อจากกรมวิชาการเกษตร

2. การเตรียมหัวเชื้อ

นำราทะเลที่เก็บรักษาไว้ จาก stock culture ในพาราฟิน เลี้ยงบนอาหาร potato dextrose agar (PDA, Difco) เตรียมจากน้ำทะเล (seawater, sw) จากเกาะแสมสาร จ. ชลบุรี (ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชา วาริชศาสตร์ ม. บูรพา) ปรับให้ค่าความเค็มเท่ากับ 15 practical salinity unit (psu) ส่วนราเอนโดไฟท์และราโรคพืช เลี้ยงบนอาหาร potato dextrose agar (PDA, Difco) ที่เตรียมด้วยน้ำกลั่น (distilled water, dw) บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-14 วัน ใช้ cork borer (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร) เจาะวุ้นบริเวณขอบโคโลนี นำมาเลี้ยงซ้ำบนอาหารเดิมที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-14 วัน

ตารางที่ 5 ราเอนโดไฟท์ที่นำมาศึกษา

ราเอนโดไฟท์	ราเอนโดไฟท์
1. unidentified BUEN 801	19. unidentified BUEN 820
2. unidentified BUEN 802	20. unidentified BUEN 823
3. unidentified BUEN 803	21. unidentified BUEN 827
4. unidentified BUEN 804	22. unidentified BUEN 828
5. unidentified BUEN 805	23. unidentified BUEN 829
6. unidentified BUEN 806	24. unidentified BUEN 830
7. unidentified BUEN 807	25. unidentified BUEN 831
8. unidentified BUEN 808	26. unidentified BUEN 832
9. *unidentified BUEN 809	27. unidentified BUEN 833
10. unidentified BUEN 810	28. unidentified BUEN 834
11. unidentified BUEN 811	29. unidentified BUEN 835
12. unidentified BUEN 812	30. unidentified BUEN 836
13. unidentified BUEN 813	31. unidentified BUEN 837
14. unidentified BUEN 814	32. unidentified BUEN 841
15. unidentified BUEN 815	33. *unidentified BUEN 842
16. unidentified BUEN 816	34. unidentified BUEN 843
17. unidentified BUEN 817	35. unidentified BUEN 844
18. unidentified BUEN 819	36. unidentified BUEN 845

* เป็นราเจริญเร็วปานกลาง ให้เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีประมาณ 4-5 เซนติเมตร เมื่อเลี้ยงบนอาหาร potato dextrose เป็นเวลา 1 สัปดาห์

3. อาหารเลี้ยงเชื้อและการเลี้ยงเชื้อ

การเลี้ยงราทะเล และราโรคพืช ไม่ว่าจะเลี้ยงในน้ำกลั่นหรือน้ำทะเลไม่มีผลต่อการเจริญของรา เมื่อเปรียบเทียบระหว่างอาหารสูตรเดียวกัน ในการเลี้ยงราทะเลเพื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งราโรคพืชจึงเลี้ยงในจานอาหารเดียวกันได้ และผลยับยั้งจะมาจากตัวราทดสอบไม่ได้มาจากความแตกต่างของน้ำที่เตรียม ดังนั้นอาหารเลี้ยงเชื้อราที่ใช้ในการศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างราทะเลและราโรคพืชจึงมี 8 ชนิด คือ potato dextrose agar (PDA), Sabouraud agar (SBA), yeast malt glucose agar (YMG) และ low nutrient agar

(LNA) เตรียมจากน้ำกลั่นและน้ำทะเลที่มีค่าความเค็มในธรรมชาติประมาณ 33-37 psu (Dix and Webster, 1995) (ค่าความเค็มที่วัดได้เป็นผลมาจากแร่ธาตุต่างๆ ที่เป็นองค์ประกอบ โดยมี NaCl เป็นองค์ประกอบหลัก) อาหารที่ใช้ในการศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างราเอนโดไฟท์และราโรคพืชเป็นอาหารแข็งสูตรเดียวกันแต่เตรียมจากน้ำกลั่น อาหารที่เลี้ยงราเพื่อสกัดสาร (production media) เป็นอาหารสูตรเดียวกันแต่ไม่เติมวุ้น (broth media) อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้รวมทั้งสารอาหารที่นำมาใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนทั้งหมดจัดซื้อจาก Difco สูตรอาหารทั้ง 8 สูตรแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งราโรคพืช

ชนิดอาหารแข็ง	แหล่งคาร์บอน	แหล่งไนโตรเจน	แหล่งน้ำ	ชนิดอาหารเหลว
PDA _{dw}	dextrose 20g/l	potato infusion 200g/l	distilled water	PDB _{dw}
PDA _{sw}	dextrose 20g/l	potato infusion 200g/l	seawater	PDB _{sw}
SBA _{dw}	dextrose 20g/l	peptone from casein 5.g/l peptone from meat 5 g/l	distilled water	SBB _{dw}
SBA _{sw}	dextrose 20g/l	peptone from casein 5.g/l peptone from meat 5 g/l	seawater	SBB _{sw}
YMG _{dw}	glucose 10 g/l	yeast extract 4 g/l, malt extract 10 g/l	distilled water	YMGB _{dw}
YMG _{sw}	glucose 10 g/l	yeast extract 4 g/l, malt extract 10 g/l	seawater	YMGB _{sw}
LNA _{dw}	dextrose 2 g/l	yeast extract 0.1 g/l, malt extract 0.2 g/l	distilled water	LNB _{dw}
LNA _{sw}	dextrose 2 g/l	yeast extract 0.1 g/l, malt extract 0.2 g/l	seawater	LNB _{sw}

หมายเหตุ การเตรียมอาหารแข็งจะเติมวุ้น (Difco) 1.5%

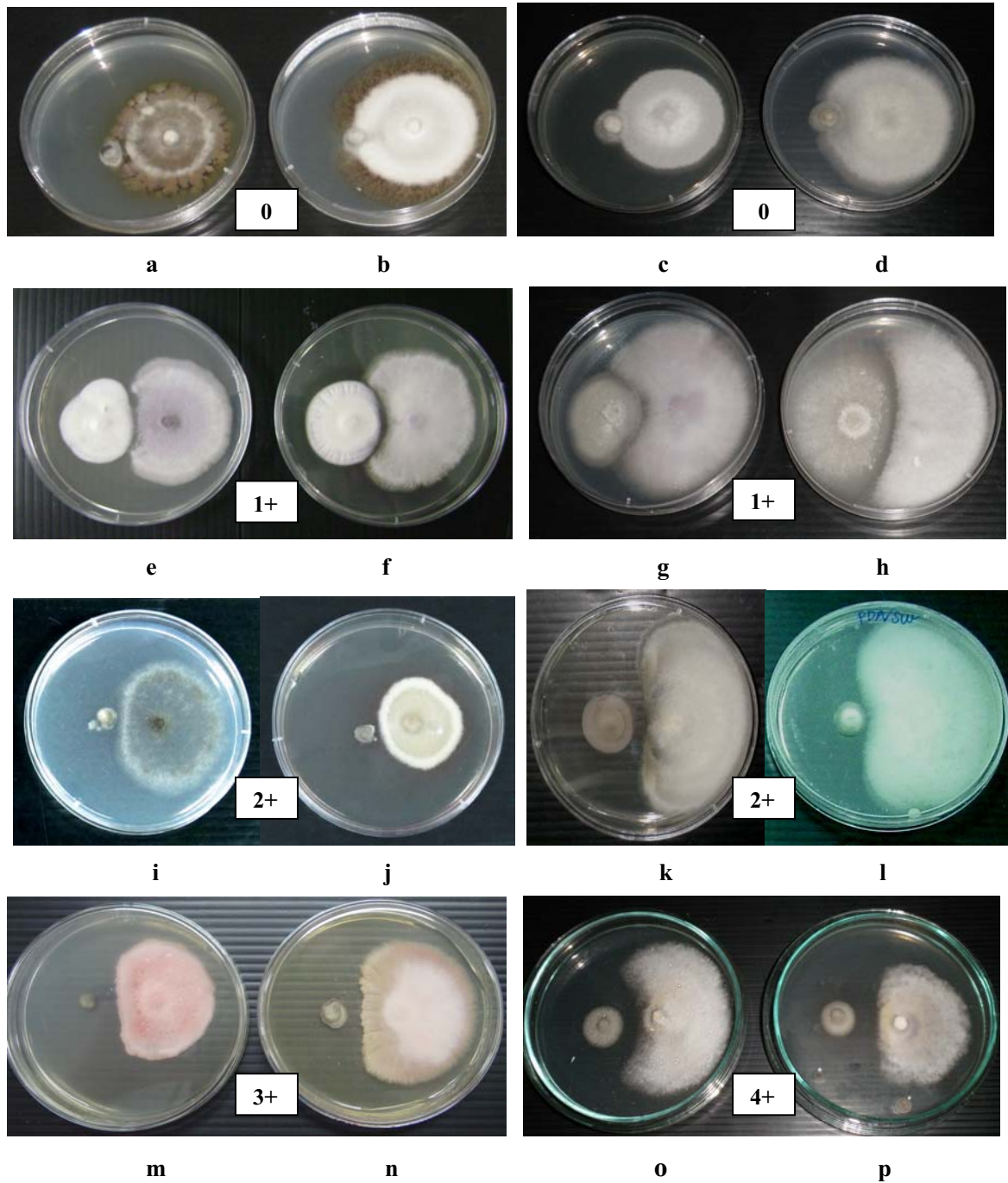
4. การศึกษาปฏิสัมพันธ์รูปแบบ antibiosis ระหว่างราทดสอบกับราโรคพืชโดยวิธี dual culture

ใช้ cork borer (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร) เจาะรูบนบริเวณขอบโคโลนีของราทะเลที่ต้องการตรวจสอบหาสารยับยั้ง นำมาเลี้ยงร่วมกับราโรคพืช โดยวิธี dual culture บนอาหาร 4 ชนิดที่เตรียมด้วย น้ำกลั่นและน้ำทะเล (ราเอนโดไฟท์เลี้ยงบนอาหารเดียวกันแต่ใช้เฉพาะน้ำกลั่น) อาหารที่ใช้ได้แก่ potato dextrose agar (PDA, Difco), Sabouraud agar (SBA, Difco), yeast malt glucose agar (YMG, yeast extract 4 g/l, malt extract 10 g/l, glucose 10 g/l) และ low nutrient agar (LNA) ที่ประกอบด้วย yeast extract 0.1 g/l, malt extract 0.2 g/l, glucose 2 g/l. (Motti, 2007) นำชิ้นรูนของราทั้งสองชนิดมาวางห่างกัน ประมาณ 2.5 เซนติเมตร (Shearer and Zare-Maivan, 1988) ในกรณีราทะเลที่เจริญช้าจะเลี้ยงราทะเลก่อน ประมาณ 3-4 วัน บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-7 วัน สังเกตผลปฏิสัมพันธ์แบบ antibiosis โดยสังเกตการถูกยับยั้งการเจริญของราโรคพืชในวันที่ 4 กรณีที่เลี้ยงร่วมกับราทดสอบที่เจริญเร็ว (ส่วนใหญ่เป็นราเอนโดไฟท์) หรือในวันที่ 7 กรณีที่เลี้ยงร่วมกับราทดสอบที่เจริญช้า (ส่วนใหญ่เป็นราทะเล) บันทึกการเกิด antibiosis เป็น 4 ระดับ ดังนี้ ผลลบ (0) ไม่เกิด antibiosis หรือให้ผลบวกไม่ชัดเจน 1+ ผลบวกอ่อน คือระยะถูกยับยั้ง ≤ 2 มิลลิเมตร 2+ ผลบวก ปานกลาง ระยะถูกยับยั้ง $>2 - \leq 6$ มิลลิเมตร 3+ ผลบวกแรง ระยะถูกยับยั้ง $>6 - \leq 10$ มิลลิเมตร 4+ ผลบวกแรงมาก ระยะถูกยับยั้ง >10 มิลลิเมตร ตัวอย่างผลบวกระดับต่างๆ แสดงในภาพที่ 2

5. การเตรียมหัวเชื้อและสารสกัด

ใช้ cork borer เจาะบริเวณขอบโคโลนี มาเลี้ยงซ้ำบนอาหาร PDA ที่เตรียมจากน้ำทะเลหรือน้ำกลั่น ตามประเภทของราที่ศึกษา บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-14 วัน ใช้ cork borer (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร) เจาะบริเวณขอบโคโลนี 5 ชิ้น ใส่ในอาหาร production medium 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยเลี้ยงทั้งหมด 2 ขวด ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 25-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 14 วัน และ 28 วัน เมื่อครบกำหนดแล้วนำมากรองด้วยกระดาษกรอง เพื่อแยกส่วนของน้ำหมักและเส้นใยออกจากกัน นำน้ำหมักของราที่ได้ มาแยกสกัดด้วยสารละลาย ethanol และตามด้วย ethyl acetate หลังจากนั้นนำไปเพิ่มความเข้มข้นโดยเครื่อง evaporator ละลายสารสกัดที่ได้มาจากอาหาร 100 มิลลิลิตร ด้วย 0.5 % dimethylsulfoxide (DMSO) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

เลือกสารสกัดให้ผลดีมาเลี้ยงซ้ำในสภาวะเดิม แต่นำน้ำหมักของราที่ได้ มาสกัดด้วยสารละลาย ethyl acetate อย่างเดียว แล้วทำการทดสอบเช่นเดียวกับสารที่สกัดด้วยสารละลาย ethanol และตามด้วย ethyl acetate



ภาพที่ 2 ระดับของปฏิสัมพันธ์ ที่เกิดเมื่อเลี้ยงราทะเล (โคโลนีด้านซ้ายของจานอาหาร) ร่วมกับราโรคพืช (โคโลนีด้านขวาของจานอาหาร) โดยวิธี dual culture: a-d. ไม่เกิดปฏิสัมพันธ์แบบ antibiosis, e-h. ปฏิสัมพันธ์แบบ antibiosis ระดับอ่อน 1+ ระยะถูกยับยั้ง ≤ 2 มิลลิเมตร; i-l. ปฏิสัมพันธ์แบบ antibiosis ระดับปานกลาง 2+ ระยะถูกยับยั้ง $> 2 - \leq 6$ มิลลิเมตร; m, n. ปฏิสัมพันธ์แบบ antibiosis ระดับแรง 3+ ระยะถูกยับยั้ง $> 6 - \leq 10$ มิลลิเมตร; o, p. ปฏิสัมพันธ์แบบ antibiosis ระดับแรงมาก ระยะถูกยับยั้ง > 10 มิลลิเมตร

6. การทดสอบความสามารถของสารสกัดในการยับยั้งการงอกของสปอร์ของราโรคฟิช

นำราโรคฟิชเลี้ยงบนอาหาร PDA slant บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 วัน แขนงลอยสปอร์ราโรคฟิช ในสารละลาย tween 80 โดยปรับให้มีปริมาณ 10^5 สปอร์/มิลลิลิตร นำมาเกลี่ยบนอาหาร PDA หลังจากนั้นหยดสารสกัด 25 ไมโครลิตร ลงบนแผ่น disc มาตรฐาน (Whatman, USA) ที่ปลอดเชื้อ รอให้แห้ง นำ disc ที่ชุบสารสกัดและแห้งแล้ว วางบนผิวหน้าของอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน ตรวจสอบการยับยั้งการงอกของสปอร์ราโรคฟิช เทียบกับการใช้ disc ชุบสารละลาย 0.5 % DMSO ที่ทำให้แห้งแล้ว ทำการทดสอบเพื่อยืนยันผลอีกครั้งหนึ่ง

7. การศึกษาความสามารถของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญของราโรคฟิช

เลี้ยงราโรคฟิชไว้บนจานอาหาร LNA หรือ PDA บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3-5 วัน วัดระยะห่างจากปลายเส้นใยของรา 1 เซนติเมตร หยดสารสกัด 25 ไมโครลิตร ลงบนแผ่น disc มาตรฐาน (Whatman, USA) ที่ปลอดเชื้อ รอให้แห้ง นำ disc ที่ชุบสารสกัดวางบนผิวหน้าของอาหารให้ขอบ disc ห่างจากปลายเส้นใยของรา 1 เซนติเมตร บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน ตรวจสอบการยับยั้งการเจริญเส้นใยราโรคฟิช เทียบกับ disc ชุบสารละลาย 0.5% DMSO ที่ทำให้แห้งแล้ว ยืนยันผลอีกครั้งหนึ่ง บันทึกการยับยั้งเป็น 4 ระดับโดยใช้เกณฑ์เดียวกับ antibiosis ดังนี้ 0 คือไม่ยับยั้ง 1+ ผลบวกอ่อน คือระยะถูกยับยั้ง ≤ 2 มิลลิเมตร 2+ ผลบวกปานกลาง ระยะถูกยับยั้ง $>2 - \leq 6$ มิลลิเมตร 3+ ผลบวกแรง ระยะถูกยับยั้ง $>6 - \leq 10$ มิลลิเมตร 4+ ผลบวกแรงมาก ระยะถูกยับยั้ง >10 มิลลิเมตร

8. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะเส้นใยราโรคฟิช ได้กล้องจุลทรรศน์

นำสารสกัดจากสาหร่ายพันธุ์ที่ให้ผลปฏิสัมพันธ์ (antibiosis) และผลการยับยั้งเมื่อทดสอบกับสารสกัด (antifungus) แตกต่างกัน 2 ลักษณะ คือ antibiosis + : antifungus + และ antibiosis + : antifungus - มาทดสอบซ้ำตามข้อ 7 ตัดชิ้นอาหารบริเวณขอบโคโลนีราโรคฟิชตรงข้ามกับสารสกัดขนาด 1x1 เซนติเมตร ตรวจสอบลักษณะที่เปลี่ยนไปของปลายเส้นใยของราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ บันทึกจำนวนและลักษณะเส้นใยที่มีลักษณะเปลี่ยนไปใต้กล้องจุลทรรศน์ เทียบกับสายพันธุ์ที่ให้ผล antibiosis - : antifungus - และปลายเส้นใยที่ไม่ถูกยับยั้งเมื่อทดสอบกับแผ่น disc ที่ชุบด้วยสารละลาย 0.5 % DMSO และทำให้แห้งแล้ว

9. การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยงราเพื่อสกัดสารออกฤทธิ์ในสภาวะ static

เลือกราคาที่ให้ผลยับยั้งราโรคฟิชได้ดี มาศึกษาระยะเวลาหมักในอาหารที่ให้ผล antibiosis ดี ในระดับ large scale (ปริมาตร 300 มิลลิลิตร) โดยราทะเลที่เจริญช้าจะสกัดสารเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวเป็นเวลา 7- 60 วัน ส่วนราทะเลที่เจริญเร็วและราเอนโดไฟท์จะสกัดสารเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวเป็นเวลา 7-28 วัน

จากนั้นสกัดด้วย ethanol- acetate แต่ในกรณีที่สารที่สกัดด้วย ethanol-acetate ให้ผลไม่ดี หรือสารที่สกัดด้วย ethyl acetate อย่างเดียวให้ผลไม่แตกต่างจากการสกัดด้วย ethanol-acetate จะสกัดด้วย ethyl acetate เพียงอย่างเดียว ละลายสารสกัดด้วยสารละลาย 10% DMSO (เนื่องจากพบว่าสารสกัดที่ละลายใน 0.5% DMSO บางหลอดมีราอื่นปนเปื้อน) ทดสอบการยับยั้งด้วยวิธี disc diffusion แล้วยืนยันผลอีกครั้งหนึ่ง

10. การแยกราเอนโดไฟท์จากใบพืชและศึกษาลักษณะเบื้องต้น

แยกราเอนโดไฟท์จากใบพืชชายเลนชนิดต่างๆ ได้แก่ แสมทะเล (*Avicennia marina*) โพธิ์ทะเล (*Thespesia populnea*) พังกาหัวสุมดอกแดง (*Bruguiera gymnorhiza*) โปรงแดง (*Ceriops tagal*) ฝาดดอกขาว (*Lumnitzera racemosa*) และพังกาหัวสุมดอกขาว (*Bruguiera sexangula*)

นำใบพืชปกติดมาตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยมขนาด 5×5 เซนติเมตร แช่ใน 70% แอลกอฮอล์ นาน 2 นาที และแช่ในสารละลาย 10% chorox นาน 1 นาที จึงนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง จากนั้นนำมาซบบนกระดาษกรองปลอดเชื้อ แล้วนำมาวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 2% water agar บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เมื่อเชื้อเจริญใช้เข็มเขี่ยเชื้อตัดเส้นใยราแต่ละชนิดที่พบ วางบนจานอาหาร 2% water agar (WA) และ potato dextrose agar บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน และย้ายไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ หลังจากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 สัปดาห์ บันทึกลักษณะการเจริญของเชื้อ ลักษณะโคโลนี ลักษณะเส้นใยและการสร้างสปอร์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ light microscope

หมายเหตุ เป็นการแยกเพิ่มเติมจากที่มีอยู่แล้ว 25 สายพันธุ์ คือ BUEN 801-815 และ BUEN 827-840 (ตารางที่ 5) ตามคำแนะนำของผู้ประเมินโครงการ

บทที่ 4

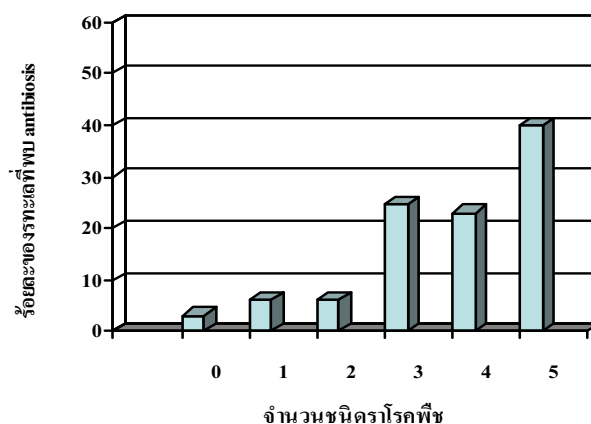
ผลการทดลองราทะเล

1. ปฏิสัมพันธ์รูปแบบ antibiosis ระหว่างราทะเลกับราโรคพืช

จากการนำราทะเล 65 สายพันธุ์ มาศึกษาปฏิสัมพันธ์รูปแบบ antibiosis ระหว่างราทดสอบกับราโรคพืช 5 ชนิด ได้แก่ *Colletotrichum capsici* (Cc) DOAC 1511, *C. gloeosporioides* (Cg) DOAC 0782, *Fusarium oxysporum* (Fo) DOAC 1808, *F. subglutinans* (Fs) DOAC 0761 และ *Pestalotiopsis* sp. (Ps) DOAC 1098 บนอาหาร 8 ชนิด คือ PDA, SBA, YMG และ LNA ที่เตรียมด้วยน้ำกลั่น หรือน้ำทะเล รวมทั้งหมด 2600 คู่ พบระดับปฏิสัมพันธ์รูปแบบ antibiosis แตกต่างกันตั้งแต่ไม่พบ antibiosis (0) จนกระทั่งพบในระดับแรงมาก (4+) ระดับความแรง antibiosis และจำนวนสายพันธุ์ราทะเลที่ให้ผลบวกขึ้นกับชนิดของราทะเลและราโรคพืชที่นำมาทดสอบ

1.1 ความสามารถในการแสดงผล antibiosis ของราทะเล

ราทะเลเกือบทั้งหมดที่นำมาศึกษา คือ 63 สายพันธุ์ (ยกเว้น *Trichocladium nypae* BUCS 037 และ *Lulworthia* sp. 3 BUCS 043-1) จากทั้งหมด 65 สายพันธุ์ (96.9%) สามารถแสดงผล antibiosis เมื่อเลี้ยงร่วมกับราโรคพืชชนิดใดชนิดหนึ่ง และ 27 สายพันธุ์ จาก 65 สายพันธุ์ (41.5%) แสดงผล antibiosis เมื่อเลี้ยงร่วมกับราโรคพืชทุกชนิด ราทะเล 55 สายพันธุ์ จาก 65 สายพันธุ์ (84.6%) แสดงผล antibiosis กับราโรคพืช 3-5 ชนิด ความสามารถในการแสดงผล antibiosis ของราทะเลแสดงไว้ในภาพที่ 3 และผลระดับ antibiosis ของราทะเล 63 สายพันธุ์ในการยับยั้งราโรคพืชแสดงใน ตารางที่ 7 โดยแสดงผลของราทะเลแต่ละสายพันธุ์ ที่เลี้ยงบนอาหาร 5 ชนิดในการยับยั้งราโรคพืช 5 ชนิด



ภาพที่ 3 ร้อยละของราทะเลที่แสดงผล antibiosis ต่อจำนวนชนิดราโรคพืช

ตารางที่ 7 ระดับ antibiosis ของราทะเล บนอาหารแข็งชนิดต่างๆ ที่มีต่อราโรคพืช

ลำดับ	ราทะเล	อาหาร	ระดับ antibiosis ต่อราโรคพืช				
			Cc	Cg	Fo	Fs	Ps
1	<i>Helicorhoidion nypicola</i> BUCS 001	PDA _{dw}	0	0	2+	0	0
		PDA _{sw}	0	0	2+	0	0
		SBA _{dw}	2+	0	2+	0	0
		SBA _{sw}	2+	0	0	0	0
		YMG _{dw}	0	0	0	0	0
		YMG _{sw}	0	1+	0	0	0
		LNA _{dw}	4+	4+	0	0	1+
		LNA _{sw}	0	0	0	0	0
2	<i>Leptosphaeria peruviana</i> BUCS 002	PDA _{dw}	3+	4+	3+	3+	4+
		PDA _{sw}	3+	4+	3+	2+	4+
		SBA _{dw}	4+	1+	4+	3+	4+
		SBA _{sw}	3+	0	3+	3+	4+
		YMG _{dw}	3+	4+	2+	4+	4+
		YMG _{sw}	3+	2+	2+	4+	4+
		LNA _{dw}	4+	4+	2+	3+	4+
		LNA _{sw}	2+	4+	4+	1+	4+
3	<i>Zalerion maritimum</i> BUCS 003	PDA _{dw}	2+	3+	0	0	1+
		PDA _{sw}	1+	0	1+	0	1+
		SBA _{dw}	0	1+	0	0	1+
		SBA _{sw}	1+	1+	0	2+	1+
		YMG _{dw}	0	0	0	3+	2+
		YMG _{sw}	0	2+	0	0	0
		LNA _{dw}	2+	4+	0	0	2+
		LNA _{sw}	2+	2+	1+	1+	2+

ตารางที่ 7 ระดับ antibiosis ของราทะเล บนอาหารแข็งชนิดต่างๆ ที่มีต่อราโรคพืช (ต่อ)

ลำดับ	ราทะเล	อาหาร	ระดับ antibiosis ต่อราโรคพืช				
			Cc	Cg	Fo	Fs	Ps
4	<i>Aigialus</i> like BUCS 004	PDAdw	1+	0	0	1+	4+
		PDAsw	3+	0	0	2+	4+
		SBA dw	1+	2+	0	2+	4+
		SBA sw	0	0	0	0	4+
		YMG dw	0	0	0	0	4+
		YMG sw	0	2+	0	0	4+
		LNAdw	2+	2+	0	3+	4+
		LNAsw	2+	2+	0	3+	2+
5	<i>Xylomycete</i> sp.1 BUCS 005	PDAdw	0	0	0	0	1+
		PDA sw	0	0	0	0	0
		SBA dw	0	1+	0	0	2+
		SBA sw	0	0	0	0	0
		YMG dw	0	1+	0	0	0
		YMG sw	0	0	0	0	0
		LNAdw	1+	0	0	0	2+
		LNAsw	0	0	0	0	0
6	<i>Savoryella</i> like BUCS 006	PDAdw	1+	1+	0	0	0
		PDA sw	1+	1+	0	0	0
		SBA dw	0	1+	0	0	1+
		SBA sw	2+	1+	0	0	0
		YMG dw	0	1+	1+	0	0
		YMG sw	2+	1+	0	0	0
		LNAdw	0	1+	0	0	1+
		LNAsw	0	1+	0	0	0

ตารางที่ 7 ระดับ antibiosis ของราทะเล บนอาหารแข็งชนิดต่างๆ ที่มีต่อราโรคพืช (ต่อ)

ลำดับ	ราทะเล	อาหาร	ระดับ antibiosis ต่อราโรคพืช				
			Cc	Cg	Fo	Fs	Ps
7	<i>Periconia prolifica</i> BUCS 007	PDA _{dw}	2+	0	2+	1+	2+
		PDA _{sw}	4+	4+	2+	3+	1+
		SBA _{dw}	2+	0	4+	3+	4+
		SBA _{sw}	3+	4+	4+	1+	4+
		YMG _{dw}	4+	4+	3+	3+	4+
		YMG _{sw}	4+	4+	2+	1+	4+
		LNAd _w	3+	4+	2+	2+	3+
		LNAs _w	2+	1+	0	1+	2+
8	<i>Epicoccum</i> sp. BUCS 008	PDA _{dw}	4+	3+	1+	2+	0
		PDA _{sw}	0	1+	0	0	0
		SBA _{dw}	0	1+	0	2+	2+
		SBA _{sw}	3+	0	0	1+	1+
		YMG _{dw}	3+	2+	1+	0	0
		YMG _{sw}	0	0	1+	0	0
		LNAd _w	2+	1+	3+	0	1+
		LNAs _w	1+	0	1+	1+	2+
9	<i>Verruculina enalia</i> BUCS 009	PDA _{dw}	3+	3+	2+	3+	4+
		PDA _{sw}	2+	3+	2+	1+	3+
		SBA _{dw}	3+	4+	2+	1+	3+
		SBA _{sw}	1+	4+	1	2+	1+
		YMG _{dw}	4+	3+	0	0	4+
		YMG _{sw}	0	4+	2+	3+	4+
		LNAd _w	3+	3+	2+	0	3+
		LNAs _w	1+	2+	2+	0	2+

ตารางที่ 7 ระดับ antibiosis ของราทะเล บนอาหารแข็งชนิดต่างๆ ที่มีต่อราโรคพืช (ต่อ)

ลำดับ	ราทะเล	อาหาร	ระดับ antibiosis ต่อราโรคพืช				
			Cc	Cg	Fo	Fs	Ps
10	<i>Zalerion maritimum</i> BUCS 010	PDA _{dw}	0	1+	0	0	1+
		PDA _{sw}	0	0	0	0	1+
		SBA _{dw}	0	1+	0	0	0
		SBA _{sw}	0	0	0	0	0
		YMG _{dw}	0	0	0	0	0
		YMG _{sw}	0	0	0	0	0
		LNAd _w	0	3+	0	0	0
		LNAs _w	0	2+	0	0	0
11	<i>Savoryella paucispora</i> BUCS 011	PDA _{dw}	1+	3+	0	0	1+
		PDA _{sw}	2+	1+	1+	0	0
		SBA _{dw}	2+	0	0	0	2+
		SBA _{sw}	2+	0	0	3+	1+
		YMG _{dw}	1+	2+	0	3+	1+
		YMG _{sw}	0	2+	0	3+	0
		LNAd _w	1+	2+	2+	0	4+
		LNAs _w	1+	0	2+	0	2+
12	<i>Trichocladium nypae</i> BUCS 012	PDA _{dw}	3+	2+	0	0	2+
		PDA _{sw}	0	0	0	0	2+
		SBA _{dw}	0	2+	2+	0	1
		SBA _{sw}	0	0	0	0	2+
		YMG _{dw}	0	0	0	0	2+
		YMG _{sw}	0	0	0	0	2+
		LNAd _w	1+	1+	0	0	4+
		LNAs _w	1+	1+	0	0	1+

ตารางที่ 7 ระดับ antibiosis ของราทะเล บนอาหารแข็งชนิดต่างๆ ที่มีต่อราโรคพืช (ต่อ)

ลำดับ	ราทะเล	อาหาร	ระดับ antibiosis ต่อราโรคพืช				
			Cc	Cg	Fo	Fs	Ps
13	<i>Lulworthia</i> sp.1 BUCS 013-1	PDAdw	0	0	0	0	0
		PDAsw	0	0	0	0	0
		SBA dw	0	0	0	0	0
		SBA sw	1+	0	0	0	0
		YMG dw	0	0	0	0	0
		YMG sw	0	2+	0	0	0
		LNAdw	0	0	0	0	1+
		LNAsw	0	0	0	0	0
14	<i>Lulworthia</i> sp.1 BUCS 013-2	PDAdw	0	0	0	0	0
		PDAsw	0	1+	0	0	0
		SBA dw	0	0	0	0	0
		SBA sw	0	0	0	0	0
		YMG dw	0	1+	0	0	0
		YMG sw	0	0	0	0	0
		LNAdw	0	1+	2+	0	0
		LNAsw	1+	0	0	0	0
15	<i>Saagaromyces ratnagiriensis</i> BUCS 015-1	PDAdw	0	0	0	4+	3+
		PDAsw	0	0	0	2+	2+
		SBA dw	0	0	0	4+	2+
		SBA sw	0	2+	0	4+	1+
		YMG dw	0	2+	0	2+	2+
		YMG sw	1+	0	0	0	1+
		LNAdw	0	1+	0	4+	0
		LNAsw	1+	0	0	4+	0

ตารางที่ 7 ระดับ antibiosis ของราทะเล บนอาหารแข็งชนิดต่างๆ ที่มีต่อราโรคพืช (ต่อ)

ลำดับ	ราทะเล	อาหาร	ระดับ antibiosis ต่อราโรคพืช				
			Cc	Cg	Fo	Fs	Ps
16	<i>Saagaromyces ratnagiriensis</i> BUCS 015-2	PDA _{dw}	0	0	0	0	0
		PDA _{sw}	0	2+	0	0	0
		SBA _{dw}	0	0	0	0	0
		SBA _{sw}	0	2+	0	0	0
		YMG _{dw}	0	0	0	0	0
		YMG _{sw}	0	0	0	0	0
		LNA _{dw}	0	0	1+	0	1+
		LNA _{sw}	0	0	0	0	0
17	<i>Aniptodera longispora</i> BUCS 017-1	PDA _{dw}	1+	2+	0	3+	2+
		PDA _{sw}	3+	4+	0	3+	2+
		SBA _{dw}	4+	2+	0	0	3+
		SBA _{sw}	4+	3+	1+	3+	4+
		YMG _{dw}	3+	2+	1+	2+	3+
		YMG _{sw}	3+	2+	1+	3+	3+
		LNA _{dw}	4+	2+	1+	0	0
		LNA _{sw}	1+	2+	0	2+	2+
18	<i>Aniptodera longispora</i> BUCS 017-2	PDA _{dw}	0	0	0	0	0
		PDA _{sw}	0	0	0	3+	0
		SBA _{dw}	0	0	0	2+	0
		SBA _{sw}	0	0	0	2+	1+
		YMG _{dw}	0	0	0	2+	0
		YMG _{sw}	0	0	0	1+	0
		LNA _{dw}	1+	1+	0	3+	0
		LNA _{sw}	0	0	0	0	0

ตารางที่ 7 ระดับ antibiosis ของราทะเล บนอาหารแข็งชนิดต่างๆ ที่มีต่อราโรคพืช (ต่อ)

ลำดับ	ราทะเล	อาหาร	ระดับ antibiosis ต่อราโรคพืช				
			Cc	Cg	Fo	Fs	Ps
19	<i>Aniptodera longispora</i> BUCS 017-3	PDAdw	1+	1+	0	0	1+
		PDAsw	0	0	0	0	4+
		SBA dw	1+	2+	0	0	0
		SBA sw	0	0	0	0	0
		YMG dw	0	0	0	0	0
		YMG sw	1+	0	0	0	0
		LNAdw	1+	0	0	0	1+
		LNAsw	0	2+	0	0	0
20	<i>Zalerion varium</i> BUCS 020	PDAdw	2+	4+	2+	2+	3+
		PDA sw	2+	3+	2+	1+	0
		SBA dw	2+	2+	4+	2+	4+
		SBA sw	0	1+	4+	3+	3+
		YMG dw	3+	3+	4+	2+	3+
		YMG sw	0	4+	2+	2+	3+
		LNAdw	3+	3+	4+	3+	4+
		LNAsw	3+	4+	1+	3+	3+
21	<i>Xylomyces</i> sp.2 BUCS 021	PDAdw	0	2+	0	0	2+
		PDA sw	0	4+	0	0	2+
		SBA dw	0	3+	0	0	1+
		SBA sw	0	3+	0	0	0
		YMG dw	0	3+	0	0	2+
		YMG sw	3+	3+	1+	0	1+
		LNAdw	2+	2+	0	0	0
		LNAsw	0	2+	0	0	0

ตารางที่ 7 ระดับ antibiosis ของราทะเล บนอาหารแข็งชนิดต่างๆ ที่มีต่อราโรคพืช (ต่อ)

ลำดับ	ราทะเล	อาหาร	ระดับ antibiosis ต่อราโรคพืช				
			Cc	Cg	Fo	Fs	Ps
22	<i>Xylomyces</i> sp.3 BUCS 022	PDAdw	4+	4+	2+	0	4+
		PDAsw	4+	3+	3+	0	4+
		SBA dw	1+	1+	2+	0	3+
		SBA sw	0	0	2+	2+	2+
		YMG dw	4+	3+	2+	0	4+
		YMG sw	4+	4+	2+	0	3+
		LNAdw	4+	3+	2+	0	4+
		LNAsw	3+	2+	2+	0	3+
23	<i>Lulworthia</i> sp.1 BUCS 023-1	PDAdw	0	0	2+	0	2+
		PDA sw	2+	2+	0	0	2+
		SBA dw	1+	0	2+	0	3+
		SBA sw	3+	3+	3+	0	3+
		YMG dw	2+	3+	2+	0	2+
		YMG sw	3+	4+	0	0	2+
		LNAdw	2+	3+	2+	0	4+
		LNAsw	2+	3+	0	0	4+
24	<i>Lulworthia</i> sp.1 BUCS 023-2	PDAdw	0	0	0	0	2+
		PDA sw	0	1+	0	0	0
		SBA dw	0	2+	2+	0	2+
		SBA sw	0	1+	0	0	2+
		YMG dw	0	0	0	0	0
		YMG sw	0	0	0	0	0
		LNAdw	0	0	1+	0	0
		LNAsw	1+	0	0	0	0

ตารางที่ 7 ระดับ antibiosis ของราทะเล บนอาหารแข็งชนิดต่างๆ ที่มีต่อราโรคพืช (ต่อ)

ลำดับ	ราทะเล	อาหาร	ระดับ antibiosis ต่อราโรคพืช				
			Cc	Cg	Fo	Fs	Ps
25	<i>Lulworthia</i> sp. 1 BUCS 023-3	PDA _{dw}	2+	0	0	0	2+
		PDA _{sw}	0	0	0	0	3+
		SBA _{dw}	0	1+	0	0	2+
		SBA _{sw}	3+	1+	0	0	2+
		YMG _{dw}	0	0	0	0	2+
		YMG _{sw}	1+	3+	0	0	2+
		LNA _{dw}	0	2+	0	0	3+
		LNA _{sw}	0	2+	0	0	2+
26	<i>Trichocladium achrasporum</i> BUCS026	PDA _{dw}	0	4+	0	0	0
		PDA _{sw}	0	3+	0	0	0
		SBA _{dw}	0	3+	0	0	0
		SBA _{sw}	0	1+	0	0	0
		YMG _{dw}	0	3+	0	0	0
		YMG _{sw}	0	0	0	0	0
		LNA _{dw}	0	0	0	0	0
		LNA _{sw}	0	0	0	0	0
27	<i>Verruculina enalia</i> BUCS 027-1	PDA _{dw}	3+	4+	2+	1+	3+
		PDA _{sw}	4+	2+	2+	1+	4+
		SBA _{dw}	3+	3+	2+	1+	4+
		SBA _{sw}	4+	3+	0	2+	2+
		YMG _{dw}	3+	0	3+	1+	4+
		YMG _{sw}	3+	0	2+	2+	3+
		LNA _{dw}	2+	4+	2+	1+	3+
		LNA _{sw}	3+	3+	3+	1+	2+

ตารางที่ 7 ระดับ antibiosis ของราทะเล บนอาหารแข็งชนิดต่างๆ ที่มีต่อราโรคพืช (ต่อ)

ลำดับ	ราทะเล	อาหาร	ระดับ antibiosis ต่อราโรคพืช				
			Cc	Cg	Fo	Fs	Ps
28	<i>Verruculina enalia</i> BUCS 027-2	PDAdw	4+	3+	2+	2+	3+
		PDAsw	3+	2+	2+	1+	3+
		SBA dw	2+	2+	3+	1+	3+
		SBA sw	2+	2+	0	1+	4+
		YMG dw	0	3+	2+	2+	3+
		YMG sw	0	3+	0	1+	3+
		LNAdw	3+	2+	2+	1+	2+
		LNAsw	1+	1+	0	1+	2+
29	<i>Trichocladium nypae</i> BUCS 029	PDAdw	4+	1+	0	0	0
		PDAsw	0	0	0	0	0
		SBA dw	0	0	0	0	0
		SBA sw	0	0	0	0	0
		YMG dw	3+	0	0	0	0
		YMG sw	0	0	0	0	0
		LNAdw	0	0	0	0	1+
		LNAsw	1+	0	0	0	0
30	<i>Aniptodera longispora</i> BUCS 030-1	PDAdw	1+	1+	0	0	0
		PDAsw	2+	0	0	0	0
		SBA dw	0	3+	0	0	0
		SBA sw	0	0	0	0	0
		YMG dw	0	0	0	0	0
		YMG sw	0	0	0	0	0
		LNAdw	0	2+	0	0	0
		LNAsw	2+	0	0	0	1+

ตารางที่ 7 ระดับ antibiosis ของราทะเล บนอาหารแข็งชนิดต่างๆ ที่มีต่อราโรคพืช (ต่อ)

ลำดับ	ราทะเล	อาหาร	ระดับ antibiosis ต่อราโรคพืช				
			Cc	Cg	Fo	Fs	Ps
31	<i>Aniptodera longispora</i> BUCS 030-2	PDAdw	0	1+	0	0	1+
		PDAsw	0	0	0	0	1+
		SBA dw	0	0	0	0	1+
		SBA sw	1+	0	0	0	0
		YMG dw	0	0	0	0	1+
		YMG sw	0	0	0	0	0
		LNAdw	4+	2+	0	0	0
		LNAsw	2+	0	0	0	0
32	<i>Saagaromyces ratnagiriensis</i> BUCS 032-1	PDAdw	3+	4+	2+	4+	3+
		PDAsw	3+	3+	2+	0	2+
		SBA dw	3+	4+	1+	3+	0
		SBA sw	2+	2+	2+	2+	0
		YMG dw	2+	3+	1+	4+	3+
		YMG sw	3+	3+	1+	2+	0
		LNAdw	2+	3+	2+	4+	2+
		LNAsw	2+	3+	2+	4+	2+
33	<i>Saagaromyces ratnagiriensis</i> BUCS 032-2	PDAdw	0	4+	1+	3+	4+
		PDAsw	0	3+	2+	1+	0
		SBA dw	4+	3+	2+	3+	2+
		SBA sw	3+	1+	2+	3+	4+
		YMG dw	0	3+	3+	3+	3+
		YMG sw	3+	2+	2+	3+	4+
		LNAdw	0	4+	3+	3+	2+
		LNAsw	4+	4+	0	2+	2+

ตารางที่ 7 ระดับ antibiosis ของราทะเล บนอาหารแข็งชนิดต่างๆ ที่มีต่อราโรคพืช (ต่อ)

ลำดับ	ราทะเล	อาหาร	ระดับ antibiosis ต่อราโรคพืช				
			Cc	Cg	Fo	Fs	Ps
34	<i>Verruculina enalia</i> BUCS 034-1	PDA _{dw}	4+	4+	2+	2+	4+
		PDA _{sw}	3+	4+	2+	2+	4+
		SBA _{dw}	2+	4+	0	2+	4+
		SBA _{sw}	2+	3+	0	2+	2+
		YMG _{dw}	3+	4+	0	2+	4+
		YMG _{sw}	3+	3+	2+	2+	3+
		LNA _{dw}	4+	3+	2+	2+	4+
		LNA _{sw}	4+	4+	1+	2+	4+
35	<i>Verruculina enalia</i> BUCS 034-2	PDA _{dw}	2+	3+	0	1+	3+
		PDA _{sw}	2+	2+	0	0	2+
		SBA _{dw}	3+	4+	1+	2+	3+
		SBA _{sw}	4+	4+	0	1+	2+
		YMG _{dw}	4+	4+	0	0	4+
		YMG _{sw}	2+	4+	0	0	3+
		LNA _{dw}	3+	3+	0	0	3+
		LNA _{sw}	3+	3+	0	0	1+
36	<i>Trichocladium achrasporum</i> BUCS 036	PDA _{dw}	1+	2+	0	0	1+
		PDA _{sw}	1+	2+	0	0	2+
		SBA _{dw}	0	1+	0	0	1+
		SBA _{sw}	0	2+	0	0	0
		YMG _{dw}	0	2+	0	0	0
		YMG _{sw}	0	1+	0	0	0
		LNA _{dw}	0	2+	0	0	0
		LNA _{sw}	0	3+	1+	2+	0

ตารางที่ 7 ระดับ antibiosis ของราทะเล บนอาหารแข็งชนิดต่างๆ ที่มีต่อราโรคพืช (ต่อ)

ลำดับ	ราทะเล	อาหาร	ระดับ antibiosis ต่อราโรคพืช				
			Cc	Cg	Fo	Fs	Ps
37	<i>Lignicola leavis</i> BUCS 038-1	PDA _{dw}	2+	0	0	0	1+
		PDA _{sw}	0	2+	0	0	1+
		SBA _{dw}	0	0	0	0	0
		SBA _{sw}	0	0	0	0	2+
		YMG _{dw}	0	0	0	0	0
		YMG _{sw}	0	0	0	0	0
		LNA _{dw}	0	0	0	0	0
		LNA _{sw}	0	1+	0	0	0
38	<i>Lignicola leavis</i> BUCS 038-2	PDA _{dw}	0	0	0	1+	0
		PDA _{sw}	2+	2+	0	0	0
		SBA _{dw}	2+	2+	0	0	2+
		SBA _{sw}	2+	0	0	0	1+
		YMG _{dw}	3+	0	0	0	4+
		YMG _{sw}	0	0	0	0	1+
		LNA _{dw}	0	1+	0	2+	3+
		LNA _{sw}	0	0	0	0	0
39	<i>Lignicola leavis</i> BUCS 038-3	PDA _{dw}	2+	2+	0	0	3+
		PDA _{sw}	2+	2+	0	0	2+
		SBA _{dw}	0	0	0	0	4+
		SBA _{sw}	0	0	0	0	1+
		YMG _{dw}	0	0	0	0	0
		YMG _{sw}	0	1+	0	0	0
		LNA _{dw}	0	2+	0	0	2+
		LNA _{sw}	0	2+	0	0	2+

ตารางที่ 7 ระดับ antibiosis ของราทะเล บนอาหารแข็งชนิดต่างๆ ที่มีต่อราโรคพืช (ต่อ)

ลำดับ	ราทะเล	อาหาร	ระดับ antibiosis ต่อราโรคพืช				
			Cc	Cg	Fo	Fs	Ps
40	<i>Aniptodera longispora</i> BUCS 041-1	PDA _{dw}	0	0	0	0	0
		PDA _{sw}	0	0	0	0	0
		SBA _{dw}	0	2+	0	0	0
		SBA _{sw}	0	0	0	0	0
		YMG _{dw}	0	0	0	0	0
		YMG _{sw}	0	0	0	0	0
		LNA _{dw}	0	0	0	0	0
		LNA _{sw}	0	0	0	0	0
41	<i>Aniptodera longispora</i> BUCS 041-2	PDA _{dw}	0	0	0	1+	0
		PDA _{sw}	0	0	0	1+	0
		SBA _{dw}	0	1+	0	2+	1+
		SBA _{sw}	0	0	0	0	0
		YMG _{dw}	0	0	1+	0	1+
		YMG _{sw}	0	2+	0	0	0
		LNA _{dw}	0	1+	0	1+	0
		LNA _{sw}	0	2+	1+	0	0
42	<i>Lulworthia</i> sp.3 BUCS 043-2	PDA _{dw}	0	0	0	0	1+
		PDA _{sw}	0	0	0	0	0
		SBA _{dw}	0	0	0	0	1+
		SBA _{sw}	0	0	0	0	0
		YMG _{dw}	0	0	0	0	0
		YMG _{sw}	0	0	0	0	0
		LNA _{dw}	0	0	0	0	0
		LNA _{sw}	0	0	0	0	0

ตารางที่ 7 ระดับ antibiosis ของราทะเล บนอาหารแข็งชนิดต่างๆ ที่มีต่อราโรคพืช (ต่อ)

ลำดับ	ราทะเล	อาหาร	ระดับ antibiosis ต่อราโรคพืช				
			Cc	Cg	Fo	Fs	Ps
43	<i>Lulworthia</i> sp.3 BUCS 043-3	PDA _{dw}	0	1+	0	0	0
		PDA _{sw}	0	0	0	0	0
		SBA _{dw}	0	1+	0	0	3+
		SBA _{sw}	0	0	0	0	1+
		YMG _{dw}	0	0	0	1+	1+
		YMG _{sw}	0	1+	0	0	0
		LN _{dw}	0	0	0	0	0
		LN _{sw}	0	0	0	0	0
44	<i>Verruculina enalia</i> BUCS 046-2	PDA _{dw}	0	0	0	0	0
		PDA _{sw}	0	1+	0	0	1+
		SBA _{dw}	0	0	0	0	2+
		SBA _{sw}	0	1+	0	0	0
		YMG _{dw}	0	0	0	0	3+
		YMG _{sw}	3+	0	0	0	0
		LN _{dw}	0	0	0	0	4+
		LN _{sw}	0	0	0	0	0
45	<i>Zalerion varium</i> BUCS 048	PDA _{dw}	3+	0	0	0	0
		PDA _{sw}	0	0	0	0	0
		SBA _{dw}	3+	1+	0	0	0
		SBA _{sw}	0	0	0	0	0
		YMG _{dw}	0	0	0	0	0
		YMG _{sw}	0	0	0	0	0
		LN _{dw}	0	0	0	0	0
		LN _{sw}	0	0	0	0	0

ตารางที่ 7 ระดับ antibiosis ของราทะเล บนอาหารแข็งชนิดต่างๆ ที่มีต่อราโรคพืช (ต่อ)

ลำดับ	ราทะเล	อาหาร	ระดับ antibiosis ต่อราโรคพืช				
			Cc	Cg	Fo	Fs	Ps
46	<i>Anthostomlla</i> sp. BUCS 049	PDA _{dw}	0	1+	1+	0	2+
		PDA _{sw}	1+	2+	0	0	0
		SBA _{dw}	0	1+	0	0	0
		SBA _{sw}	0	1+	0	0	1+
		YMG _{dw}	0	1+	0	0	0
		YMG _{sw}	0	0	0	0	0
		LNA _{dw}	2+	0	0	0	0
		LNA _{sw}	1+	0	0	0	0
47	<i>Trichocladium achrasporum</i> BUCS 050	PDA _{dw}	3+	2+	0	0	1+
		PDA _{sw}	0	1+	1+	0	0
		SBA _{dw}	1+	0	0	0	3+
		SBA _{sw}	0	0	0	0	0
		YMG _{dw}	0	2+	0	0	0
		YMG _{sw}	0	3+	0	0	0
		LNA _{dw}	0	2+	0	0	0
		LNA _{sw}	0	3+	0	0	0
48	<i>Cirrenalia pygmea</i> BUCS 051	PDA _{dw}	1+	1+	2+	3+	2+
		PDA _{sw}	2+	0	2+	0	0
		SBA _{dw}	2+	2+	0	2+	0
		SBA _{sw}	2+	0	1+	0	1+
		YMG _{dw}	1+	0	1+	0	1+
		YMG _{sw}	1+	0	1+	0	1+
		LNA _{dw}	3+	4+	3+	3+	3+
		LNA _{sw}	2+	4+	2+	1+	3+

ตารางที่ 7 ระดับ antibiosis ของราทะเล บนอาหารแข็งชนิดต่างๆ ที่มีต่อราโรคพืช (ต่อ)

ลำดับ	ราทะเล	อาหาร	ระดับ antibiosis ต่อราโรคพืช				
			Cc	Cg	Fo	Fs	Ps
49	<i>Cirrenalia pygmaea</i> BUCS 052	PDAdw	2+	2+	0	2+	0
		PDAsw	1+	0	1+	0	2+
		SBA dw	1+	0	2+	0	0
		SBA sw	1+	0	1+	1+	0
		YMG dw	0	0	0	0	2+
		YMG sw	0	0	0	0	0
		LNAdw	0	0	0	0	0
		LNAsw	2+	0	0	0	0
50	<i>Oxydothis</i> sp. BUSK 043-2	PDAdw	0	0	0	0	0
		PDA sw	1+	0	0	0	2+
		SBA dw	0	0	0	0	2+
		SBA sw	1+	0	0	0	0
		YMG dw	1+	0	0	0	0
		YMG sw	0	0	0	0	0
		LNAdw	0	0	0	0	0
		LNAsw	0	0	0	0	0
51	<i>Astrosphaeriella striatispora</i> BUSK 055-1	PDAdw	3+	4+	2+	3+	2+
		PDA sw	3+	3+	2+	1+	1+
		SBA dw	3+	4+	2+	3+	2+
		SBA sw	3+	3+	1+	0	2+
		YMG dw	2+	2+	2+	3+	2+
		YMG sw	3+	3+	2+	3+	1+
		LNAdw	2+	3+	3+	0	4+
		LNAsw	2+	3+	1+	0	0

ตารางที่ 7 ระดับ antibiosis ของราทะเล บนอาหารแข็งชนิดต่างๆ ที่มีต่อราโรคพืช (ต่อ)

ลำดับ	ราทะเล	อาหาร	ระดับ antibiosis ต่อราโรคพืช				
			Cc	Cg	Fo	Fs	Ps
52	<i>Astrosphaeriella striatispora</i> BUSK 057-3	PDA _{dw}	2+	3+	0	2+	3+
		PDA _{sw}	1+	2+	0	0	2+
		SBA _{dw}	4+	4+	2+	1+	4+
		SBA _{sw}	2+	2+	1+	0	1+
		YMG _{dw}	2+	3+	2+	2+	3+
		YMG _{sw}	0	0	0	1+	1+
		LNA _{dw}	4+	4+	3+	3+	4+
		LNA _{sw}	3+	4+	2+	2+	3+
53	<i>Zophiella</i> sp. BUSK 064-1	PDA _{dw}	1+	1+	2+	2+	2+
		PDA _{sw}	1+	1+	0	0	0
		SBA _{dw}	2+	1+	2+	2+	2+
		SBA _{sw}	2+	0	0	1+	1+
		YMG _{dw}	1+	1+	2+	0	2+
		YMG _{sw}	1+	1+	0	0	1+
		LNA _{dw}	0	1+	0	0	1+
		LNA _{sw}	1+	0	0	0	1+
54	<i>Rhizophora marina</i> BUCB 201-1	PDA _{dw}	0	0	0	0	0
		PDA _{sw}	1+	0	0	0	0
		SBA _{dw}	1+	0	0	0	0
		SBA _{sw}	0	0	0	0	0
		YMG _{dw}	0	0	0	0	0
		YMG _{sw}	0	0	0	0	0
		LNA _{dw}	0	0	0	0	0
		LNA _{sw}	0	0	0	0	0

ตารางที่ 7 ระดับ antibiosis ของราทะเล บนอาหารแข็งชนิดต่างๆ ที่มีต่อราโรคพืช (ต่อ)

ลำดับ	ราทะเล	อาหาร	ระดับ antibiosis ต่อราโรคพืช				
			Cc	Cg	Fo	Fs	Ps
55	<i>Rhizophora marina</i> BUCB 201-2	PDA _{dw}	0	1+	2+	0	1+
		PDA _{sw}	0	2+	0	0	0
		SBA _{dw}	0	2+	1+	3+	0
		SBA _{sw}	0	2+	0	0	0
		YMG _{dw}	4+	2+	2+	3+	3+
		YMG _{sw}	0	0	0	0	0
		LNA _{dw}	4+	4+	4+	4+	4+
		LNA _{sw}	3+	3+	0	3+	0
56	<i>Lulworthia</i> sp. 4 BUCH 206	PDA _{dw}	1+	0	0	1+	1+
		PDA _{sw}	1+	0	0	0	0
		SBA _{dw}	1+	0	1+	2+	1+
		SBA _{sw}	1+	0	0	0	0
		YMG _{dw}	1+	0	1+	0	0
		YMG _{sw}	1+	1+	0	0	0
		LNA _{dw}	0	1+	0	0	0
		LNA _{sw}	1+	0	1+	0	0
57	<i>Verruculina enalia</i> BUCH 215-1	PDA _{dw}	2+	4+	1+	2+	3+
		PDA _{sw}	3+	4+	1+	0	3+
		SBA _{dw}	2+	4+	2+	3+	3+
		SBA _{sw}	3+	4+	0	2+	2+
		YMG _{dw}	2+	4+	0	3+	2+
		YMG _{sw}	3+	3+	1+	4+	1+
		LNA _{dw}	3+	4+	1+	1+	1+
		LNA _{sw}	2+	2+	1+	1+	1+

ตารางที่ 7 ระดับ antibiosis ของราทะเล บนอาหารแข็งชนิดต่างๆ ที่มีต่อราโรคพืช (ต่อ)

ลำดับ	ราทะเล	อาหาร	ระดับ antibiosis ต่อราโรคพืช				
			Cc	Cg	Fo	Fs	Ps
58	<i>Cumulospora</i> sp. BURY 203	PDAdw	1+	2+	0	0	1+
		PDAsw	1+	2+	0	0	1+
		SBA dw	0	0	0	0	2+
		SBA sw	0	0	0	0	0
		YMG dw	1+	1+	0	2+	1+
		YMG sw	1+	1+	0	0	0
		LNAdw	0	0	0	1+	3+
		LNAsw	0	1+	0	0	0
59	<i>Monodictis pelligica</i> BURY 205	PDAdw	2+	0	0	1+	0
		PDAsw	0	0	0	0	0
		SBA dw	1+	1+	0	0	1+
		SBA sw	1+	0	0	0	0
		YMG dw	1+	0	0	0	0
		YMG sw	1+	0	0	0	1+
		LNAdw	1+	0	1+	0	0
		LNAsw	0	0	0	0	0
60	<i>Cirrenalia pygmea</i> BUCB 208	PDAdw	1+	0	0	0	0
		PDAsw	0	0	0	0	0
		SBA dw	0	1+	2+	0	1+
		SBA sw	0	0	0	0	0
		YMG dw	0	1+	1+	0	0
		YMG sw	0	0	0	0	0
		LNAdw	0	0	1+	0	0
		LNAsw	0	0	0	0	0

ตารางที่ 7 ระดับ antibiosis ของราทะเล บนอาหารแข็งชนิดต่างๆ ที่มีต่อราโรคพืช (ต่อ)

ลำดับ	ราทะเล	อาหาร	ระดับ antibiosis ต่อราโรคพืช				
			Cc	Cg	Fo	Fs	Ps
61	<i>Saagaromyces ratnagiriensis</i> BUPK 416-1	PDAdw	0	1+	0	0	0
		PDAsw	3+	3+	0	1+	2+
		SBA dw	0	1+	0	0	0
		SBA sw	1+	3+	0	0	3+
		YMG dw	0	0	0	0	1+
		YMG sw	1+	2+	0	0	2+
		LNAdw	0	1+	0	0	0
		LNAsw	1+	1+	0	0	1+
62	<i>Corollospora pulchella</i> BUKB 423-1	PDAdw	0	1+	0	0	0
		PDAsw	0	0	0	0	0
		SBA dw	0	0	0	0	1+
		SBA sw	0	0	0	0	0
		YMG dw	0	0	0	0	1+
		YMG sw	0	0	0	0	1+
		LNAdw	0	0	0	1+	1+
		LNAsw	0	0	0	0	0
63	<i>Arenariomyces trifurcata</i> BUPK 425-1	PDAdw	0	0	0	0	0
		PDAsw	0	0	0	0	0
		SBA dw	0	0	0	0	1+
		SBA sw	0	0	0	0	0
		YMG dw	0	0	0	2+	1+
		YMG sw	0	0	0	0	1+
		LNAdw	0	0	0	1+	0
		LNAsw	0	0	0	0	0

หมายเหตุ Cc = *Colletotrichum capsici* DOAC 1511, Cg = *C. gloeosporioides* DOAC 0782,

Fo = *Fusarium oxysporum* DOAC 1808, Fs = *F. subglutinans* DOAC 0761,

Ps = *Pestalotiopsis* sp. DOAC 1098

PDA = potato dextrose agar, SBA = Sabouraud agar, YMG = yeast malt glucose agar,

LNA = low nutrient agar, dw = distilled water, sw = seawater

จากตารางที่ 7 จะเห็นว่าเมื่อนำราทะเลมาเลี้ยงร่วมกับราโรคพืชชนิดต่างๆ กัน พบผล antibiosis แตกต่างกัน ซึ่งในที่นี้กำหนดให้ ระดับ antibiosis 1+ และ 2+ เป็นระดับอ่อนและปานกลาง (antibiosis) ส่วน 3+ และ 4+ เป็นระดับดีและดีมาก (strong antibiosis) ราที่ให้ผล antibiosis ดี (พิจารณาจากการแสดงผลบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดีที่สุด) มีจำนวน 20 สายพันธุ์ ราเหล่านี้จะสามารถนำมาสกัดสารยับยั้งราโรคพืชได้ดีเมื่อเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสม ราทั้ง 20 สายพันธุ์ แสดงไว้ในตารางที่ 8 โดยที่ *Leptosphaeria peruviana* BUCS 002 และ *Rhizophora marina* BUCB 201-2 ให้ผล strong positive (4+) ต่อราโรคพืชทั้ง 5 ชนิด และมีราทะเลเพียง 3 สายพันธุ์ คือ *Savoryella paucispora* BUCS 011, *Verruculina enalia* BUCS 034-1 และ BUCS 034-2 ที่ให้ผลยับยั้งตั้งแต่ระดับปานกลาง (2+ - 4+) ต่อราโรคพืช 4-5 ชนิด

เมื่อนำข้อมูลในตารางที่ 7 มาวิเคราะห์จำนวนราทะเลที่สามารถยับยั้งราโรคพืชในระดับต่างๆ บนอาหารทั้ง 8 ชนิด และนำมาแสดงในตารางที่ 9 พบว่าจำนวนราทะเลที่เลี้ยงบนอาหารทั้ง 8 ชนิดให้ผลยับยั้ง *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. capsici* และ *Pestalotiopsis* sp. มีมากกว่าจำนวนราทะเลที่ยับยั้ง *Fusarium oxysporum* และ *F. subglutinans* เมื่อพิจารณาจากระดับ antibiosis ทั้ง 4 ระดับ โดยเฉพาะอย่างยิ่งระดับ 3+ - 4+ จำนวนราทะเลที่ให้ผลยับยั้งดีต่อราโรคพืช 3 ชนิดแรกมีมากกว่าจำนวนราทะเลที่ให้ผลยับยั้งในระดับเดียวกัน (3+ - 4+) ต่อราโรคพืช 2 ชนิดหลัง

1.2 ผลของการใช้น้ำกลั่นและน้ำทะเลต่อความสามารถในการแสดงผล antibiosis ของราทะเล

เมื่อนำจำนวนราทะเลที่ให้ผล strong antibiosis (3+ - 4+) บนอาหารแข็งชนิดต่างๆ ที่เตรียมจากน้ำกลั่นและน้ำทะเล จากตารางที่ 9 มาเปรียบเทียบกัน พบว่าไม่ว่าจะทำการเลี้ยงราทะเลบนอาหารชนิดใดก็ตาม ราทะเลส่วนใหญ่แสดงผล strong antibiosis บนอาหารที่เตรียมจากน้ำกลั่นได้ดีกว่าที่เตรียมจากน้ำทะเล (ภาพที่ 4a-4d) และไม่ได้เป็นผลจากน้ำทะเล เนื่องจากทั้งราทะเล และราโรคพืชเจริญได้ดีทั้งในน้ำทะเลและน้ำกลั่น (ไม่ได้แสดงผลในที่นี้) ตัวอย่างผลบวกใน dual culture แสดงในภาพที่ 5-7

ตารางที่ 8 ระดับ antibiotosis ที่ดีที่สุดในอาหารชนิดต่างๆ ของราทะเล 20 สายพันธุ์ ต่อราโรคพืช

ราทะเล	ระดับ antibiotosis ต่อราโรคพืช				
	Cc	Cg	Fo	Fs	Ps
1. <i>Leptosphaeria peruviana</i> BUCS 002	4+/ SBAdw, LNAdw	4+/ PDAdw, PDAsw, YMGdw, LNAdw, LNAsw	4+/ SBAdw, LNAsw	4+/ YMGdw, YMGsw	4+/ PDAdw,PDAsw, SBAdw, SBAsw, YMGdw, YMGsw, LNAdw, LNAsw
2. <i>Aigialus</i> like BUCS 004	3+/ PDAsw, LNAdw	2+/ SBAdw, YMGsw, LNAdw, LNAsw	3+/ LNAdw, LNAsw	3+/ LNAdw, LNAsw	4+/ PDAdw,PDAsw, SBAdw, SBAsw, YMGdw, YMGsw,
3. <i>Periconia prolifica</i> BUCS 007	4+/ PDAsw, YMGdw, YMGsw	4+/ PDAsw, SBAsw, YMGdw, YMGsw, LNAdw	4+/ SBAdw, SBAsw	3+/ PDAsw, SBAdw, YMGdw	4+/ SBAdw,SBAsw, YMGdw, YMGsw

ตารางที่ 8 ระดับ antibiotic ที่ทดสอบอาหารชนิดต่างๆ ของราทะเล 20 สายพันธุ์ ต่อราโรคพืช (ต่อ)

ราทะเล	ระดับ antibiotic ต่อราโรคพืช				
	Cc	Cg	Fo	Fs	Ps
4. <i>Verruculina enalia</i> BUCS 009	4+/ YMGdw	4+/ SBAdw, SBAsw, YMGsw	2+/ PDAdw, PDAsw, SBAdw, YMGsw, LNAdw, LNAsw	3+/ PDAdw, YMGsw	4+/ PDAdw, YMGdw, YMGsw
5. <i>Savoryella paucispora</i> BUCS 011	2+/ PDAsw, SBAdw, SBAsw	3+/ PDAdw	2+/ LNAdw, LNAsw	3+/ SBAsw, YMGdw, YMGsw	4+/ LNAdw
6. <i>Aniptodera longispora</i> BUCS 017-1	4+/ SBAdw, SBAsw, LNAdw	4+/ PDAsw	1+ SBAsw, YMGdw, YMGsw, LNAdw	3+/ PDAdw, PDAsw, SBAsw, YMGsw	4+/ SBAsw
7. <i>Zalerion varium</i> BUCS 020	3+/ YMGdw, LNAdw, LNAsw	4+/ PDAdw, YMGsw,	4+/ SBAdw, SBAsw, YMGdw, LNAdw	3+/ SBAsw, LNAdw, LNAsw	4+/ SBAdw, LNAdw
8. <i>Xylomyces</i> sp.3 BUCS 022	4+/ PDAdw, PDAsw, YMGdw,TMGsw, LNAdw	4+/ PDAdw, YMGsw	3+/ PDAsw	2+/ SBAsw	4+/ PDAdw, PDAsw, YMGdw, LNAdw

ตารางที่ 8 ระดับ antibiosis ที่สิ้นสุดบนอาหารชนิดต่างๆ ของราทะเล 20 สายพันธุ์ ต่อราโรคพืช (ต่อ)

ราทะเล	ระดับ antibiosis ต่อราโรคพืช				
	Cc	Cg	Fo	Fs	Ps
9. <i>Lulworthia</i> sp.1 BUCS 023-1	3+/ SBAsw, YMGsw	4+/ YMGsw	3+/ SBAsw	-	4+/ LNAdw, LNAsw
10. <i>Verruculina enalia</i> BUCS 027-1	4+/ PDAsw, SBAsw	4+/ PDAdw, LNAdw	3+/ YMGdw, LNAsw	3+/ SBAsw, YMGsw	4+/ PDAsw, SBAdw, YMGdw
11. <i>Verruculina enalia</i> BUCS 027-2	4+/ PDAdw	3+/ PDAdw, YMGdw, YMGsw	3+/ SBAdw	2+/ PDAdw, YMGdw	4+/ SBAsw
12. <i>Saagaromyces abonnis</i> BUCS 032-1	3+/ PDAdw, PDAsw, SBAdw, YMGsw	4+/ PDAdw, SBAdw	2+/ PDAdw, PDAsw, SBAsw, LNAdw,	4+/ PDAdw, YMGdw, LNAdw	3+/ PDAdw, YMGdw
13. <i>Saagaromyces abonnis</i> BUCS 032-2	4+/ SBAdw, LNAsw	4+/ PDAdw, LNAdw, LNAsw	3+/ YMGdw, LNAdw	3+/ PDAdw, YMGdw, LNAdw, LNAsw	4+/ PDAdw, SBAsw, YMGsw

ตารางที่ 8 ระดับ antibiosis ที่ดีที่สุดในอาหารชนิดต่างๆ ของราทะเล 20 สายพันธุ์ ต่อราโรคพืช (ต่อ)

ราทะเล	ระดับ antibiosis ต่อราโรคพืช				
	Cc	Cg	Fo	Fs	Ps
14. <i>Verruculina enalia</i> BUCS 034-1	4+/ PDAdw, LNA _{dw} , LNA _{sw}	4+/ PDAdw, PDA _{sw} , SBAdw, YMG _{dw} , LNA _{sw}	2+/ PDAdw, PDA _{sw} , YMG _{dw} , YMG _{sw}	2+/ PDAdw, PDA _{sw} , SBAdw, SBAsw, YMG _{dw} , YMG _{sw} ,	4+/ PDAdw, PDA _{sw} , SBAdw, YMG _{dw} , LNA _{dw} , LNA _{sw}
15. <i>Verruculina enalia</i> BUCS 034-2	4+/ SBAsw, YMG _{dw}	4+/ SBAdw, SBAsw, YMG _{dw} , YMG _{sw}	1+/ PDA _{sw}	2+/ SBAdw	3+/ YMG _{dw}
16. <i>Cirrenalia pygmea</i> BUCS 051	3+/ LNA _{dw}	4+/ LNA _{dw} , LNA _{sw}	3+/ LNA _{dw}	3+/ PDAdw, LNA _{dw}	3+/ LNA _{dw} , LNA _{sw}
17. <i>Verruculina enalia</i> BUSK 055-1	3+/ PDAdw, PDA _{sw} , SBAdw, SBAsw, YMG _{sw}	4+/ PDAdw, SBAdw,	3+/ LNA _{dw}	3+/ Dadw, SBAdw, YMG _{dw} , YMG _{sw}	4+/ LNA _{dw}
18. <i>Astrosphaeriella striatispora</i>	4+/ SBAdw, LNA _{dw}	4+/ SBAdw, LNA _{dw}	3+/ LNA _{dw}	3+/ LNA _{dw}	4+/ SBAdw, LNA _{dw}

ตารางที่ 8 ระดับ antibiosis ที่ดีที่สุดบนอาหารชนิดต่างๆ ของราทะเล 20 สายพันธุ์ ต่อราโรคพืช (ต่อ)

ราทะเล	ระดับ antibiosis ต่อราโรคพืช				
	Cc	Cg	Fo	Fs	Ps
19. <i>Rhizophora marina</i> BUCB 201-2	4+/ YMGdw	4+/ LNAdw	4+/ LNAdw	4+/ LNAdw	4+/ LNAdw
20. <i>Verruculina enalia</i> BUCH 215-1	3+/ PDAsw, SBAsw, YMGsw, LNAdw	4+/ PDAdw, PDAsw, SBAdw, SBAsw, YMGdw, LNAdw	2+/ SBAdw	4+/ YMGsw	3+/ PDAdw, PDAsw, SBAdw

หมายเหตุ Cc = *Colletotrichum capsici* DOAC 1511, Cg = *C. gloeosporioides* DOAC 0782, Fo = *Fusarium oxysporum* DOAC 1808, Fs = *F. subglutinans* DOAC 0761, Ps =*Pestalotiopsis* sp.DOAC 1098,

PDA = potato dextrose agar, SBA = Sabouraud agar, YMG = yeast malt glucose agar, LNA = low nutrient agar, dw = distilled water, sw = seawater

ระดับปฏิสัมพันธ์ antibiosis :ระดับปานกลาง 2+ ระยะถูกยับยั้ง > 2 - ≤ 6มิลลิเมตร, ระดับแรง 3+ ระยะถูกยับยั้ง > 6 -≤10 มิลลิเมตร, 4+ ระดับแรงมาก ระยะถูกยับยั้ง >10 มิลลิเมตร

อาหารที่ให้ผลยับยั้งดีที่สุดแสดงหลังเครื่องหมาย /

ตารางที่ 9 อาหารเลี้ยงเชื้อและจำนวนราทะเลที่ให้ผล antibiosis ระดับต่างๆ

จำนวนราทะเลที่มีปฏิสัมพันธ์กับราโรคพืช																											
<i>C. capsici</i>					<i>C. gloeosporioides</i>					<i>F. oxysporum</i>					<i>F. subglutinans</i>					<i>Pestalotiopsis</i> sp.					antibiosis		
Media	0	1+	2+	3+	4+	0	1+	2+	3+	4+	0	1+	2+	3+	4+	0	1+	2+	3+	4+	0	1+	2+	3+	4+	3+	4+
PDA _{dw}	29	12	11	8	5	27	13	7	8	10	46	4	14	1	0	41	9	7	6	2	26	13	11	9	6	32	23
PDA _{sw}	33	11	9	9	3	30	9	13	7	6	45	6	12	2	0	50	8	4	3	0	34	8	14	3	6	24	15
SBA _{dw}	36	9	10	6	4	25	17	11	5	7	43	3	15	1	3	43	4	10	7	1	22	13	13	9	8	26	23
SBA _{sw}	35	9	10	8	3	38	9	7	7	4	52	6	3	2	2	45	6	8	5	1	33	13	10	3	6	25	16
YMG _{dw}	40	7	5	8	5	35	7	8	10	5	45	8	8	3	1	45	2	9	7	2	29	9	10	8	9	36	20
YMG _{sw}	41	9	2	11	2	34	8	9	8	6	49	7	9	0	0	50	4	4	5	2	38	11	4	7	5	31	15
LN _{dw}	35	6	8	8	8	24	11	11	9	10	40	6	11	6	2	45	7	3	7	3	29	11	6	7	12	37	35
LN _{sw}	31	15	11	6	2	32	7	12	8	6	47	9	6	2	1	47	8	5	3	2	39	6	13	4	3	15	14

หมายเหตุ PDA = potato dextrose agar, SBA= Sabouraud agar, YMG = yeast malt glucose agar, LNA = low nutrient agar,

dw = distilled water, sw = seawater

ระดับปฏิสัมพันธ์ antibiosis : 0= ไม่ยับยั้ง , ระดับอ่อน 1+ ระยะถูกยับยั้ง ≤2 มิลลิเมตร, ระดับปานกลาง 2+ ระยะถูกยับยั้ง >2 - ≤ 6มิลลิเมตร,

ระดับแรง 3+ ระยะถูกยับยั้ง > 6 -≤10 มิลลิเมตร, 4+ ระดับแรงมาก ระยะถูกยับยั้ง >10 มิลลิเมตร

บทที่ 4

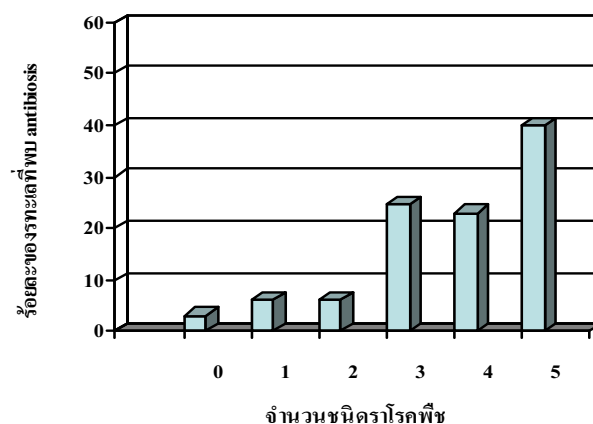
ผลการทดลองราทะเล

1. ปฏิสัมพันธ์รูปแบบ antibiosis ระหว่างราทะเลกับราโรคพืช

จากการนำราทะเล 65 สายพันธุ์ มาศึกษาปฏิสัมพันธ์รูปแบบ antibiosis ระหว่างราทดสอบกับราโรคพืช 5 ชนิด ได้แก่ *Colletotrichum capsici* (Cc) DOAC 1511, *C. gloeosporioides* (Cg) DOAC 0782, *Fusarium oxysporum* (Fo) DOAC 1808, *F. subglutinans* (Fs) DOAC 0761 และ *Pestalotiopsis* sp. (Ps) DOAC 1098 บนอาหาร 8 ชนิด คือ PDA, SBA, YMG และ LNA ที่เตรียมด้วยน้ำกลั่น หรือน้ำทะเล รวมทั้งหมด 2600 คู่ พบระดับปฏิสัมพันธ์รูปแบบ antibiosis แตกต่างกันตั้งแต่ไม่พบ antibiosis (0) จนกระทั่งพบในระดับแรงมาก (4+) ระดับความแรง antibiosis และจำนวนสายพันธุ์ราทะเลที่ให้ผลบวกขึ้นกับชนิดของราทะเลและราโรคพืชที่นำมาทดสอบ

1.1 ความสามารถในการแสดงผล antibiosis ของราทะเล

ราทะเลเกือบทั้งหมดที่นำมาศึกษา คือ 63 สายพันธุ์ (ยกเว้น *Trichocladium nypae* BUCS 037 และ *Lulworthia* sp. 3 BUCS 043-1) จากทั้งหมด 65 สายพันธุ์ (96.9%) สามารถแสดงผล antibiosis เมื่อเลี้ยงร่วมกับราโรคพืชชนิดใดชนิดหนึ่ง และ 27 สายพันธุ์ จาก 65 สายพันธุ์ (41.5%) แสดงผล antibiosis เมื่อเลี้ยงร่วมกับราโรคพืชทุกชนิด ราทะเล 55 สายพันธุ์ จาก 65 สายพันธุ์ (84.6%) แสดงผล antibiosis กับราโรคพืช 3-5 ชนิด ความสามารถในการแสดงผล antibiosis ของราทะเลแสดงไว้ในภาพที่ 3 และผลระดับ antibiosis ของราทะเล 63 สายพันธุ์ในการยับยั้งราโรคพืชแสดงใน ตารางที่ 7 โดยแสดงผลของราทะเลแต่ละสายพันธุ์ ที่เลี้ยงบนอาหาร 5 ชนิดในการยับยั้งราโรคพืช 5 ชนิด



ภาพที่ 3 ร้อยละของราทะเลที่แสดงผล antibiosis ต่อจำนวนชนิดราโรคพืช

ตารางที่ 7 ระดับ antibiosis ของราทะเล บนอาหารแข็งชนิดต่างๆ ที่มีต่อราโรคพืช

ลำดับ	ราทะเล	อาหาร	ระดับ antibiosis ต่อราโรคพืช				
			Cc	Cg	Fo	Fs	Ps
1	<i>Helicorhoidion nypicola</i> BUCS 001	PDA _{dw}	0	0	2+	0	0
		PDA _{sw}	0	0	2+	0	0
		SBA _{dw}	2+	0	2+	0	0
		SBA _{sw}	2+	0	0	0	0
		YMG _{dw}	0	0	0	0	0
		YMG _{sw}	0	1+	0	0	0
		LNA _{dw}	4+	4+	0	0	1+
		LNA _{sw}	0	0	0	0	0
2	<i>Leptosphaeria peruviana</i> BUCS 002	PDA _{dw}	3+	4+	3+	3+	4+
		PDA _{sw}	3+	4+	3+	2+	4+
		SBA _{dw}	4+	1+	4+	3+	4+
		SBA _{sw}	3+	0	3+	3+	4+
		YMG _{dw}	3+	4+	2+	4+	4+
		YMG _{sw}	3+	2+	2+	4+	4+
		LNA _{dw}	4+	4+	2+	3+	4+
		LNA _{sw}	2+	4+	4+	1+	4+
3	<i>Zalerion maritimum</i> BUCS 003	PDA _{dw}	2+	3+	0	0	1+
		PDA _{sw}	1+	0	1+	0	1+
		SBA _{dw}	0	1+	0	0	1+
		SBA _{sw}	1+	1+	0	2+	1+
		YMG _{dw}	0	0	0	3+	2+
		YMG _{sw}	0	2+	0	0	0
		LNA _{dw}	2+	4+	0	0	2+
		LNA _{sw}	2+	2+	1+	1+	2+

ตารางที่ 7 ระดับ antibiosis ของราทะเล บนอาหารแข็งชนิดต่างๆ ที่มีต่อราโรคพืช (ต่อ)

ลำดับ	ราทะเล	อาหาร	ระดับ antibiosis ต่อราโรคพืช				
			Cc	Cg	Fo	Fs	Ps
4	<i>Aigialus</i> like BUCS 004	PDAdw	1+	0	0	1+	4+
		PDAsw	3+	0	0	2+	4+
		SBA dw	1+	2+	0	2+	4+
		SBA sw	0	0	0	0	4+
		YMG dw	0	0	0	0	4+
		YMG sw	0	2+	0	0	4+
		LNAdw	2+	2+	0	3+	4+
		LNAsw	2+	2+	0	3+	2+
5	<i>Xylomycete</i> sp.1 BUCS 005	PDAdw	0	0	0	0	1+
		PDAsw	0	0	0	0	0
		SBA dw	0	1+	0	0	2+
		SBA sw	0	0	0	0	0
		YMG dw	0	1+	0	0	0
		YMG sw	0	0	0	0	0
		LNAdw	1+	0	0	0	2+
		LNAsw	0	0	0	0	0
6	<i>Savoryella</i> like BUCS 006	PDAdw	1+	1+	0	0	0
		PDAsw	1+	1+	0	0	0
		SBA dw	0	1+	0	0	1+
		SBA sw	2+	1+	0	0	0
		YMG dw	0	1+	1+	0	0
		YMG sw	2+	1+	0	0	0
		LNAdw	0	1+	0	0	1+
		LNAsw	0	1+	0	0	0

ตารางที่ 7 ระดับ antibiosis ของราทะเล บนอาหารแข็งชนิดต่างๆ ที่มีต่อราโรคพืช (ต่อ)

ลำดับ	ราทะเล	อาหาร	ระดับ antibiosis ต่อราโรคพืช				
			Cc	Cg	Fo	Fs	Ps
7	<i>Periconia prolifica</i> BUCS 007	PDA _{dw}	2+	0	2+	1+	2+
		PDA _{sw}	4+	4+	2+	3+	1+
		SBA _{dw}	2+	0	4+	3+	4+
		SBA _{sw}	3+	4+	4+	1+	4+
		YMG _{dw}	4+	4+	3+	3+	4+
		YMG _{sw}	4+	4+	2+	1+	4+
		LNAd _w	3+	4+	2+	2+	3+
		LNAs _w	2+	1+	0	1+	2+
8	<i>Epicoccum</i> sp. BUCS 008	PDA _{dw}	4+	3+	1+	2+	0
		PDA _{sw}	0	1+	0	0	0
		SBA _{dw}	0	1+	0	2+	2+
		SBA _{sw}	3+	0	0	1+	1+
		YMG _{dw}	3+	2+	1+	0	0
		YMG _{sw}	0	0	1+	0	0
		LNAd _w	2+	1+	3+	0	1+
		LNAs _w	1+	0	1+	1+	2+
9	<i>Verruculina enalia</i> BUCS 009	PDA _{dw}	3+	3+	2+	3+	4+
		PDA _{sw}	2+	3+	2+	1+	3+
		SBA _{dw}	3+	4+	2+	1+	3+
		SBA _{sw}	1+	4+	1	2+	1+
		YMG _{dw}	4+	3+	0	0	4+
		YMG _{sw}	0	4+	2+	3+	4+
		LNAd _w	3+	3+	2+	0	3+
		LNAs _w	1+	2+	2+	0	2+

ตารางที่ 7 ระดับ antibiosis ของราทะเล บนอาหารแข็งชนิดต่างๆ ที่มีต่อราโรคพืช (ต่อ)

ลำดับ	ราทะเล	อาหาร	ระดับ antibiosis ต่อราโรคพืช				
			Cc	Cg	Fo	Fs	Ps
10	<i>Zalerion maritimum</i> BUCS 010	PDA _{dw}	0	1+	0	0	1+
		PDA _{sw}	0	0	0	0	1+
		SBA _{dw}	0	1+	0	0	0
		SBA _{sw}	0	0	0	0	0
		YMG _{dw}	0	0	0	0	0
		YMG _{sw}	0	0	0	0	0
		LNAd _w	0	3+	0	0	0
		LNAs _w	0	2+	0	0	0
11	<i>Savoryella paucispora</i> BUCS 011	PDA _{dw}	1+	3+	0	0	1+
		PDA _{sw}	2+	1+	1+	0	0
		SBA _{dw}	2+	0	0	0	2+
		SBA _{sw}	2+	0	0	3+	1+
		YMG _{dw}	1+	2+	0	3+	1+
		YMG _{sw}	0	2+	0	3+	0
		LNAd _w	1+	2+	2+	0	4+
		LNAs _w	1+	0	2+	0	2+
12	<i>Trichocladium nypae</i> BUCS 012	PDA _{dw}	3+	2+	0	0	2+
		PDA _{sw}	0	0	0	0	2+
		SBA _{dw}	0	2+	2+	0	1
		SBA _{sw}	0	0	0	0	2+
		YMG _{dw}	0	0	0	0	2+
		YMG _{sw}	0	0	0	0	2+
		LNAd _w	1+	1+	0	0	4+
		LNAs _w	1+	1+	0	0	1+

ตารางที่ 7 ระดับ antibiosis ของราทะเล บนอาหารแข็งชนิดต่างๆ ที่มีต่อราโรคพืช (ต่อ)

ลำดับ	ราทะเล	อาหาร	ระดับ antibiosis ต่อราโรคพืช				
			Cc	Cg	Fo	Fs	Ps
13	<i>Lulworthia</i> sp.1 BUCS 013-1	PDAdw	0	0	0	0	0
		PDAsw	0	0	0	0	0
		SBA dw	0	0	0	0	0
		SBA sw	1+	0	0	0	0
		YMG dw	0	0	0	0	0
		YMG sw	0	2+	0	0	0
		LNAdw	0	0	0	0	1+
		LNAsw	0	0	0	0	0
14	<i>Lulworthia</i> sp.1 BUCS 013-2	PDAdw	0	0	0	0	0
		PDAsw	0	1+	0	0	0
		SBA dw	0	0	0	0	0
		SBA sw	0	0	0	0	0
		YMG dw	0	1+	0	0	0
		YMG sw	0	0	0	0	0
		LNAdw	0	1+	2+	0	0
		LNAsw	1+	0	0	0	0
15	<i>Saagaromyces ratnagiriensis</i> BUCS 015-1	PDAdw	0	0	0	4+	3+
		PDAsw	0	0	0	2+	2+
		SBA dw	0	0	0	4+	2+
		SBA sw	0	2+	0	4+	1+
		YMG dw	0	2+	0	2+	2+
		YMG sw	1+	0	0	0	1+
		LNAdw	0	1+	0	4+	0
		LNAsw	1+	0	0	4+	0

ตารางที่ 7 ระดับ antibiosis ของราทะเล บนอาหารแข็งชนิดต่างๆ ที่มีต่อราโรคพืช (ต่อ)

ลำดับ	ราทะเล	อาหาร	ระดับ antibiosis ต่อราโรคพืช				
			Cc	Cg	Fo	Fs	Ps
16	<i>Saagaromyces ratnagiriensis</i> BUCS 015-2	PDA _{dw}	0	0	0	0	0
		PDA _{sw}	0	2+	0	0	0
		SBA _{dw}	0	0	0	0	0
		SBA _{sw}	0	2+	0	0	0
		YMG _{dw}	0	0	0	0	0
		YMG _{sw}	0	0	0	0	0
		LNA _{dw}	0	0	1+	0	1+
		LNA _{sw}	0	0	0	0	0
17	<i>Aniptodera longispora</i> BUCS 017-1	PDA _{dw}	1+	2+	0	3+	2+
		PDA _{sw}	3+	4+	0	3+	2+
		SBA _{dw}	4+	2+	0	0	3+
		SBA _{sw}	4+	3+	1+	3+	4+
		YMG _{dw}	3+	2+	1+	2+	3+
		YMG _{sw}	3+	2+	1+	3+	3+
		LNA _{dw}	4+	2+	1+	0	0
		LNA _{sw}	1+	2+	0	2+	2+
18	<i>Aniptodera longispora</i> BUCS 017-2	PDA _{dw}	0	0	0	0	0
		PDA _{sw}	0	0	0	3+	0
		SBA _{dw}	0	0	0	2+	0
		SBA _{sw}	0	0	0	2+	1+
		YMG _{dw}	0	0	0	2+	0
		YMG _{sw}	0	0	0	1+	0
		LNA _{dw}	1+	1+	0	3+	0
		LNA _{sw}	0	0	0	0	0

ตารางที่ 7 ระดับ antibiosis ของราทะเล บนอาหารแข็งชนิดต่างๆ ที่มีต่อราโรคพืช (ต่อ)

ลำดับ	ราทะเล	อาหาร	ระดับ antibiosis ต่อราโรคพืช				
			Cc	Cg	Fo	Fs	Ps
19	<i>Aniptodera longispora</i> BUCS 017-3	PDAdw	1+	1+	0	0	1+
		PDAsw	0	0	0	0	4+
		SBA dw	1+	2+	0	0	0
		SBA sw	0	0	0	0	0
		YMG dw	0	0	0	0	0
		YMG sw	1+	0	0	0	0
		LNAdw	1+	0	0	0	1+
		LNAsw	0	2+	0	0	0
20	<i>Zalerion varium</i> BUCS 020	PDAdw	2+	4+	2+	2+	3+
		PDAsw	2+	3+	2+	1+	0
		SBA dw	2+	2+	4+	2+	4+
		SBA sw	0	1+	4+	3+	3+
		YMG dw	3+	3+	4+	2+	3+
		YMG sw	0	4+	2+	2+	3+
		LNAdw	3+	3+	4+	3+	4+
		LNAsw	3+	4+	1+	3+	3+
21	<i>Xylomyces</i> sp.2 BUCS 021	PDAdw	0	2+	0	0	2+
		PDAsw	0	4+	0	0	2+
		SBA dw	0	3+	0	0	1+
		SBA sw	0	3+	0	0	0
		YMG dw	0	3+	0	0	2+
		YMG sw	3+	3+	1+	0	1+
		LNAdw	2+	2+	0	0	0
		LNAsw	0	2+	0	0	0

ตารางที่ 7 ระดับ antibiosis ของราทะเล บนอาหารแข็งชนิดต่างๆ ที่มีต่อราโรคพืช (ต่อ)

ลำดับ	ราทะเล	อาหาร	ระดับ antibiosis ต่อราโรคพืช				
			Cc	Cg	Fo	Fs	Ps
22	<i>Xylomyces</i> sp.3 BUCS 022	PDAdw	4+	4+	2+	0	4+
		PDAsw	4+	3+	3+	0	4+
		SBA dw	1+	1+	2+	0	3+
		SBA sw	0	0	2+	2+	2+
		YMG dw	4+	3+	2+	0	4+
		YMG sw	4+	4+	2+	0	3+
		LNAdw	4+	3+	2+	0	4+
		LNAsw	3+	2+	2+	0	3+
23	<i>Lulworthia</i> sp.1 BUCS 023-1	PDAdw	0	0	2+	0	2+
		PDA sw	2+	2+	0	0	2+
		SBA dw	1+	0	2+	0	3+
		SBA sw	3+	3+	3+	0	3+
		YMG dw	2+	3+	2+	0	2+
		YMG sw	3+	4+	0	0	2+
		LNAdw	2+	3+	2+	0	4+
		LNAsw	2+	3+	0	0	4+
24	<i>Lulworthia</i> sp.1 BUCS 023-2	PDAdw	0	0	0	0	2+
		PDA sw	0	1+	0	0	0
		SBA dw	0	2+	2+	0	2+
		SBA sw	0	1+	0	0	2+
		YMG dw	0	0	0	0	0
		YMG sw	0	0	0	0	0
		LNAdw	0	0	1+	0	0
		LNAsw	1+	0	0	0	0

ตารางที่ 7 ระดับ antibiosis ของราทะเล บนอาหารแข็งชนิดต่างๆ ที่มีต่อราโรคพืช (ต่อ)

ลำดับ	ราทะเล	อาหาร	ระดับ antibiosis ต่อราโรคพืช				
			Cc	Cg	Fo	Fs	Ps
25	<i>Lulworthia</i> sp. 1 BUCS 023-3	PDA _{dw}	2+	0	0	0	2+
		PDA _{sw}	0	0	0	0	3+
		SBA _{dw}	0	1+	0	0	2+
		SBA _{sw}	3+	1+	0	0	2+
		YMG _{dw}	0	0	0	0	2+
		YMG _{sw}	1+	3+	0	0	2+
		LN _{dw}	0	2+	0	0	3+
		LN _{sw}	0	2+	0	0	2+
26	<i>Trichocladium achrasporum</i> BUCS026	PDA _{dw}	0	4+	0	0	0
		PDA _{sw}	0	3+	0	0	0
		SBA _{dw}	0	3+	0	0	0
		SBA _{sw}	0	1+	0	0	0
		YMG _{dw}	0	3+	0	0	0
		YMG _{sw}	0	0	0	0	0
		LN _{dw}	0	0	0	0	0
		LN _{sw}	0	0	0	0	0
27	<i>Verruculina enalia</i> BUCS 027-1	PDA _{dw}	3+	4+	2+	1+	3+
		PDA _{sw}	4+	2+	2+	1+	4+
		SBA _{dw}	3+	3+	2+	1+	4+
		SBA _{sw}	4+	3+	0	2+	2+
		YMG _{dw}	3+	0	3+	1+	4+
		YMG _{sw}	3+	0	2+	2+	3+
		LN _{dw}	2+	4+	2+	1+	3+
		LN _{sw}	3+	3+	3+	1+	2+

ตารางที่ 7 ระดับ antibiosis ของราทะเล บนอาหารแข็งชนิดต่างๆ ที่มีต่อราโรคพืช (ต่อ)

ลำดับ	ราทะเล	อาหาร	ระดับ antibiosis ต่อราโรคพืช				
			Cc	Cg	Fo	Fs	Ps
28	<i>Verruculina enalia</i> BUCS 027-2	PDAdw	4+	3+	2+	2+	3+
		PDAsw	3+	2+	2+	1+	3+
		SBA dw	2+	2+	3+	1+	3+
		SBA sw	2+	2+	0	1+	4+
		YMG dw	0	3+	2+	2+	3+
		YMG sw	0	3+	0	1+	3+
		LNAdw	3+	2+	2+	1+	2+
		LNAsw	1+	1+	0	1+	2+
29	<i>Trichocladium nypae</i> BUCS 029	PDAdw	4+	1+	0	0	0
		PDAsw	0	0	0	0	0
		SBA dw	0	0	0	0	0
		SBA sw	0	0	0	0	0
		YMG dw	3+	0	0	0	0
		YMG sw	0	0	0	0	0
		LNAdw	0	0	0	0	1+
		LNAsw	1+	0	0	0	0
30	<i>Aniptodera longispora</i> BUCS 030-1	PDAdw	1+	1+	0	0	0
		PDAsw	2+	0	0	0	0
		SBA dw	0	3+	0	0	0
		SBA sw	0	0	0	0	0
		YMG dw	0	0	0	0	0
		YMG sw	0	0	0	0	0
		LNAdw	0	2+	0	0	0
		LNAsw	2+	0	0	0	1+

ตารางที่ 7 ระดับ antibiosis ของราทะเล บนอาหารแข็งชนิดต่างๆ ที่มีต่อราโรคพืช (ต่อ)

ลำดับ	ราทะเล	อาหาร	ระดับ antibiosis ต่อราโรคพืช				
			Cc	Cg	Fo	Fs	Ps
31	<i>Aniptodera longispora</i> BUCS 030-2	PDAdw	0	1+	0	0	1+
		PDAsw	0	0	0	0	1+
		SBA dw	0	0	0	0	1+
		SBA sw	1+	0	0	0	0
		YMG dw	0	0	0	0	1+
		YMG sw	0	0	0	0	0
		LNAdw	4+	2+	0	0	0
		LNAsw	2+	0	0	0	0
32	<i>Saagaromyces ratnagiriensis</i> BUCS 032-1	PDAdw	3+	4+	2+	4+	3+
		PDAsw	3+	3+	2+	0	2+
		SBA dw	3+	4+	1+	3+	0
		SBA sw	2+	2+	2+	2+	0
		YMG dw	2+	3+	1+	4+	3+
		YMG sw	3+	3+	1+	2+	0
		LNAdw	2+	3+	2+	4+	2+
		LNAsw	2+	3+	2+	4+	2+
33	<i>Saagaromyces ratnagiriensis</i> BUCS 032-2	PDAdw	0	4+	1+	3+	4+
		PDAsw	0	3+	2+	1+	0
		SBA dw	4+	3+	2+	3+	2+
		SBA sw	3+	1+	2+	3+	4+
		YMG dw	0	3+	3+	3+	3+
		YMG sw	3+	2+	2+	3+	4+
		LNAdw	0	4+	3+	3+	2+
		LNAsw	4+	4+	0	2+	2+

ตารางที่ 7 ระดับ antibiosis ของราทะเล บนอาหารแข็งชนิดต่างๆ ที่มีต่อราโรคพืช (ต่อ)

ลำดับ	ราทะเล	อาหาร	ระดับ antibiosis ต่อราโรคพืช				
			Cc	Cg	Fo	Fs	Ps
34	<i>Verruculina enalia</i> BUCS 034-1	PDAdw	4+	4+	2+	2+	4+
		PDAsw	3+	4+	2+	2+	4+
		SBA dw	2+	4+	0	2+	4+
		SBA sw	2+	3+	0	2+	2+
		YMG dw	3+	4+	0	2+	4+
		YMG sw	3+	3+	2+	2+	3+
		LNAdw	4+	3+	2+	2+	4+
		LNAsw	4+	4+	1+	2+	4+
35	<i>Verruculina enalia</i> BUCS 034-2	PDAdw	2+	3+	0	1+	3+
		PDAsw	2+	2+	0	0	2+
		SBA dw	3+	4+	1+	2+	3+
		SBA sw	4+	4+	0	1+	2+
		YMG dw	4+	4+	0	0	4+
		YMG sw	2+	4+	0	0	3+
		LNAdw	3+	3+	0	0	3+
		LNAsw	3+	3+	0	0	1+
36	<i>Trichocladium achrasporum</i> BUCS 036	PDAdw	1+	2+	0	0	1+
		PDAsw	1+	2+	0	0	2+
		SBA dw	0	1+	0	0	1+
		SBA sw	0	2+	0	0	0
		YMG dw	0	2+	0	0	0
		YMG sw	0	1+	0	0	0
		LNAdw	0	2+	0	0	0
		LNAsw	0	3+	1+	2+	0

ตารางที่ 7 ระดับ antibiosis ของราทะเล บนอาหารแข็งชนิดต่างๆ ที่มีต่อราโรคพืช (ต่อ)

ลำดับ	ราทะเล	อาหาร	ระดับ antibiosis ต่อราโรคพืช				
			Cc	Cg	Fo	Fs	Ps
37	<i>Lignicola leavis</i> BUCS 038-1	PDA _{dw}	2+	0	0	0	1+
		PDA _{sw}	0	2+	0	0	1+
		SBA _{dw}	0	0	0	0	0
		SBA _{sw}	0	0	0	0	2+
		YMG _{dw}	0	0	0	0	0
		YMG _{sw}	0	0	0	0	0
		LNA _{dw}	0	0	0	0	0
		LNA _{sw}	0	1+	0	0	0
38	<i>Lignicola leavis</i> BUCS 038-2	PDA _{dw}	0	0	0	1+	0
		PDA _{sw}	2+	2+	0	0	0
		SBA _{dw}	2+	2+	0	0	2+
		SBA _{sw}	2+	0	0	0	1+
		YMG _{dw}	3+	0	0	0	4+
		YMG _{sw}	0	0	0	0	1+
		LNA _{dw}	0	1+	0	2+	3+
		LNA _{sw}	0	0	0	0	0
39	<i>Lignicola leavis</i> BUCS 038-3	PDA _{dw}	2+	2+	0	0	3+
		PDA _{sw}	2+	2+	0	0	2+
		SBA _{dw}	0	0	0	0	4+
		SBA _{sw}	0	0	0	0	1+
		YMG _{dw}	0	0	0	0	0
		YMG _{sw}	0	1+	0	0	0
		LNA _{dw}	0	2+	0	0	2+
		LNA _{sw}	0	2+	0	0	2+

ตารางที่ 7 ระดับ antibiosis ของราทะเล บนอาหารแข็งชนิดต่างๆ ที่มีต่อราโรคพืช (ต่อ)

ลำดับ	ราทะเล	อาหาร	ระดับ antibiosis ต่อราโรคพืช				
			Cc	Cg	Fo	Fs	Ps
40	<i>Aniptodera longispora</i> BUCS 041-1	PDA _{dw}	0	0	0	0	0
		PDA _{sw}	0	0	0	0	0
		SBA _{dw}	0	2+	0	0	0
		SBA _{sw}	0	0	0	0	0
		YMG _{dw}	0	0	0	0	0
		YMG _{sw}	0	0	0	0	0
		LNA _{dw}	0	0	0	0	0
		LNA _{sw}	0	0	0	0	0
41	<i>Aniptodera longispora</i> BUCS 041-2	PDA _{dw}	0	0	0	1+	0
		PDA _{sw}	0	0	0	1+	0
		SBA _{dw}	0	1+	0	2+	1+
		SBA _{sw}	0	0	0	0	0
		YMG _{dw}	0	0	1+	0	1+
		YMG _{sw}	0	2+	0	0	0
		LNA _{dw}	0	1+	0	1+	0
		LNA _{sw}	0	2+	1+	0	0
42	<i>Lulworthia</i> sp.3 BUCS 043-2	PDA _{dw}	0	0	0	0	1+
		PDA _{sw}	0	0	0	0	0
		SBA _{dw}	0	0	0	0	1+
		SBA _{sw}	0	0	0	0	0
		YMG _{dw}	0	0	0	0	0
		YMG _{sw}	0	0	0	0	0
		LNA _{dw}	0	0	0	0	0
		LNA _{sw}	0	0	0	0	0

ตารางที่ 7 ระดับ antibiosis ของราทะเล บนอาหารแข็งชนิดต่างๆ ที่มีต่อราโรคพืช (ต่อ)

ลำดับ	ราทะเล	อาหาร	ระดับ antibiosis ต่อราโรคพืช				
			Cc	Cg	Fo	Fs	Ps
43	<i>Lulworthia</i> sp.3 BUCS 043-3	PDA _{dw}	0	1+	0	0	0
		PDA _{sw}	0	0	0	0	0
		SBA _{dw}	0	1+	0	0	3+
		SBA _{sw}	0	0	0	0	1+
		YMG _{dw}	0	0	0	1+	1+
		YMG _{sw}	0	1+	0	0	0
		LN _{dw}	0	0	0	0	0
		LN _{sw}	0	0	0	0	0
44	<i>Verruculina enalia</i> BUCS 046-2	PDA _{dw}	0	0	0	0	0
		PDA _{sw}	0	1+	0	0	1+
		SBA _{dw}	0	0	0	0	2+
		SBA _{sw}	0	1+	0	0	0
		YMG _{dw}	0	0	0	0	3+
		YMG _{sw}	3+	0	0	0	0
		LN _{dw}	0	0	0	0	4+
		LN _{sw}	0	0	0	0	0
45	<i>Zalerion varium</i> BUCS 048	PDA _{dw}	3+	0	0	0	0
		PDA _{sw}	0	0	0	0	0
		SBA _{dw}	3+	1+	0	0	0
		SBA _{sw}	0	0	0	0	0
		YMG _{dw}	0	0	0	0	0
		YMG _{sw}	0	0	0	0	0
		LN _{dw}	0	0	0	0	0
		LN _{sw}	0	0	0	0	0

ตารางที่ 7 ระดับ antibiosis ของราทะเล บนอาหารแข็งชนิดต่างๆ ที่มีต่อราโรคพืช (ต่อ)

ลำดับ	ราทะเล	อาหาร	ระดับ antibiosis ต่อราโรคพืช				
			Cc	Cg	Fo	Fs	Ps
46	<i>Anthostomlla</i> sp. BUCS 049	PDA _{dw}	0	1+	1+	0	2+
		PDA _{sw}	1+	2+	0	0	0
		SBA _{dw}	0	1+	0	0	0
		SBA _{sw}	0	1+	0	0	1+
		YMG _{dw}	0	1+	0	0	0
		YMG _{sw}	0	0	0	0	0
		LNA _{dw}	2+	0	0	0	0
		LNA _{sw}	1+	0	0	0	0
47	<i>Trichocladium achrasporum</i> BUCS 050	PDA _{dw}	3+	2+	0	0	1+
		PDA _{sw}	0	1+	1+	0	0
		SBA _{dw}	1+	0	0	0	3+
		SBA _{sw}	0	0	0	0	0
		YMG _{dw}	0	2+	0	0	0
		YMG _{sw}	0	3+	0	0	0
		LNA _{dw}	0	2+	0	0	0
		LNA _{sw}	0	3+	0	0	0
48	<i>Cirrenalia pygmea</i> BUCS 051	PDA _{dw}	1+	1+	2+	3+	2+
		PDA _{sw}	2+	0	2+	0	0
		SBA _{dw}	2+	2+	0	2+	0
		SBA _{sw}	2+	0	1+	0	1+
		YMG _{dw}	1+	0	1+	0	1+
		YMG _{sw}	1+	0	1+	0	1+
		LNA _{dw}	3+	4+	3+	3+	3+
		LNA _{sw}	2+	4+	2+	1+	3+

ตารางที่ 7 ระดับ antibiosis ของราทะเล บนอาหารแข็งชนิดต่างๆ ที่มีต่อราโรคพืช (ต่อ)

ลำดับ	ราทะเล	อาหาร	ระดับ antibiosis ต่อราโรคพืช				
			Cc	Cg	Fo	Fs	Ps
49	<i>Cirrenalia pygmaea</i> BUCS 052	PDAdw	2+	2+	0	2+	0
		PDAsw	1+	0	1+	0	2+
		SBA dw	1+	0	2+	0	0
		SBA sw	1+	0	1+	1+	0
		YMG dw	0	0	0	0	2+
		YMG sw	0	0	0	0	0
		LNAdw	0	0	0	0	0
		LNAsw	2+	0	0	0	0
50	<i>Oxydothis</i> sp. BUSK 043-2	PDAdw	0	0	0	0	0
		PDA sw	1+	0	0	0	2+
		SBA dw	0	0	0	0	2+
		SBA sw	1+	0	0	0	0
		YMG dw	1+	0	0	0	0
		YMG sw	0	0	0	0	0
		LNAdw	0	0	0	0	0
		LNAsw	0	0	0	0	0
51	<i>Astrosphaeriella striatispora</i> BUSK 055-1	PDAdw	3+	4+	2+	3+	2+
		PDA sw	3+	3+	2+	1+	1+
		SBA dw	3+	4+	2+	3+	2+
		SBA sw	3+	3+	1+	0	2+
		YMG dw	2+	2+	2+	3+	2+
		YMG sw	3+	3+	2+	3+	1+
		LNAdw	2+	3+	3+	0	4+
		LNAsw	2+	3+	1+	0	0

ตารางที่ 7 ระดับ antibiosis ของราทะเล บนอาหารแข็งชนิดต่างๆ ที่มีต่อราโรคพืช (ต่อ)

ลำดับ	ราทะเล	อาหาร	ระดับ antibiosis ต่อราโรคพืช				
			Cc	Cg	Fo	Fs	Ps
52	<i>Astrosphaeriella striatispora</i> BUSK 057-3	PDAdw	2+	3+	0	2+	3+
		PDAsw	1+	2+	0	0	2+
		SBA dw	4+	4+	2+	1+	4+
		SBA sw	2+	2+	1+	0	1+
		YMG dw	2+	3+	2+	2+	3+
		YMG sw	0	0	0	1+	1+
		LNAdw	4+	4+	3+	3+	4+
		LNAsw	3+	4+	2+	2+	3+
53	<i>Zophiella</i> sp. BUSK 064-1	PDAdw	1+	1+	2+	2+	2+
		PDA sw	1+	1+	0	0	0
		SBA dw	2+	1+	2+	2+	2+
		SBA sw	2+	0	0	1+	1+
		YMG dw	1+	1+	2+	0	2+
		YMG sw	1+	1+	0	0	1+
		LNAdw	0	1+	0	0	1+
		LNAsw	1+	0	0	0	1+
54	<i>Rhizophora marina</i> BUCB 201-1	PDAdw	0	0	0	0	0
		PDA sw	1+	0	0	0	0
		SBA dw	1+	0	0	0	0
		SBA sw	0	0	0	0	0
		YMG dw	0	0	0	0	0
		YMG sw	0	0	0	0	0
		LNAdw	0	0	0	0	0
		LNAsw	0	0	0	0	0

ตารางที่ 7 ระดับ antibiosis ของราทะเล บนอาหารแข็งชนิดต่างๆ ที่มีต่อราโรคพืช (ต่อ)

ลำดับ	ราทะเล	อาหาร	ระดับ antibiosis ต่อราโรคพืช				
			Cc	Cg	Fo	Fs	Ps
55	<i>Rhizophora marina</i> BUCB 201-2	PDA _{dw}	0	1+	2+	0	1+
		PDA _{sw}	0	2+	0	0	0
		SBA _{dw}	0	2+	1+	3+	0
		SBA _{sw}	0	2+	0	0	0
		YMG _{dw}	4+	2+	2+	3+	3+
		YMG _{sw}	0	0	0	0	0
		LNA _{dw}	4+	4+	4+	4+	4+
		LNA _{sw}	3+	3+	0	3+	0
56	<i>Lulworthia</i> sp. 4 BUCH 206	PDA _{dw}	1+	0	0	1+	1+
		PDA _{sw}	1+	0	0	0	0
		SBA _{dw}	1+	0	1+	2+	1+
		SBA _{sw}	1+	0	0	0	0
		YMG _{dw}	1+	0	1+	0	0
		YMG _{sw}	1+	1+	0	0	0
		LNA _{dw}	0	1+	0	0	0
		LNA _{sw}	1+	0	1+	0	0
57	<i>Verruculina enalia</i> BUCH 215-1	PDA _{dw}	2+	4+	1+	2+	3+
		PDA _{sw}	3+	4+	1+	0	3+
		SBA _{dw}	2+	4+	2+	3+	3+
		SBA _{sw}	3+	4+	0	2+	2+
		YMG _{dw}	2+	4+	0	3+	2+
		YMG _{sw}	3+	3+	1+	4+	1+
		LNA _{dw}	3+	4+	1+	1+	1+
		LNA _{sw}	2+	2+	1+	1+	1+

ตารางที่ 7 ระดับ antibiosis ของราทะเล บนอาหารแข็งชนิดต่างๆ ที่มีต่อราโรคพืช (ต่อ)

ลำดับ	ราทะเล	อาหาร	ระดับ antibiosis ต่อราโรคพืช				
			Cc	Cg	Fo	Fs	Ps
58	<i>Cumulospora</i> sp. BURY 203	PDA _{dw}	1+	2+	0	0	1+
		PDA _{sw}	1+	2+	0	0	1+
		SBA _{dw}	0	0	0	0	2+
		SBA _{sw}	0	0	0	0	0
		YMG _{dw}	1+	1+	0	2+	1+
		YMG _{sw}	1+	1+	0	0	0
		LNA _{dw}	0	0	0	1+	3+
		LNA _{sw}	0	1+	0	0	0
59	<i>Monodictis pelligica</i> BURY 205	PDA _{dw}	2+	0	0	1+	0
		PDA _{sw}	0	0	0	0	0
		SBA _{dw}	1+	1+	0	0	1+
		SBA _{sw}	1+	0	0	0	0
		YMG _{dw}	1+	0	0	0	0
		YMG _{sw}	1+	0	0	0	1+
		LNA _{dw}	1+	0	1+	0	0
		LNA _{sw}	0	0	0	0	0
60	<i>Cirrenalia pygmea</i> BUCB 208	PDA _{dw}	1+	0	0	0	0
		PDA _{sw}	0	0	0	0	0
		SBA _{dw}	0	1+	2+	0	1+
		SBA _{sw}	0	0	0	0	0
		YMG _{dw}	0	1+	1+	0	0
		YMG _{sw}	0	0	0	0	0
		LNA _{dw}	0	0	1+	0	0
		LNA _{sw}	0	0	0	0	0

ตารางที่ 7 ระดับ antibiosis ของราทะเล บนอาหารแข็งชนิดต่างๆ ที่มีต่อราโรคพืช (ต่อ)

ลำดับ	ราทะเล	อาหาร	ระดับ antibiosis ต่อราโรคพืช				
			Cc	Cg	Fo	Fs	Ps
61	<i>Saagaromyces ratnagiriensis</i> BUPK 416-1	PDAdw	0	1+	0	0	0
		PDAsw	3+	3+	0	1+	2+
		SBA dw	0	1+	0	0	0
		SBA sw	1+	3+	0	0	3+
		YMG dw	0	0	0	0	1+
		YMG sw	1+	2+	0	0	2+
		LNAdw	0	1+	0	0	0
		LNAsw	1+	1+	0	0	1+
62	<i>Corollospora pulchella</i> BUKB 423-1	PDAdw	0	1+	0	0	0
		PDAsw	0	0	0	0	0
		SBA dw	0	0	0	0	1+
		SBA sw	0	0	0	0	0
		YMG dw	0	0	0	0	1+
		YMG sw	0	0	0	0	1+
		LNAdw	0	0	0	1+	1+
		LNAsw	0	0	0	0	0
63	<i>Arenariomyces trifurcata</i> BUPK 425-1	PDAdw	0	0	0	0	0
		PDAsw	0	0	0	0	0
		SBA dw	0	0	0	0	1+
		SBA sw	0	0	0	0	0
		YMG dw	0	0	0	2+	1+
		YMG sw	0	0	0	0	1+
		LNAdw	0	0	0	1+	0
		LNAsw	0	0	0	0	0

หมายเหตุ Cc = *Colletotrichum capsici* DOAC 1511, Cg = *C. gloeosporioides* DOAC 0782,

Fo = *Fusarium oxysporum* DOAC 1808, Fs = *F. subglutinans* DOAC 0761,

Ps = *Pestalotiopsis* sp. DOAC 1098

PDA = potato dextrose agar, SBA = Sabouraud agar, YMG = yeast malt glucose agar,

LNA = low nutrient agar, dw = distilled water, sw = seawater

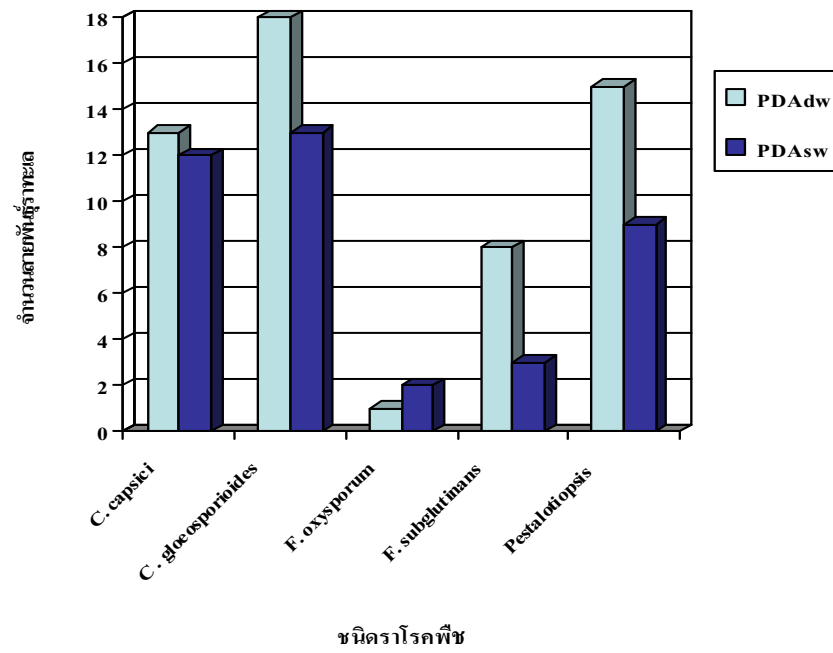
จากตารางที่ 7 จะเห็นว่าเมื่อนำราทะเลมาเลี้ยงร่วมกับราโรคพืชชนิดต่างๆ กัน พบผล antibiosis แตกต่างกัน ซึ่งในที่นี้กำหนดให้ ระดับ antibiosis 1+ และ 2+ เป็นระดับอ่อนและปานกลาง (antibiosis) ส่วน 3+ และ 4+ เป็นระดับดีและดีมาก (strong antibiosis) ราที่ให้ผล antibiosis ดี (พิจารณาจากการแสดงผลบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดีที่สุด) มีจำนวน 20 สายพันธุ์ ราเหล่านี้จะสามารถนำมาสกัดสารยับยั้งราโรคพืชได้ดีเมื่อเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสม ราทั้ง 20 สายพันธุ์ แสดงไว้ในตารางที่ 8 โดยที่ *Leptosphaeria peruviana* BUCS 002 และ *Rhizophora marina* BUCB 201-2 ให้ผล strong positive (4+) ต่อราโรคพืชทั้ง 5 ชนิด และมีราทะเลเพียง 3 สายพันธุ์ คือ *Savoryella paucispora* BUCS 011, *Verruculina enalia* BUCS 034-1 และ BUCS 034-2 ที่ให้ผลยับยั้งตั้งแต่ระดับปานกลาง (2+ - 4+) ต่อราโรคพืช 4-5 ชนิด

เมื่อนำข้อมูลในตารางที่ 7 มาวิเคราะห์จำนวนราทะเลที่สามารถยับยั้งราโรคพืชในระดับต่างๆ บนอาหารทั้ง 8 ชนิด และนำมาแสดงในตารางที่ 9 พบว่าจำนวนราทะเลที่เลี้ยงบนอาหารทั้ง 8 ชนิดให้ผลยับยั้ง *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. capsici* และ *Pestalotiopsis* sp. มีมากกว่าจำนวนราทะเลที่ยับยั้ง *Fusarium oxysporum* และ *F. subglutinans* เมื่อพิจารณาจากระดับ antibiosis ทั้ง 4 ระดับ โดยเฉพาะอย่างยิ่งระดับ 3+ - 4+ จำนวนราทะเลที่ให้ผลยับยั้งดีต่อราโรคพืช 3 ชนิดแรกมีมากกว่าจำนวนราทะเลที่ให้ผลยับยั้งในระดับเดียวกัน (3+ - 4+) ต่อราโรคพืช 2 ชนิดหลัง

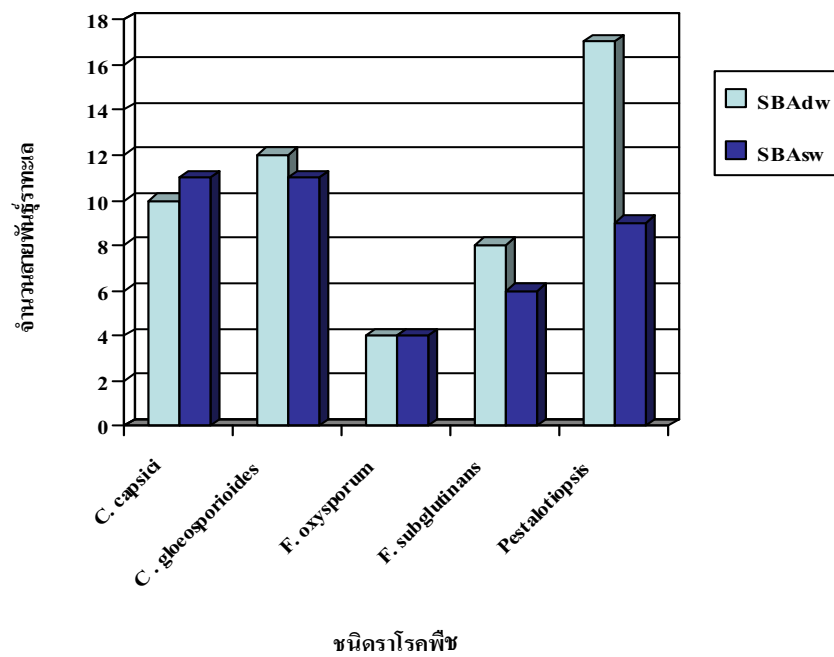
1.2 ผลของการใช้น้ำกลั่นและน้ำทะเลต่อความสามารถในการแสดงผล antibiosis ของราทะเล

เมื่อนำจำนวนราทะเลที่ให้ผล strong antibiosis (3+ - 4+) บนอาหารแข็งชนิดต่างๆ ที่เตรียมจากน้ำกลั่นและน้ำทะเล จากตารางที่ 9 มาเปรียบเทียบกัน พบว่าไม่ว่าจะทำการเลี้ยงราทะเลบนอาหารชนิดใดก็ตาม ราทะเลส่วนใหญ่แสดงผล strong antibiosis บนอาหารที่เตรียมจากน้ำกลั่นได้ดีกว่าที่เตรียมจากน้ำทะเล (ภาพที่ 4a-4d) และไม่ได้เป็นผลจากน้ำทะเล เนื่องจากทั้งราทะเล และราโรคพืชเจริญได้ดีทั้งในน้ำทะเลและน้ำกลั่น (ไม่ได้แสดงผลในที่นี้) ตัวอย่างผลบวกใน dual culture แสดงในภาพที่ 5-7

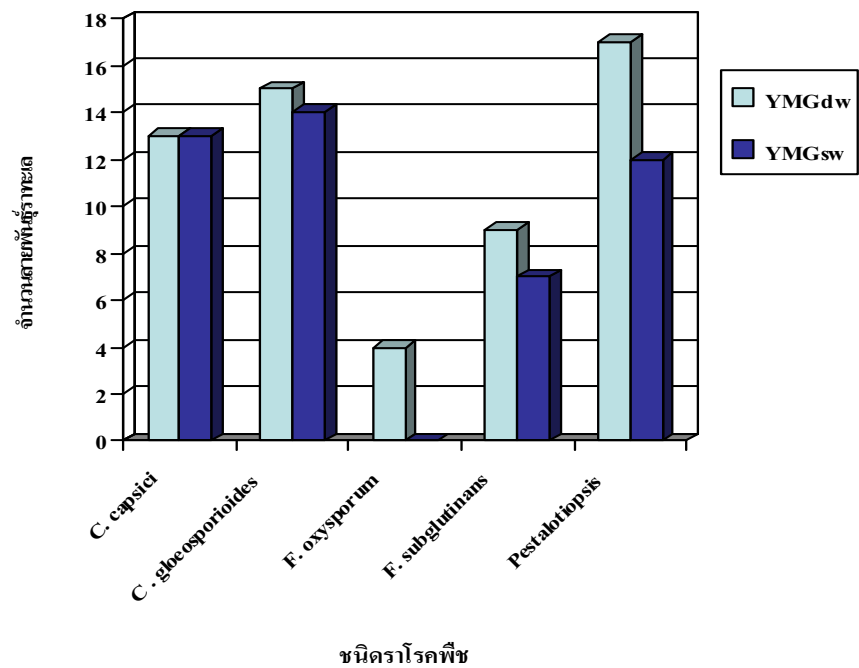
a.



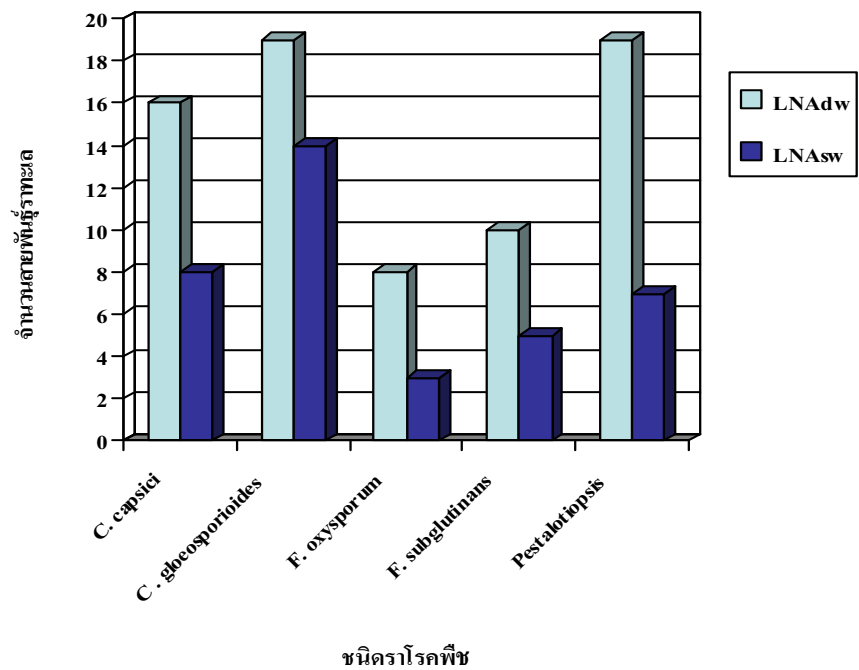
b



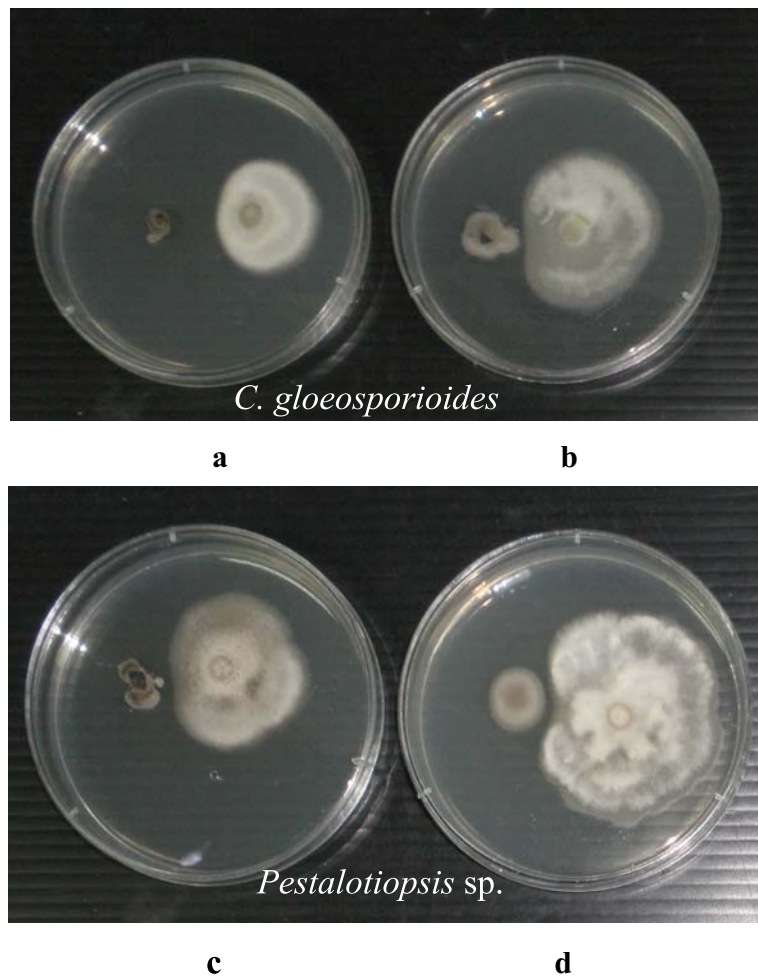
c.



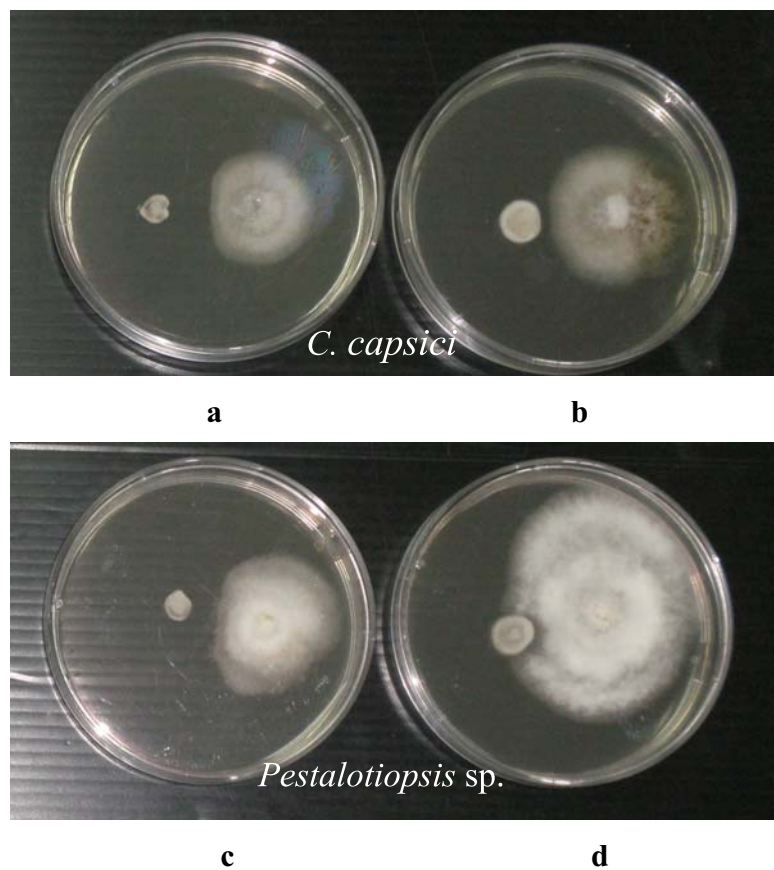
d



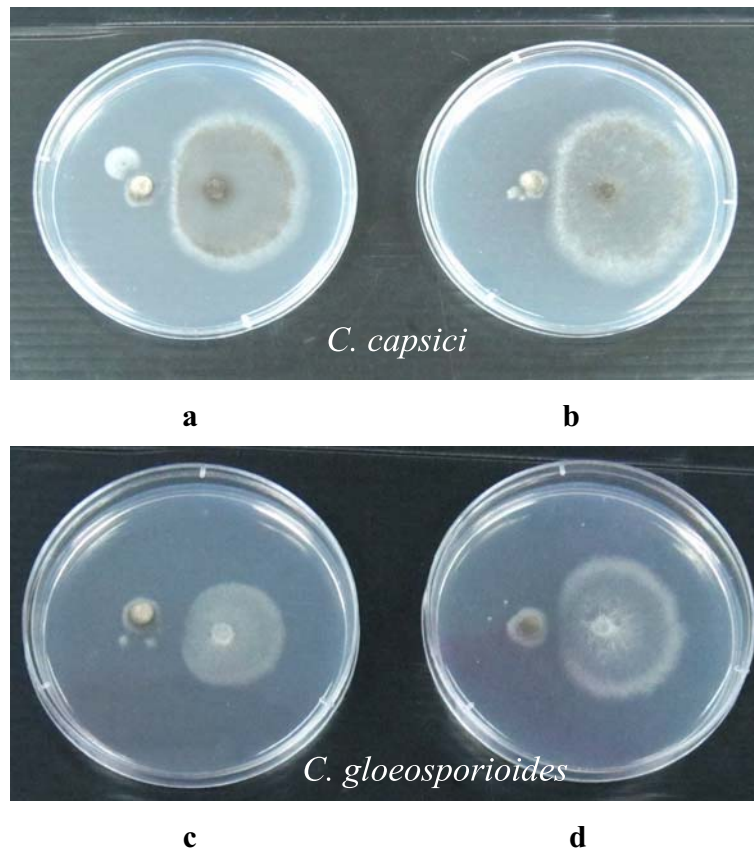
ภาพที่ 4 เปรียบเทียบจำนวนสายพันธุ์ราทะเลที่ให้ผล strong antibiosis เมื่อเลี้ยงร่วมกับราโรคพืชบนอาหารแข็งชนิดต่างๆ ที่เตรียมจากน้ำกลั่นและน้ำทะเล a. PDA_{dw} และ PDA_{sw}; b. SBA_{dw} และ SBA_{sw}; c. YMG_{dw} และ YMG_{sw}; d. LNA_{dw} และ LNA_{sw}, sw = seawater, dw = distilled water



ภาพที่ 5 ระดับความแรง antibiosis ของ *Saagaromyces ratnagiriensis* BUCH 032-1 (โคโลนีด้านซ้ายของจานอาหารใน a-d) เมื่อเลี้ยงร่วมกับราโรคพืช (โคโลนีด้านขวาของจานอาหารใน a-d) a, b. ระดับความแรง 4+ และ 3+ เมื่อเลี้ยงร่วมกับ *C. gloeosporioides* บนอาหาร PDA ที่เตรียมด้วยน้ำกลั่นและน้ำทะเลตามลำดับ; c, d. ระดับความแรง 3+ และ 2+ เมื่อเลี้ยงร่วมกับ *Pestalotiopsis* sp. บนอาหาร PDA ที่เตรียมด้วยน้ำกลั่นและน้ำทะเลตามลำดับ



ภาพที่ 6 ระดับความแรง antibiosis ของ *Astrospheariella striatispora* BUSK 057-3 (โคโลนีด้านซ้ายของจานอาหารใน a-d) เมื่อเลี้ยงร่วมกับราโรคพืช (โคโลนีด้านขวาของจานอาหารใน a-d) a, b. ระดับความแรง 4+ และ 2+ เมื่อเลี้ยงร่วมกับ *C. capsici* บนอาหาร SBA ที่เตรียมด้วยน้ำกลั่นและน้ำทะเลตามลำดับ; c, d. ระดับความแรง 4+ และ 1+ เมื่อเลี้ยงร่วมกับ *Pestalotiopsis* sp. บนอาหาร SBA ที่เตรียมด้วยน้ำกลั่นและน้ำทะเลตามลำดับ

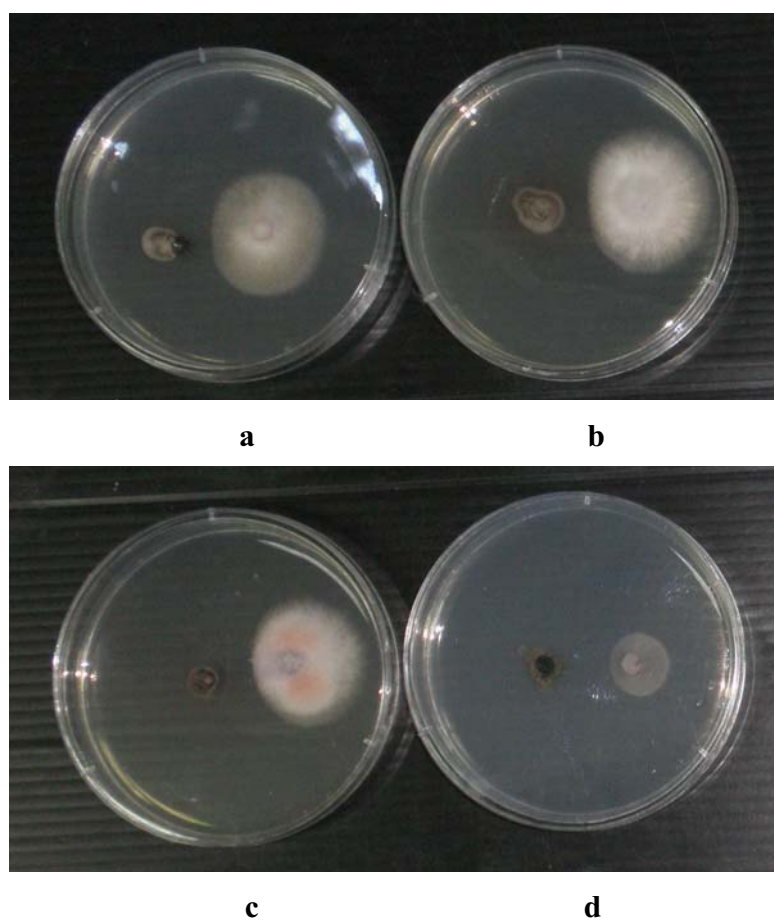


ภาพที่ 7 ระดับความแรง antibiosis ของ *Verruculina enalia* BUCH 215-1 (โคโลนีด้านซ้ายของจานอาหารใน a-d) เมื่อเลี้ยงร่วมกับราโรคพืช (โคโลนีด้านขวาของจานอาหารใน a-d) a, b. ระดับความแรง 3+ และ 2+ เมื่อเลี้ยงร่วมกับ *C. capsici* บนอาหาร LNA ที่เตรียมด้วยน้ำกลั่นและน้ำทะเลตามลำดับ; c, d. ระดับความแรง 4+ และ 2+ เมื่อเลี้ยงร่วมกับ *C. gloeosporioides* บนอาหาร LNA ที่เตรียมด้วยน้ำกลั่นและ น้ำทะเลตามลำดับ

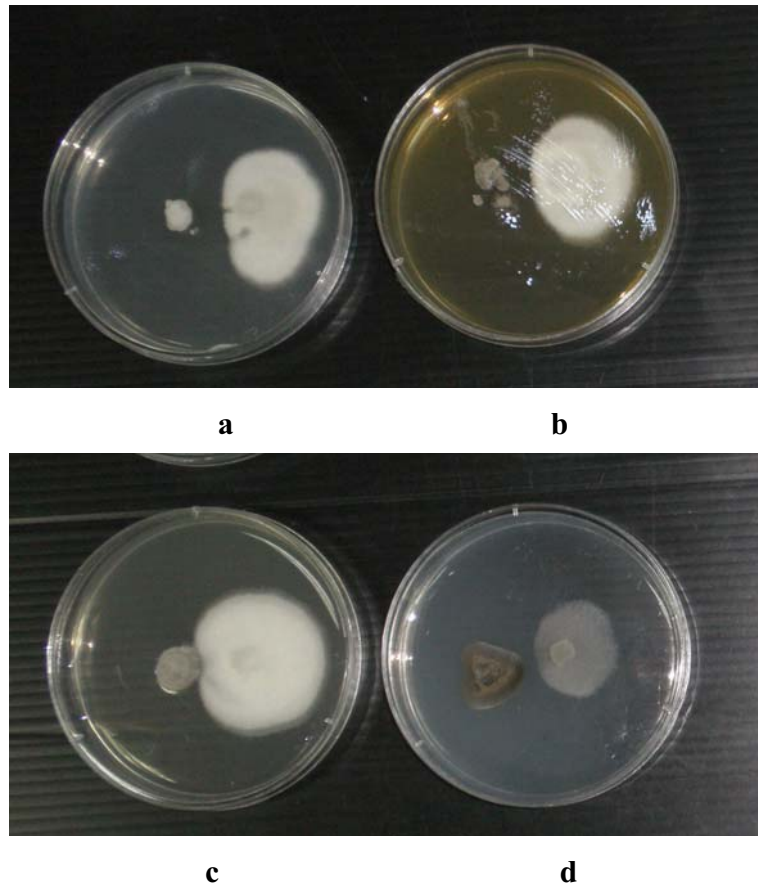
1.3 ผลการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ ต่อความสามารถในการแสดงผล antibiosis ของราทะเล

จากตารางที่ 9 ไม่มีอาหารชนิดใดที่เมื่อเลี้ยงราทะเลใน dual culture แล้ว จะทำให้ราทะเลส่วนใหญ่แสดงผล strong antibiosis อย่างเด่นชัด แต่อาหารแต่ละชนิดจะให้ผลดีแตกต่างกันไปขึ้นกับชนิดราทะเลและราโรคพืชที่ศึกษา (ผลในตารางที่ 7) อย่างไรก็ตาม หากดูผลจากตารางที่ 9 จะเห็นว่าในอาหาร LNA_{dw} จะมีจำนวนราทะเลที่ยับยั้งราโรคพืชระดับสูงสุด (4+) ต่อ *Colletotrichum capsici*, *C. gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum*, *F. subglutinans* และ *Pestalotiopsis* sp. 8, 10, 2, 3 และ 12 สายพันธุ์ ตามลำดับ รวม 35 สายพันธุ์ โดยที่การยับยั้งนี้ไม่ได้มาจากเชื้อเจริญข้ามบน LNA ที่มีสารอาหารต่ำ (เนื่องจากเมื่อเลี้ยงเฉพาะราโรคพืชบน LNA ราโรคพืชจะเจริญได้เร็ว) ดังนั้น LNA จึงเป็นอาหารที่ให้ผลยับยั้งสูงสุด ขณะที่ PDA_{dw} และ SBA_{dw} ให้ผลรองลงมาคือ 23 สายพันธุ์เท่ากัน และ YMG มี

จำนวน 20 สายพันธุ์ และยืนยันว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากน้ำกลั่นให้ผลยับยั้งดีกว่าอาหารที่เตรียมจากน้ำทะเล ตัวอย่างผล antibiosis ที่ต่างกันของราสายพันธุ์เดียวกันในการยับยั้งราโรคพืชชนิดเดียวกันบนอาหารต่างชนิดกัน แสดงในภาพที่ 8-9



ภาพที่ 8 ระดับความแรง antibiosis ของ *Saagaromyces ratnagiriensis* BUCH 032-1 (โคโลนีด้านซ้ายของจานอาหารใน a-d) เมื่อเลี้ยงร่วมกับราโรคพืช *F. subglutinans* (โคโลนีด้านขวาของจานอาหารใน a-d) a, b. ระดับความแรง 4+ และ 3+ เมื่อเลี้ยง บนอาหาร PDA และ YMG ตามลำดับ; c, d. ระดับความแรง 4+ และ 4+ เมื่อเลี้ยง บนอาหาร SBA และ LNA ตามลำดับ อาหารทุกชนิดเตรียมน้ำกลั่น



ภาพที่ 9 ระดับความแรง antibiosis ของ *Astrosphaeriella striatipora* BUSK 055-1 (โคโลนีด้านซ้ายของจานอาหารใน a-d) เมื่อเลี้ยงร่วมกับราโรคพืช *C. gloeosporioides* (โคโลนีด้านขวาของจานอาหารใน a-d) a, b. ระดับความแรง 4+ เมื่อเลี้ยง บนอาหาร PDA และ SBA ตามลำดับ; c, d. ระดับความแรง 2+ และ 3+ เมื่อเลี้ยง บนอาหาร YMG และ LNA ตามลำดับ อาหารทุกชนิดเตรียมด้วยน้ำกลั่น

2. การศึกษาผลของสารสกัดต่อการยับยั้งการเจริญราโรคพืช

เนื่องจากช่วงเตรียมสารสกัด ผลใน dual culture ยังไม่แล้วเสร็จ ประกอบกับต้องการเตรียมสารสกัดเพื่อทดสอบการยับยั้งการงอกของสปอร์ของราโรคพืช ซึ่งไม่ต้องอาศัยผล antibiosis เป็น preliminary results (การยับยั้งการงอกของสปอร์ใช้กลไกต่างจากการยับยั้งการเจริญ) จึงเลือกราทะเลที่ผล antibiosis ดีเท่าที่ทราบ รวมทั้งราอื่น ๆ รวม 30 สายพันธุ์ มาทำการสกัดสารออกฤทธิ์ในอาหาร PDBsw เป็นหลัก (เนื่องจากเป็นอาหารที่มีรายงานว่าราทะเลสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ชีวภาพได้ดี) และทดสอบการยับยั้งการเจริญไปพร้อม ๆ กัน และเนื่องจากสารสกัดละลายใน 0.5% DMSO จึงใช้แผ่น disc ชุบสารละลาย 0.5% DMSO ที่ตากให้แห้งสนิททุกครั้งเป็นตัวควบคุมผลลบ

2.1 ผลของสารสกัดต่อความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ชีวภาพ

ทำการเปรียบเทียบระยะเวลาการเตรียมสารสกัดในเบื้องต้น โดยการสกัดสารที่เตรียมได้จากการหมักราทะเล 18 สายพันธุ์ (ตารางที่ 10) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDBdw, PDBsw หรือ LNBdw 14 วัน และ 28 วัน ด้วย ethyl acetate – ethanol พบว่าเกือบทั้งหมดไม่ว่าจะเลี้ยง 14 วัน หรือ 28 วันให้ผลไม่แตกต่างกันมาก มีเพียง สารสกัดจากรา 5 สายพันธุ์ที่สารสกัดที่เตรียมจากการหมักเป็นเวลา 14 วัน ให้ผลดีกว่าสารสกัดที่เตรียมจากการหมักเป็นเวลา 28 วัน เมื่อพิจารณาจากระดับการยับยั้งมีความแตกต่างกันตั้งแต่ 2 เท่า ขึ้นไป สารสกัดที่ให้ผลบวกที่เตรียมจากการหมักเป็นเวลา 14 วันดีกว่า 28 วัน ได้แก่ 002 PDBdw, 012 PDBsw, 020 PDBsw, 022 PDBsw และ 026 PDBsw ซึ่งสกัดจากรา *Leptosphaeria peruviana* BUCS 002, *Trichocladium nypae* BUCS 012, *Zalerion varium* BUCS 020, *Xylomyces* sp. 3 BUCS 022 และ *Trichocladium achrasporum* BUCS 026 ตามลำดับ ทำการสกัดสารจากราทะเลสายพันธุ์อื่นๆ เพิ่มเติม อีก 12 สายพันธุ์ในลักษณะเดียวกัน แต่ใช้ระยะเวลาหมัก 14 วัน เพียงอย่างเดียว ผลการทดลองสรุปไว้ในตารางที่ 11

เมื่อพิจารณาราทะเลที่ให้ผล strong antibiosis 16 สายพันธุ์ จากทั้ง ตารางที่ 10 และตารางที่ 11 จะเห็นว่า ราทะเล 15 สายพันธุ์ ยกเว้น *Aigialus* like BUCS 004 ยับยั้งการเจริญราโรคพืชได้ แต่ผลยับยั้งมีฤทธิ์อ่อนลง (ดูเทียบผลในตารางที่ 8)

ตารางที่ 10 การยับยั้งการเจริญเส้นใยราโรคพืชของสารสกัดจากกระทะเลที่เตรียม จากการหมักเป็นเวลา 14 วันและ 28 วัน

สารสกัด	ระยะเวลา เลี้ยงรา	การยับยั้งราโรคพืช				
		Cc	Cg	Fo	Fs	Ps
001 LNBdw	14 วัน	-	-	-	-	-
	28 วัน	-	-	-	-	-
001 PDBsw	14 วัน	-	-	-	-	-
	28 วัน	-	-	-	-	-
002 LNBdw	14 วัน	-	-	1+	-	-
	28 วัน	-	-	-	-	-
002 PDBdw	14 วัน	3+	3+	-	1+	-
	28 วัน	2+	-	-	-	-
003 PDBsw	14 วัน	2+	-	-	-	-
	28 วัน	-	1+	-	-	-
004 PDBsw	14 วัน	-	-	-	-	-
	28 วัน	-	-	-	-	-
004 LNBdw	14 วัน	-	-	-	-	-
	28 วัน	-	-	-	-	-
005 PDBsw	14 วัน	-	-	-	-	-
	28 วัน	-	-	-	-	-
007 LNBdw	14 วัน	-	-	-	1+	1+
	28 วัน	-	-	-	1+	1+
008 PDBsw	14 วัน	1+	-	-	-	-
	28 วัน	1+	-	-	-	-
012 PDBsw	14 วัน	-	-	-	1+	2+
	28 วัน	-	-	-	-	1+
014 PDBsw	14 วัน	-	-	-	-	-
	28 วัน	-	-	-	-	-
015 PDBsw	14 วัน	-	-	-	1+	2+
	28 วัน	-	-	-	1+	2+

ตารางที่ 10 การยับยั้งการเจริญเส้นใยราโรคพืชของสารสกัดจากราทะเลที่เตรียม จากการหมักเป็นเวลา 14 วันและ 28 วัน (ต่อ)

สารสกัด	ระยะเวลา เลี้ยงรา	การยับยั้งราโรคพืช				
		Cc	Cg	Fo	Fs	Ps
017-2 PDBsw	14 วัน	-	-	1+	1+	-
	28 วัน	-	-	1+	1+	1+
020 PDBsw	14 วัน	1+	2+	-	1+	-
	28 วัน	1+	1+	-	-	-
022 PDBsw	14 วัน	3+	3+	3+	2+	-
	28 วัน	2+	1+	1+	-	-
023-2 PDBsw	14 วัน	1+	1+	-	-	-
	28 วัน	1+	-	-	-	-
026 PDBsw	14 วัน	-	2+	-	-	2+
	28 วัน	-	1+	-	-	-
032-2 PDBsw	14 วัน	2+	3+	1+	3+	3+
	28 วัน	-	2+	3+	3+	3+
041-2 PDBsw	14 วัน	-	-	-	-	-
	28 วัน	-	-	-	-	-
055-1 PDBsw	14 วัน	2+	2+	3+	3+	2+
	28 วัน	2+	2+	3+	3+	3+

หมายเหตุ Cc = *Colletotrichum capsici* DOAC 1511, Cg = *C. gloeosporioides* DOAC 0782,

Fo = *Fusarium oxysporum* DOAC 1808, Fs = *F. subglutinans* DOAC 0761,

Ps = *Pestalotiopsis* sp. DOAC 1098

PDB = potato dextrose broth, LNB = low nutrient broth, dw = distilled water, sw = seawater

ตารางที่ 11 การยับยั้งการเจริญเส้นใยราโรคพืชของสารสกัดจากราทะเลที่เตรียมจากการหมักเป็นเวลา 14 วัน

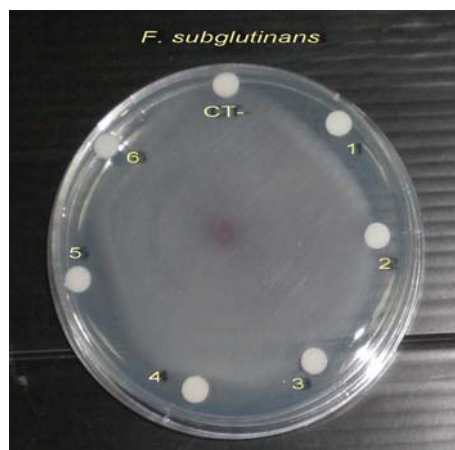
สารสกัด	การยับยั้งราโรคพืช				
	Cc	Cg	Fo	Fs	Ps
009 PDBsw	1+	2+	1+	1+	-
010 PDBsw	2+	1+	1+	1+	-
017-1 PDBsw	-	3+	-	2+	1+
021 PDBsw	2+	3+	-	-	2+
023-1 PDBsw	1+	1+	-	-	-
027-1 PDBsw	1+	2+	2+	2+	2+
027-2 PDBsw	-	3+	1+	-	1+
032-1 PDBsw	-	1+	-	-	-
034-1 PDBsw	-	-	1+	-	-
057-3 PDBsw	-	1+	-	-	-
201-1 PDBsw	2+	-	-	1+	1+
215-1 PDBsw	1+	1+	2+	2+	2+

หมายเหตุ Cc = *Colletotrichum capsici* DOAC 1511, Cg = *C. gloeosporioides* DOAC 0782,

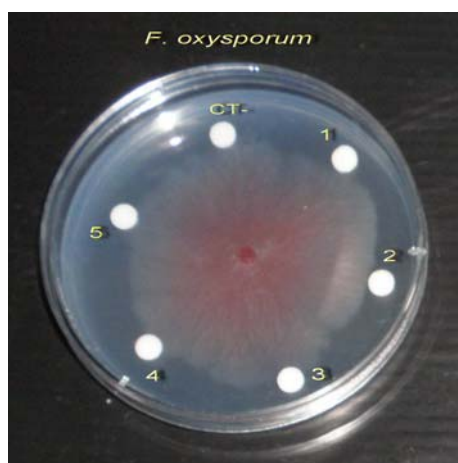
Fo = *Fusarium oxysporum* DOAC 1808, Fs = *F. subglutinans* DOAC 0761,

Ps = *Pestalotiopsis* sp. DOAC 1098

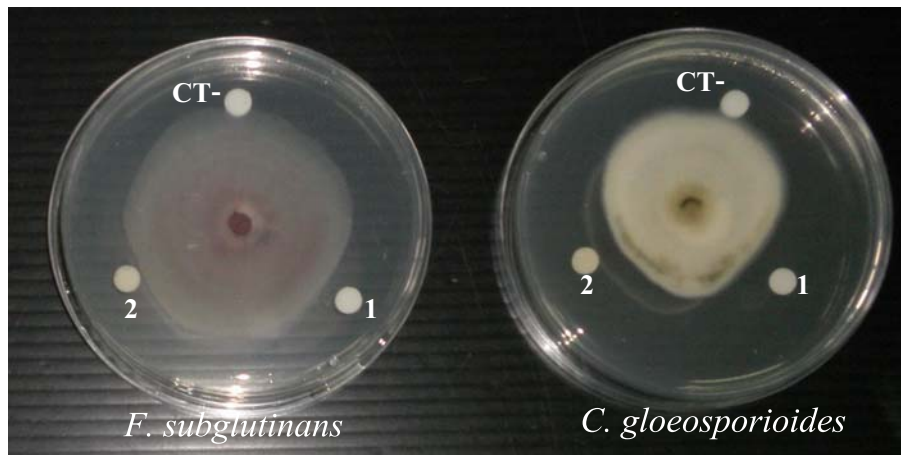
PDB = potato dextrose broth, sw = seawater



ภาพที่ 10 การยับยั้งการเจริญเส้นใยราโรคพืช *F. subglutinans* ของสารสกัดจากรากทะเล 1,2 : สารสกัด 022 PDBsw จากรา *Xylomyces* sp.3 BUCS 022 ที่เลี้ยงใน PDBsw 14 วัน (ระดับการยับยั้ง 2+) และ 28 วัน (ไม่ยับยั้ง); 3,4: สารสกัด 021 PDBsw จาก *Xylomyces* sp. 2 BUCS 021 ที่เลี้ยงใน PDBsw 14 วัน (ไม่ยับยั้ง) และ 28 วัน (ระดับการยับยั้ง 1+); 5,6 : สารสกัด 032-2 PDBsw จาก *Saagaromyces ratnagiriensis* BUCS 032-2 ที่เลี้ยงใน PDBsw 14 วัน (ระดับการยับยั้ง 3+) และ 28 วัน (ระดับการยับยั้ง 3+), CT- คือแผ่น disc ที่ทำให้แห้งแล้วหลังจากหุบสารละลาย 0.5 % DMSO



ภาพที่ 11 การยับยั้งการเจริญเส้นใยราโรคพืช *F. oxysporum* ของสารสกัดจากรากทะเล 1,2 : สารสกัด 002 PDBdw จาก *Leptosphaeria peruviana* BUCS 002 ที่เลี้ยงใน PDBdw 28 วัน (ไม่ยับยั้ง) และ 14 วัน (ระดับการยับยั้ง 1+); 3,4: สารสกัด 001PDBsw จาก *Helicorhoidion nypicola* BUSC 001 ที่เลี้ยงใน PDBsw 28 วัน (ไม่ยับยั้ง) และ 14 วัน (ไม่ยับยั้ง); 5: สารสกัด 001 LNBdw จาก *H. nypicola* BUSC 001 ที่เลี้ยงใน LNBdw 14 วัน (ไม่ยับยั้ง); CT-คือแผ่น disc ที่ทำให้แห้งแล้วหลังจากหุบสารละลาย 0.5 % DMSO



ภาพที่ 12 การยับยั้งการเจริญเส้นใยราโรคพืช *Fusarium subglutinans* และ *Colletotrichum gloeosporioides* บนอาหาร PDA ของสารสกัดจากราทะเล 1: สารสกัด 055-1 PDBsw จากรา *Astrosphaeriella striatispora* BUSK 055-1 ที่เลี้ยงใน PDBsw 14 วัน (ระดับการยับยั้ง 2+ และ 4+); 2: สารสกัด 215-1 PDBsw จากรา *Verruculina enalia* BUCH 215-1 ที่เลี้ยงใน PDBsw 14 วัน (ระดับการยับยั้ง 1+ และ 3+); CT- คือแผ่น disc ที่ทำให้แห้งแล้วหลังจากชุบสารละลาย 0.5 % DMSO

2.2 การเปรียบเทียบผลการยับยั้งการเจริญราโรคพืชของสารสกัดกับผล antibiosis

เมื่อนำผลปฏิสัมพันธ์ (antibiosis) จากตารางที่ 7 และผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญเส้นใยราโรคพืชเมื่อสัมผัสกับสารสกัด (antifungus) ในตารางที่ 10 และตารางที่ 11 มา เปรียบเทียบกันพบว่าส่วนใหญ่ให้ผลสอดคล้องกัน ราสายพันธุ์ที่ให้ผล antibiosis ดี เมื่อนำสารที่สกัดจากการหมักมาทดสอบการยับยั้งการเจริญเส้นใยราโรคพืช จะพบว่ายับยั้งราโรคพืชได้ดีเช่นกัน แต่มีรา 3 สายพันธุ์ที่ผลไม่สอดคล้องกัน ได้แก่ *Leptosphaeria peruviana* BUCS 002, *Aigialus* like BUCS 004 และ *Periconia prolifica* BUCS 007 ที่ผล antibiosis เป็นบวกแต่ผล antifungus เป็นลบ หรือให้ผลไม่ชัดเจน เพื่อให้ทราบชัดเจนมากขึ้นว่าในกรณีที่เกิดผล antibiosis (ผลยับยั้งใน dual culture) และ ผล antifungus (ผลยับยั้งจากสารสกัด) ไม่สอดคล้องกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อผล antifungus เป็นลบแต่ผล antibiosis เป็นบวกนั้น สารสกัดไม่มีผลยับยั้งการเจริญราโรคพืชจริงหรือไม่ จึงได้ทำการศึกษาลักษณะเส้นใยที่อาจเปลี่ยนไปเมื่อเส้นใยราโรคพืชสัมผัสกับสารสกัดได้กล้องจุลทรรศน์โดยตรง และแยกทดสอบแต่ละกรณี เพื่อเปรียบเทียบกัน

2.2.1 การศึกษาลักษณะการเปลี่ยนแปลงปลายเส้นใยของราโรคพืชเมื่อสัมผัสกับสารสกัด

ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะเส้นใยราโรคพืช ได้กลั่นจุลทรรศน์ โดยนำส่วนของราที่ให้ผลปฏิสัมพันธ์ และผลการทดสอบกับสารสกัดแตกต่างกัน 3 ลักษณะ คือ antibiosis + : antifungus +, antibiosis - : antifungus +, และ antibiosis + : antifungus - มาทดสอบ เทียบกับ antibiosis - : antifungus - และสารละลาย 0.5% DMSO ที่แห้งแล้วบนแผ่น disc ผลการเปลี่ยนแปลง เส้นใยได้กลั่นของราโรคพืชเมื่อสัมผัสสารสกัด แสดงในตารางที่ 12 ตัวอย่างลักษณะผิดปกติของราโรคพืชที่สัมผัสกับสารสกัดสรุปไว้ในตารางที่ 13 และภาพตัวอย่างแสดงในภาพที่ 13-15

ลักษณะการเปลี่ยนแปลงเส้นใยไปจากลักษณะปกติที่เห็นชัดเจนดังนี้

- ลักษณะผิดปกติของปลายยอดเส้นใย ได้แก่

2.2.2.1 ปลายเส้นใยหักเป็นคลื่น (curl tip) หรือโค้งงอ (curve tip)

2.2.2.2 การแตกกิ่งเป็นสองแฉก (dichotomous tip, Dc tip) หรือ 3 แฉก (trichotomous tip, Tc tip) ลักษณะ Dc tip นี้ ในเส้นใยพืชที่ปกติอาจพบได้เล็กน้อย (1-3 ยอด) ดังนั้น ถ้าพบมากกว่านี้ จึงถือว่าผิดปกติ โดยถ้าพบ 4-10 ยอดจะถือว่าเป็นลักษณะผิดปกติปานกลาง (moderate) และถ้าพบมากกว่า 10 ยอดจะถือว่าเป็นลักษณะผิดปกติมาก (numerous) ส่วนลักษณะ Tc มักพบลักษณะผิดปกติระดับเล็กน้อย (0-1 ยอด) กับราโรคพืชที่สัมผัสกับสารสกัด ลักษณะการผิดปกติในลักษณะนี้รวมถึงการพบการแตกกิ่ง ผิดปกติบริเวณปลายยอดหรือปลายแขนงเป็นกลุ่ม ๆ การแตกกิ่งบริเวณปลายยอดมากมาย (multiple tip) เห็นเป็นพู่ หรือเส้นใยอยู่ร่วมกันหรือพันกัน (rhizomorph tip)

2.2.2.3 การสูญเสียโปรโตพลาสซึม (lost of protoplasm) เริ่มแรกมักเกิดเป็นช่วงๆ ของเส้นใย หากเป็นระดับรุนแรงจะสูญเสียโปรโตพลาสซึมทั้งหมด (empty tip) บางครั้งพบการลดขนาดของเส้นใย (thin tip) ถ้าพบลักษณะนี้ได้บ้าง (few) แต่ถ้าพบเป็นบริเวณกว้างถือว่าเป็นลักษณะผิดปกติมากจากสารสกัด

2.2.2.4 ปลายเส้นใยโป่งพอง (knob tip) มักตามด้วยการแตกสลายของปลายเส้นใยตรงปลายยอด (lysis tip) หรือแตกหักของเส้นใยบริเวณปลายยอด (cut of mycelium, lysis of mycelium) ลักษณะนี้ถ้าพบได้บ้าง (few) ถ้าพบ 4-10 ยอดจะถือว่าเป็นลักษณะผิดปกติปานกลาง (moderate) และ ถ้าพบมากกว่า 10 ยอดจะถือว่าเป็นลักษณะผิดปกติมาก (numerous)

2.2.2.5 การขยายขนาดของปลายเส้นใย (swelling tip)

- การพบลักษณะผิดปกติที่พบได้กับเส้นใยทั่วไปบริเวณปลายยอด

ที่พบทั่วไปคือการสูญเสียโปรโตพลาสซึม ((lysis of protoplasm) และอาจพบเส้นใยถูกทำลายเห็นเป็นสีเข้ม (dead myc) เส้นใยโป่งพองเป็นปุ่มปมหรือลดขนาด รวมถึงการสร้าง rhizomorph

ตารางที่ 12 ความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงเส้นใยราโรคพืชได้กล้องจุลทรรศน์กับผลทดสอบกับ สารสกัดจากราทะเลและผล antibiosis บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ลักษณะ ปฏิสัมพันธ์	สารสกัด/ สารทดสอบ	ราโรคพืช	ระดับ antibiosis/ ผลสารสกัด	การเปลี่ยนแปลง เส้นใย เมื่อทดสอบ กับสารสกัด*
-	0.5% DMSO	<i>F. oxysporum</i>	-	0
-	0.5% DMSO	<i>C. gloeosporioides</i>	-	0
-	0.5% DMSO	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	-	0
antibiosis -	001 PDBsw 14d	<i>C. gloeosporioides</i>	- / -	0
antifungus -	001 PDBsw 14d	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	- / -	0
antibiosis -	004 PDBsw 28d	<i>C. gloeosporioides</i>	- /2+	+
antifungus +	(new extract)			
	010 PDBsw 14d	<i>C. gloeosporioides</i>	- /1+	+
antibiosis +	027-2 PDBsw 14d	<i>C. gloeosporioides</i>	2+/3+	+
antifungus +	032-2 PDBsw 14d	<i>C. gloeosporioides</i>	3+/3+	+
	055-1 PDBsw 14d	<i>C. gloeosporioides</i>	3+ / 2+	+
	055-1 PDBsw 14d	<i>F. subglutinans</i>	1+/2+	+
antibiosis +	002 PDBdw 14d	<i>F. oxysporum</i>	3+ / -	+
antifungus -	002 LNBdw 14d	<i>C. gloeosporioides</i>	4+/-	+
	004 PDBsw 14d	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	4+/-	+
	007 LNBdw 14d	<i>C. gloeosporioides</i>	4+ / -	+

หมายเหตุ* + = มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะเส้นใย 0 = ไม่มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะเส้นใย

ผลในตารางแสดงให้เห็นความสอดคล้องของ การทดสอบ antibiosis บน dual culture กับการเปลี่ยนแปลงเส้นใยได้กล้องจุลทรรศน์เมื่อทดสอบกับสารสกัด ในกรณีที่ผลระดับ antibiosis และผลการทดสอบสารสกัดเป็นบวกหรือลบเหมือนกัน แต่ในกรณีที่ผลระดับ antibiosis และผลการทดสอบสารสกัดขัดแย้งกัน หากมีการทดสอบใดทดสอบหนึ่งให้ผลบวก ยังคงพบการเปลี่ยนแปลงเส้นใยได้กล้องจุลทรรศน์ได้

ตารางที่ 13 ลักษณะเส้นใยราโรคพืชได้กลึงจุลทรรศน์เมื่อทดสอบกับสารสกัด

สารสกัด	ราโรคพืช	ลักษณะเส้นใยเมื่อทดสอบกับสารสกัด	
		ปลายยอด	ยอดและบริเวณปลายยอด
0.5% DMSO	<i>F. oxysporum</i>	few dichotomous tip (normal character)	normal hyphae
	<i>C. gloeosporioides</i>		
	<i>Pestalotiopsis</i> sp.		
001 PDBsw	<i>C. gloeosporioides</i>	few dichotomous tip and few curl tip (normal character)	normal hyphae
001 PDBsw	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	few curl tip, few dichotomous tip (normal character)	normal hyphae
004 PDBsw 28d	<i>C. gloeosporioides</i>	few curl tip, multiple tip, knob tip numerous rhizomorph , lysis tip, lysis mycelium at tip, complete lysis of protoplasm at tip	strong lysis of protoplasm
010 PDBsw 14d	<i>C. gloeosporioides</i>	few curl tip , few rhizomorph, numerous dichotomous and trichotomous tip	weak lysis of protoplasm
027-2 PDBsw 14d	<i>C. gloeosporioides</i>	few coiled tip, moderate curl tip, multiple tip numerous rhizomorph, complete lysis of protoplasm at tip	moderate lysis of protoplasm
032-2 PDBsw 14d	<i>C. gloeosporioides</i>	moderate coiled tip , curl tip, numerous dichotomous tip, knop tip, swelling tip, complete lysis of protoplasm at tip	strong lysis of protoplasm

ตารางที่ 13 ลักษณะการเปลี่ยนแปลงเส้นใยราโรคพืชได้กล้องจุลทรรศน์เมื่อทดสอบกับสารสกัด (ต่อ)

สารสกัด	ราทดสอบ	ลักษณะเส้นใยเมื่อทดสอบกับสารสกัด	
		ปลายยอด	ยอดและบริเวณปลายยอด
055-1 PDBsw 14d	<i>C. gloeosporioides</i>	numerous knop tip, rhizomorph , swelling tip, complete lysis of protoplasm at tip	strong lysis of protoplasm
055-1 PDBsw 14d	<i>F. subglutinans</i>	numerous coil tip and branch, dichotomous and trichotomous tip numerous rhizomorph, complete lysis of protoplasm at tip	dead mycelium
002 PDBdw 14d	<i>F. oxysporum</i>	moderate curl tip and coiled tip, dichotomous tip, knob tip, rhizomorph , few abnormal tip, swelling and lost of protoplasm at tip, lysis of mycelium at tip	strong lysis of protoplasm, lysis mycelium
002 LNBdw 14d	<i>C. gloeosporioides</i>	numerous dichotomous tip, curl and coiled tip , knob tip	strong lysis of protoplasm
004 PDBsw 14d	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	dead at tip, numerous dichotomous branches	strong lysis of protoplasm, lysis mycelium
007 LNBdw 14d	<i>C. gloeosporioides</i>	numerous knop tip, rhizomorph, swelling tip, complete lysis of protoplasm at tip	strong lysis of protoplasm

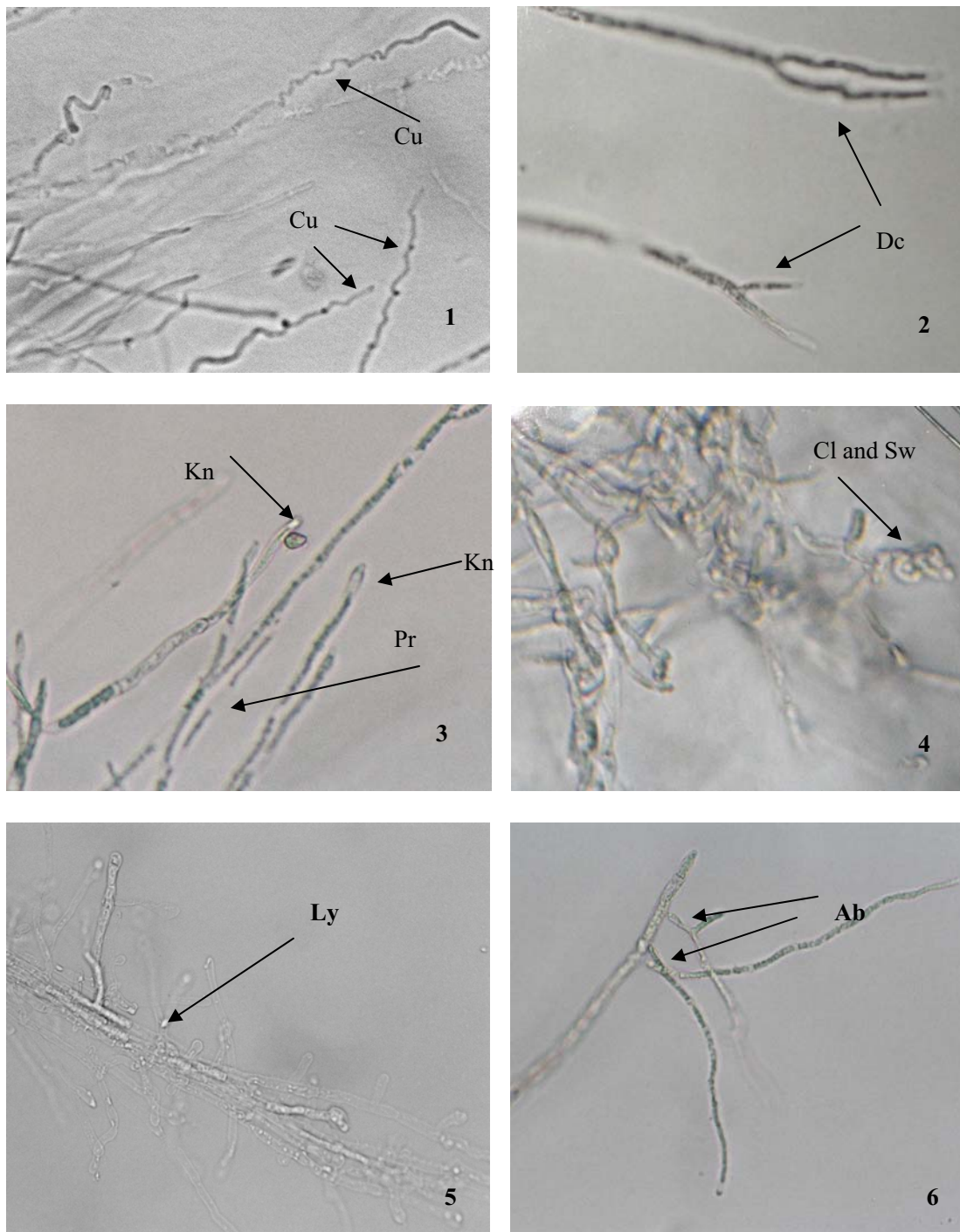
หมายเหตุ Cc = *Colletotrichum capsici* DOAC 1511, Cg = *C. gloeosporioides* DOAC 0782,

Fo = *Fusarium oxysporum* DOAC 1808, Fs = *F. subglutinans* DOAC 0761,

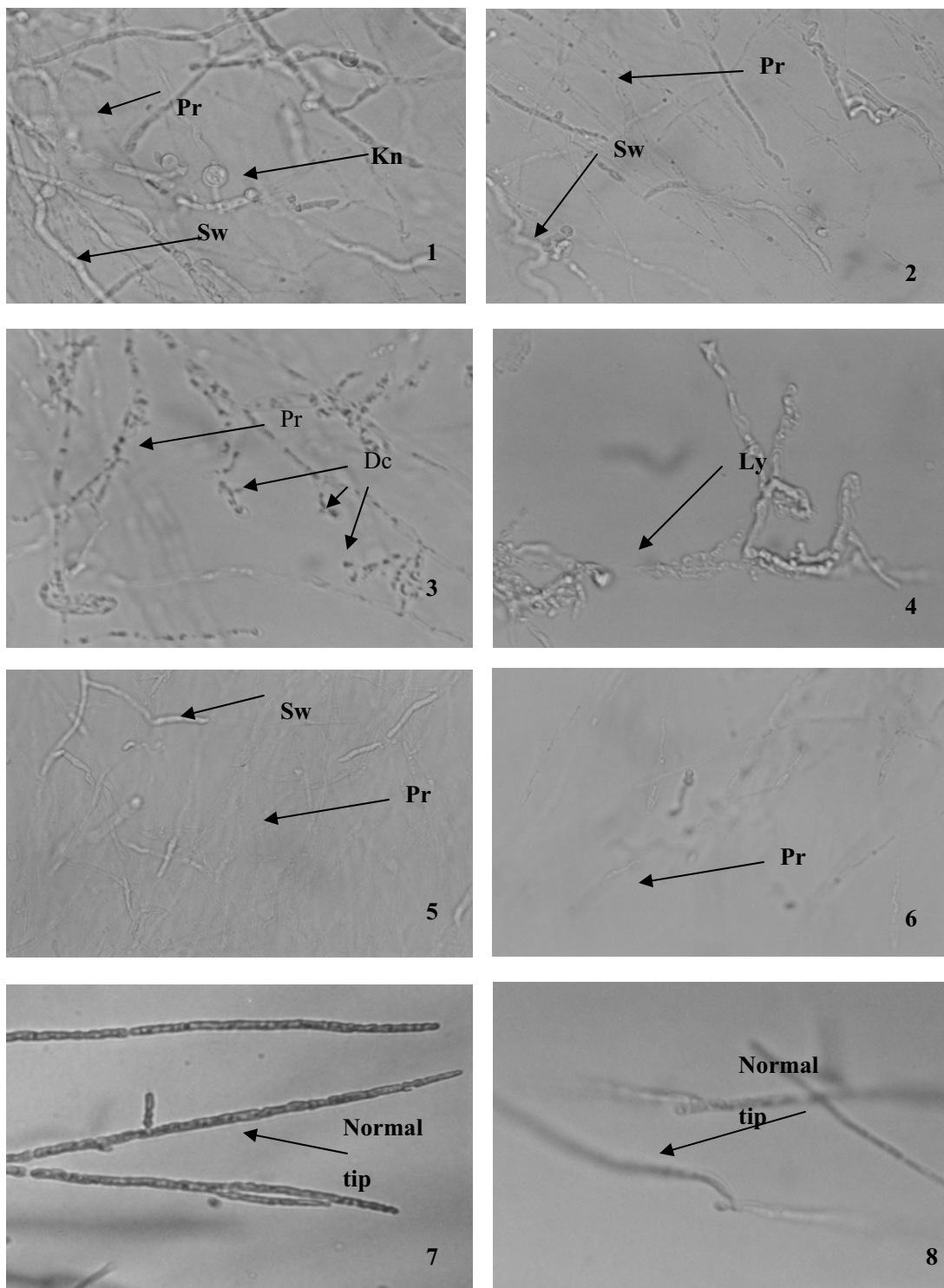
Ps = *Pestalotiopsis* sp. DOAC 1098

PDB = potato dextrose broth, LNB = low nutrient broth, dw = distilled water,

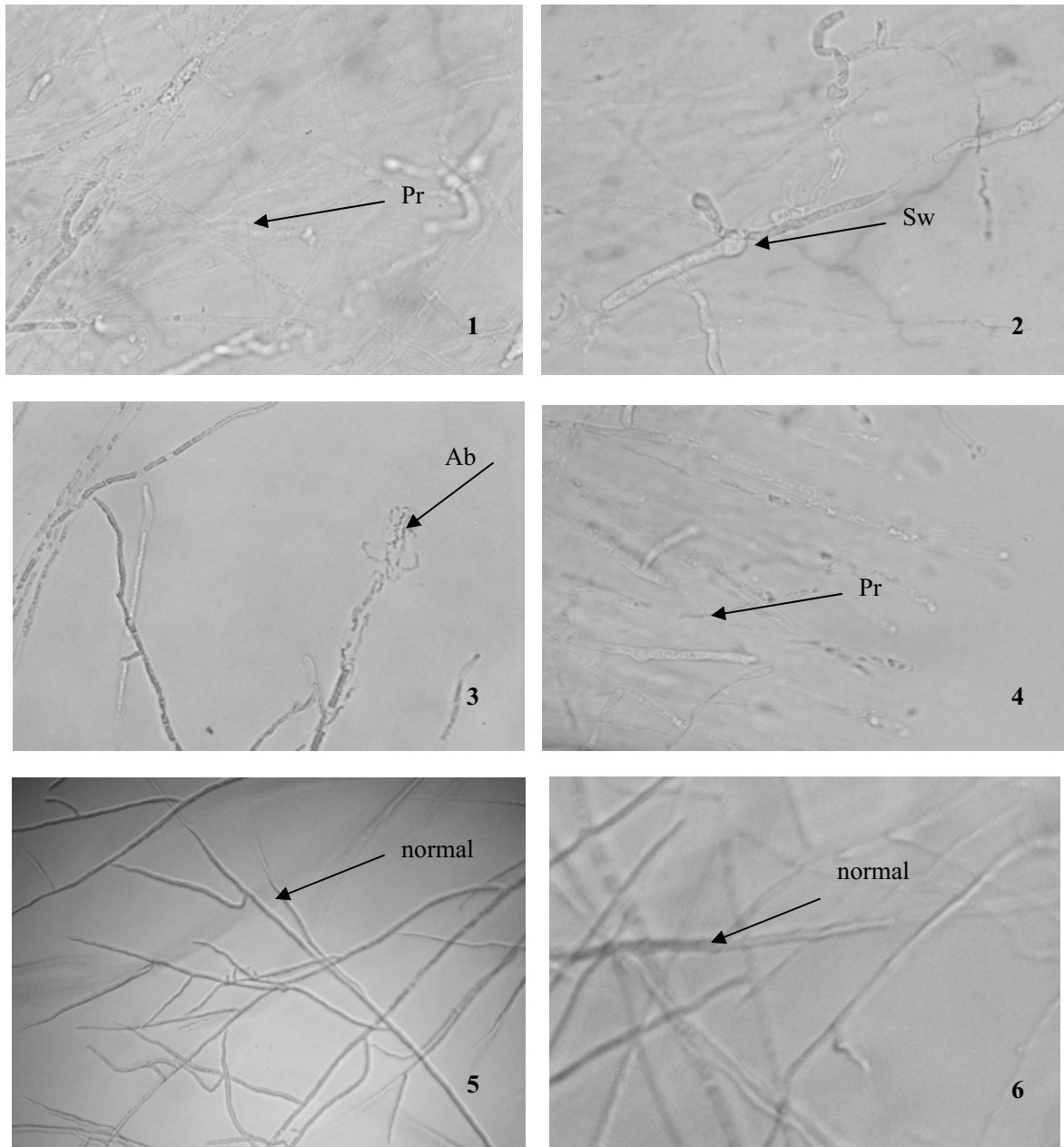
sw = seawater



ภาพที่ 13 ลักษณะผิดปกติของปลายยอดเส้นใยโรคพืช เมื่อทดสอบกับสารสกัดจากราทะเล 1: ปลายเส้นใยหักเป็นคลื่น (Cu) ; 2 การแตกกิ่งเป็นสองแฉก (Dc); 3: การโป่งพองบริเวณปลายยอด (Kn) และการสูญเสีย protoplasm บางส่วน (Pr); 4: ปลายเส้นใยขยายขนาด (Sw) และบิดเป็นเกลียว(CI); 5: การแตกสลายของเส้นใยบริเวณปลายยอด (Ly); 6: การแตกกิ่งบริเวณปลายยอดผิดปกติ (Ab)



ภาพที่ 14 ลักษณะปลายเส้นใยที่เปลี่ยนไปของราโรคพืชที่ผลทดสอบกับสารสกัดเป็นลบ ขณะที่การทดสอบ antibiosis ให้ผลเป็นบวก 1, 2: ผลของสารสกัด 002 LNBdw 14d กับ *F. oxysporum*; 3, 4: ผลของสารสกัด 004 PDBsw 28d กับ *Pestalotiopsis* sp.; 5, 6 : ผลของสารสกัด 007 LNBdw 14d กับ *C. gloeosporioides*; 7, 8: CT- = ปลายเส้นใยปกติของ *F. oxysporum* และ *Pestalotiopsis* sp. ที่ทดสอบกับแผ่น disc ที่ทำให้แห้งแล้วหลังจากหุบสารละลาย 0.5% DMSO ตามลำดับ



ภาพที่ 15 ลักษณะปลายเส้นใยที่เปลี่ยนไปของราโรคพืช *C. gloeosporioides* เมื่อทดสอบกับสารสกัดจากราทะเล 1, 2: สารสกัด 032-2 PDBdw 14d; 3, 4: สารสกัด 055-1 PDBsw 14d; 5,6 : CT- = ปลายเส้นใยปกติเมื่อทดสอบกับแผ่น disc ที่ทำให้แห้งแล้วหลังจากหุบสารละลาย 0.5% DMSO

3. การยับยั้งการออกของสปอร์ราโรคพืชของสารสกัดจากราทะเล

นำสารสกัดจากราทะเล 29 สายพันธุ์ ที่หมักในอาหารเหลว PDBsw เป็น เวลา 14 วัน และ 28 วัน มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการออกของสปอร์ราโรคพืชกลุ่มอะนาโมอร์ฟ 2 ชนิดคือ *Fusarium oxysporum* และ *F. subglutinans* ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดจากราทะเล *Saagaromyces ratnagiriensis* BUCS 032-1 สามารถยับยั้งการออกของสปอร์รา *F. subglutinans* ได้แต่ไม่ยับยั้งการออกสปอร์ *F. oxysporum* สารสกัดจากราทะเล *S. ratnagiriensis* BUCS 032-2 และ *Astrosphaeriella striatispora* BUCS 055-1 ยับยั้งการออกของสปอร์ *Fusarium* ทั้งสองชนิดได้ (ตารางที่ 14 และภาพที่ 16-17)

4. การคัดเลือกสายพันธุ์ราทะเลและระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัดสารยับยั้งราโรคพืช

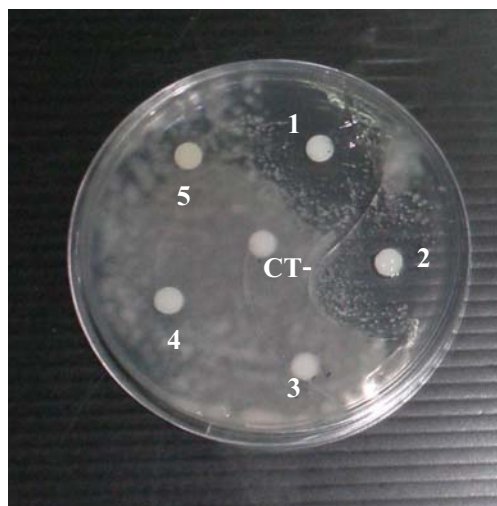
จากการศึกษาราทั้งหมักข้างต้น สามารถคัดเลือกราทะเลที่มีคุณสมบัติเด่นและสามารถนำมาใช้ผลิตสารออกฤทธิ์ชีวภาพที่ให้ผลยับยั้งราโรคพืชที่ตีในเบื้องต้น จำนวน 4 สายพันธุ์ (ตารางที่ 15) ได้ คัดเลือกรา *Saagaromyces ratnagiriensis* BUCS 032-2 มาทำการหมักและสกัดซ้ำ แต่ใช้ ethyl acetate เป็นตัวทำละลายเพียงชนิดเดียว พบว่าได้ผลเช่นเดียวกับเมื่อใช้ ethyl acetate-ethanol แต่ใช้เวลาในการทำให้น้อยกว่า จึงคัดเลือก *S. ratnagiriensis* BUCS 032-2 ซึ่งให้ผลการยับยั้งดีที่สุด รวมทั้ง *Aigialus like* BUCS 004 ซึ่งสารสกัดที่สกัดด้วย ethyl acetate-ethanol ไม่สามารถยับยั้งราโรคพืช มาทำการหมักและสกัดซ้ำด้วย ethyl acetate เพียงอย่างเดียว จากอาหารเหลวชนิดเดียวกันกับอาหารแข็งที่ให้ผล antibiosis ดีที่สุด โดยทำการหมัก *S. ratnagiriensis* BUCS 032-2 ใน SBBdw broth เป็นระยะเวลา 7, 14, 21, 32 และ 60 วัน และ *Aigialus like* BUCS 004 ซึ่งเจริญเร็วกว่า ใน LNBdw 10, 14, 28 และ 42 วัน เพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสม พบว่าสารสกัด BUCS 032-2 SBBdw ความเข้มข้น 2000 µg/disc ที่หมักเป็นเวลา 7 วัน 14 วัน และ 21 วัน สามารถยับยั้งราโรคพืชทั้ง 4 ชนิดที่ทำการทดสอบ คือ *C. capsici*, *C. gloeosporioides*, *F. oxysporum* และ *F. subglutinans* โดยสารสกัดที่หมัก 7 วัน ให้ผลยับยั้งดีที่สุด ตามด้วยสารที่สกัดจากราที่หมัก 14 วัน ส่วนสารที่สกัดจากราที่หมัก 60 วัน ให้ผลยับยั้งต่ำที่สุด แต่ยับยั้ง *C. gloeosporioides* ได้ (ตารางที่ 16)

สารสกัด BUCS 004 LNBdw ให้ผลยับยั้ง *F. subglutinans* ได้ดีกว่าเชื้ออื่น โดยทุกสารที่สกัดใน เวลาต่างๆ กัน สามารถยับยั้งการเจริญได้ แต่เฉพาะสารสกัดที่สกัดจากราที่เลี้ยง เป็นเวลา 10 วัน ความเข้มข้นประมาณ 300 µg/disc เท่านั้นที่ยับยั้ง *C. gloeosporioides* ได้ แต่ให้ผลไม่ชัดเจนบางครั้งให้ผลบวก บางครั้งให้ผลลบ (ตารางที่ 16)

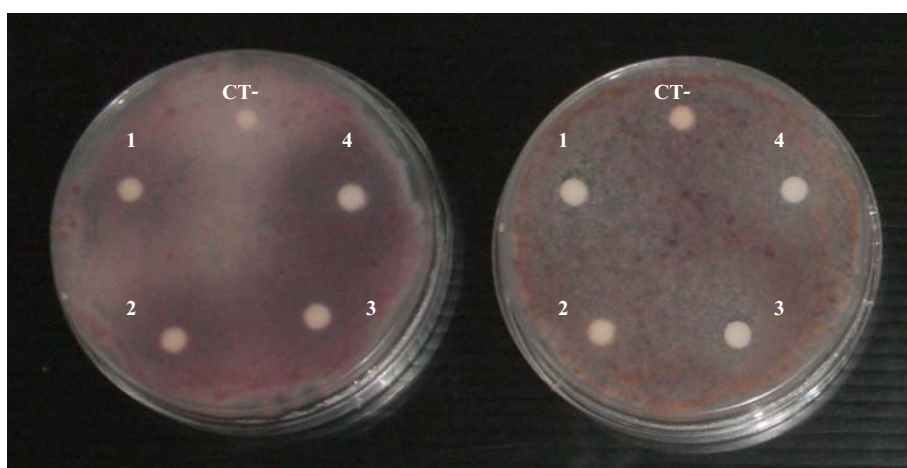
ตารางที่ 14 การยับยั้งการงอกของสปอร์ราโรคพืช *Fusarium* spp. ของสารสกัดจากราทะเล

สารสกัด	ระยะเวลา เลี้ยงรา	การออกของสปอร์		สารสกัด	ระยะเวลา เลี้ยงรา	การออกของสปอร์	
		Fo	Fs			Fo	Fs
001 PDBsw	14 วัน	+	+	020 PDBsw	14 วัน	+	+
	28 วัน	+	+		28 วัน	+	+
002 PDBdw	14 วัน	+	+	022 PDBsw	14 วัน	+	+
	28 วัน	+	+		28 วัน	+	+
003 PDBsw	14 วัน	+	+	023-2 PDBsw	14 วัน	+	+
	28 วัน	+	+		28 วัน	+	+
004 PDBsw	14 วัน	+	+	025 LNBdw	14 วัน	+	+
	28 วัน	+	+		28 วัน	+	+
005 PDBsw	14 วัน	+	+	026 PDBsw	14 วัน	+	+
	28 วัน	+	+		28 วัน	+	+
007 LNBdw	14 วัน	+	+	027-1 PDBsw	14 วัน	+	+
	28 วัน	+	+		28 วัน	+	+
008 PDBsw	14 วัน	+	+	032-1 PDBsw	14 วัน	+	-
	28 วัน	+	+		28 วัน	+	-
010 PDBsw	14 วัน	+	+	032-2 PDBsw	14 วัน	-	-
	28 วัน	+	+		28 วัน	-	-
011 PDBsw	14 วัน	+	+	034-2 PDBsw	14 วัน	+	+
	28 วัน	+	+		28 วัน	+	+
012 PDBsw	14 วัน	+	+	037 PDBsw	14 วัน	+	+
	28 วัน	+	+		28 วัน	+	+
013-2 PDBsw	14 วัน	+	+	041-2 PDB sw	14 วัน	+	+
	28 วัน	+	+		28 วัน	+	+
015 PDBdw	14 วัน	+	+	055-1 PDBsw	14 วัน	-	-
	28 วัน	+	+		28 วัน	-	-
015 PDBsw	14 วัน	+	+	064-1PDB sw	14 วัน	+	+
	28 วัน	+	+		28 วัน	+	+
017-2 PDBsw	14 วัน	+	+	201-1 PDBsw	14 วัน	+	+
	28 วัน	+	+		28 วัน	+	+
017-3 PDBsw	14 วัน	+	+	215-1 PDBsw	14 วัน	+	+
	28 วัน	+	+		28 วัน	+	+

หมายเหตุ F0 = *F. oxysporum*, Fs = *F. subglutinans*, + = มีสปอร์งอก, - = ไม่มีสปอร์งอก



ภาพที่ 16 ผลของสารสกัดจากรากที่เลี้ยง 14 วัน ต่อการงอกของสปอร์ราโรคพืช *F. oxysporum* (10^5 สปอร์/มิลลิลิตร) บนอาหาร potato dextrose agar 1: สารสกัด 032-1 PDBsw จาก *S. ratnagiriensis* BUCS 032-1; 2 สารสกัด 032-2 PDBsw จาก *S. ratnagiriensis* BUCS 032-2; 3: สารสกัด 034-2 PDBsw จาก *V. enalia* BUCS 034-2; 4: สารสกัด 064-1 PDBsw จาก *Zopfiella* sp. BUSK 064-1; 5: สารสกัด 215-1 PDBsw จาก *V. enalia* BUCH 215-1; CT- แผ่น disc ที่แห้งแล้วหลังจากซบสารละลาย 0.5% DMSO



a

b

ภาพที่ 17 ผลของสารสกัดจากราก *S. ratnagiriensis* BUCS 032-2 ต่อการงอกของสปอร์ราโรคพืช a. *F. oxysporum* (10^5 สปอร์/มิลลิลิตร), b. *F. subglutinans* (10^5 สปอร์/มิลลิลิตร) บนอาหาร potato dextrose agar 1, 2: สารสกัดจาก *S. ratnagiriensis* BUCS 032-2 ที่เลี้ยง 14 วันและ 28 วันสกัดด้วย เอทานอล-เอธิลอะซีเตท, 3, 4: สารสกัดจาก *S. ratnagiriensis* BUCS 032-2 ที่เลี้ยง 14 วันและ 28 วันสกัดด้วย เอธิลอะซีเตท, แผ่น disc ที่แห้งแล้วหลังจากซบสารละลาย 0.5% DMSO

ตารางที่ 15 คุณสมบัติราของทะเลที่คัดเลือก

ราทะเล	คุณสมบัติ			
	ยับยั้งการ	ยับยั้งการ	ไม่มีรายงาน	
	เจริญรา	งอกของ	การสร้าง	อาจเป็นรา
	ทดสอบ	สปอร์	สารออก	ชนิดใหม่
	5 ชนิด	<i>Fusarium</i>	ฤทธิ์	
<i>Aigialus like</i> BUCS 004	V	ND	NA	/
<i>Saagaromyces ratnagiriensis</i> BUCS 032-1	/	/	NA	-
<i>S. ratnagiriensis</i> BUCS 032-2	/	/	NA	-
<i>Astrosphaeriella striatispora</i> BUSK 055-1	/	/	NA	-

หมายเหตุ - = known species, V = variable, ND = not determined,

NA = not available (ไม่มีรายงานมาก่อน)

ตารางที่ 16 การยับยั้งการเจริญราโรคพืช ของสารสกัดจากราทะเลที่เตรียมจากการหมักเป็นเวลา
ต่างๆ กัน

สารสกัด	ระยะเวลา เลี้ยงรา	ระดับการยับยั้ง			
		Cc	Cg	Fo	Fs
004 LNBdw	10 วัน	0	1+	1+	1+
	14 วัน	0	0	1+	2+
	28 วัน	0	0	1+	1+
	42 วัน	1+	0	0	1+
032-2 SBBdw	7 วัน	1+	2+	2+	2+
	14 วัน	1+	2+	1+	1+
	21 วัน	1+	1+	1+	1+
	32 วัน	0	2+	1+	1+
	60 วัน	0	1+	0	0

หมายเหตุ Cc = *Colletotrichum capsici*, Cg = *C. gloeosporioides*, Fo = *Fusarium oxysporum*,

Fs = *F. subglutinans*, SBB= Sabouraud broth, LNB = low nutrient broth,

dw = distilled water

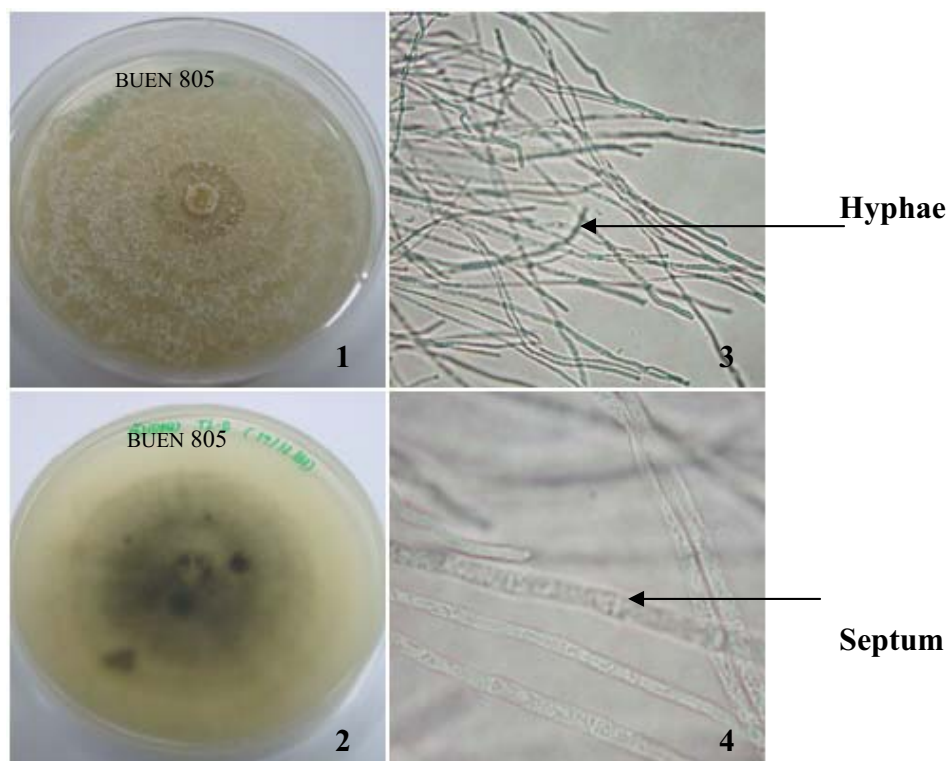
บทที่ 5

ผลการทดลองราเอนโดไฟท์

1. การแยกและศึกษาลักษณะราเอนโดไฟท์จากใบพืชชายเลน

ทำการแยกราเอนโดไฟท์เพิ่มเติมจากใบพืชชายเลนที่มีอยู่เดิม 25 สายพันธุ์ (BUEN 801-815, BUEN 828-837, ตารางที่ 5) เพิ่มขึ้นอีก 18 สายพันธุ์คือ BUEN 816-827 และ BUEN 841-846 ราสายพันธุ์ BUEN 827 มีแนวโน้มที่จะเป็นราน้ำ ส่วนสายพันธุ์อื่นๆ เป็นราสายชั้นสูง ส่วนใหญ่ไม่สร้างสปอร์ ราเอนโดไฟท์ BUEN 832-836 มีลักษณะเหมือนกัน น่าจะเป็นราชนิดเดียวกันแต่แยกมาจากคนละแหล่ง ในที่นี้จะขออธิบายเฉพาะลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะการเจริญของราเอนโดไฟท์ เพียง 7 สายพันธุ์ ได้แก่ ราเอนโดไฟท์ BUEN 827 และราที่สามารถสร้างสปอร์ออกฤทธิ์ชีวภาพที่ยับยั้งราโรคพืชได้ดี รวมทั้งสายพันธุ์ที่สามารถสร้างสปอร์หรือน่าจะบ่งชี้สายพันธุ์ได้ในภายหลัง ภาพลักษณะราแสดงในภาพที่ 18-24

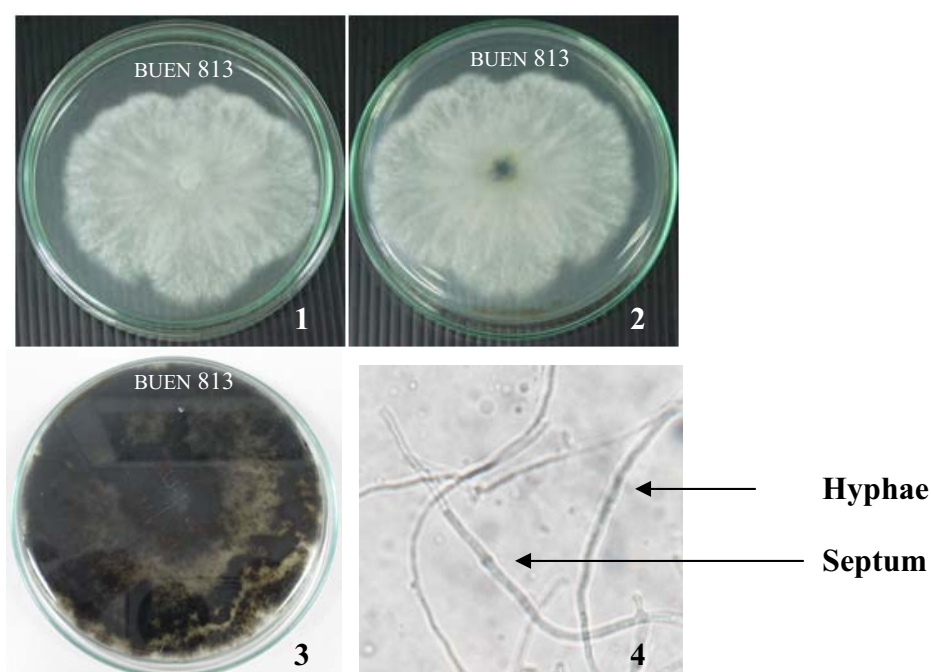
1.1 BUEN 805 (ภาพที่ 18) แยกได้จากใบพังกาหัวส้มดอกแดง



ภาพที่ 18 ลักษณะของรา BUEN 805 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 1: ลักษณะ ด้านหน้าโคโลนีบนอาหาร PDA; 2: ลักษณะด้านใต้โคโลนีบนอาหาร PDA; 3: ลักษณะเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (10X); 4: ลักษณะเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (40X)

โคโลนีที่เจริญบนอาหาร PDA มีลักษณะเป็น เส้นใยสีขาว พูเล็กน้อย ลักษณะการเจริญ เห็นเป็นชั้นๆ เจริญเร็ว เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 7.5 เซนติเมตร โคโลนีที่เจริญบนอาหาร water agar มีลักษณะเส้นใยสีขาว ละเอียด เรียงตัวเป็นระเบียบ แบบติดอาหาร ขอบโคโลนีฟูเล็กน้อย กลางโคโลนีมีเส้นใยสีเขียวเจริญในเนื้ออาหาร เจริญเร็วเมื่อเลี้ยง เป็นเวลา 3 วัน มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6.5 เซนติเมตร และ เมื่อส่องดูเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ไม่พบการสร้างสปอร์ เส้นใยไม่มีสี ผิวเรียบ เรียงตัวเป็นระเบียบ มีผนังกัน ความกว้างประมาณ 2.5 ไมโครเมตร เมื่อแก้จัดสร้าง pycnidia สีเหลืองทองบนอาหาร PDA

1.2 BUEN 813 (ภาพที่ 19) แยกได้จากใบพังกาหัวส้มดอกขาว

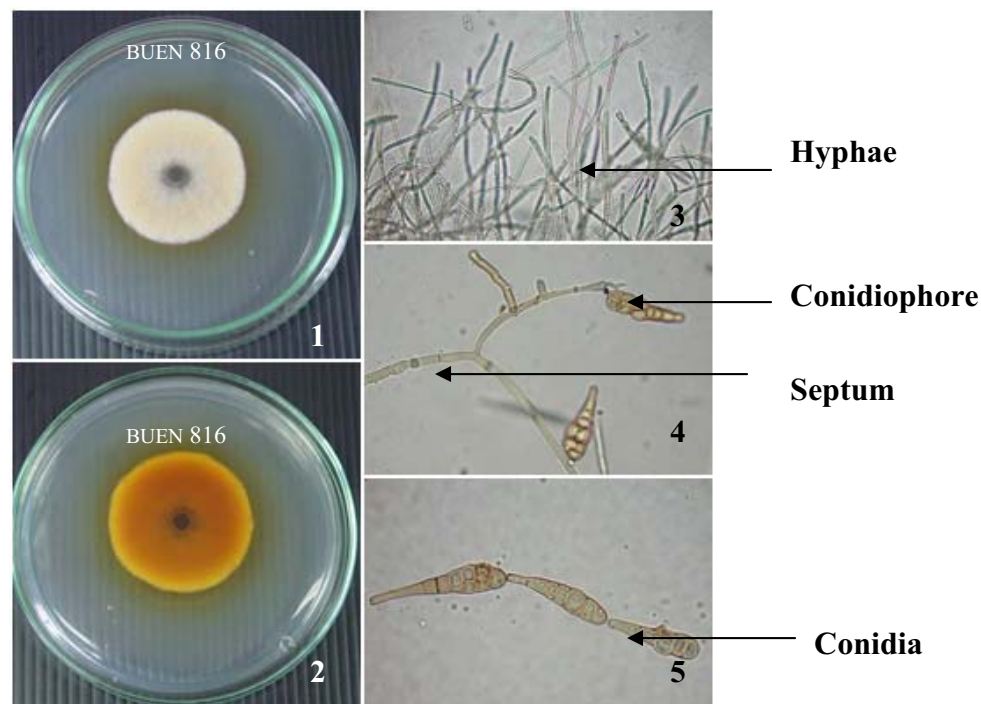


ภาพที่ 19 ลักษณะของรา BUEN 813 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 1,2: ลักษณะด้านหน้าและด้านใต้โคโลนีบนอาหาร PDA ที่เลี้ยง 7 วัน; 3: ลักษณะด้านหน้าโคโลนีบนอาหาร PDA ที่เลี้ยง 3 สัปดาห์; 4: ลักษณะเส้นใย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (40X)

โคโลนีที่เจริญบนอาหาร PDA มีลักษณะเป็นเส้นใยสีขาวอมน้ำเงิน มีลักษณะฟูเล็กน้อย ละเอียด เส้นใยเรียงตัวไม่เป็นระเบียบ โคโลนีเจริญเร็วเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5.0 เซนติเมตร เมื่อเลี้ยงประมาณ 1 สัปดาห์ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 7.0 เซนติเมตร เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบเส้นใยไม่มีสี มีผนังกัน กว้างประมาณ 2.5-5.0 ไมโครเมตร ไม่พบการสร้างสปอร์ เมื่อแก้จัดเส้นใยเปลี่ยนเป็นสีเทาอมน้ำเงิน

ได้ทดลองแยกเส้นใยส่วนขอบโคโลนีที่มีสีน้ำตาลไปเลี้ยงบนอาหาร PDA อีกครั้งหนึ่ง ปรากฏว่าได้ราที่ลักษณะเหมือนเดิม แต่คุณสมบัติการแสดง antibiosis เมื่อเลี้ยงร่วมกับราสาเหตุโรคพืชลดลงเล็กน้อย และให้รหัสราใหม่นี้ว่า BUEN 829

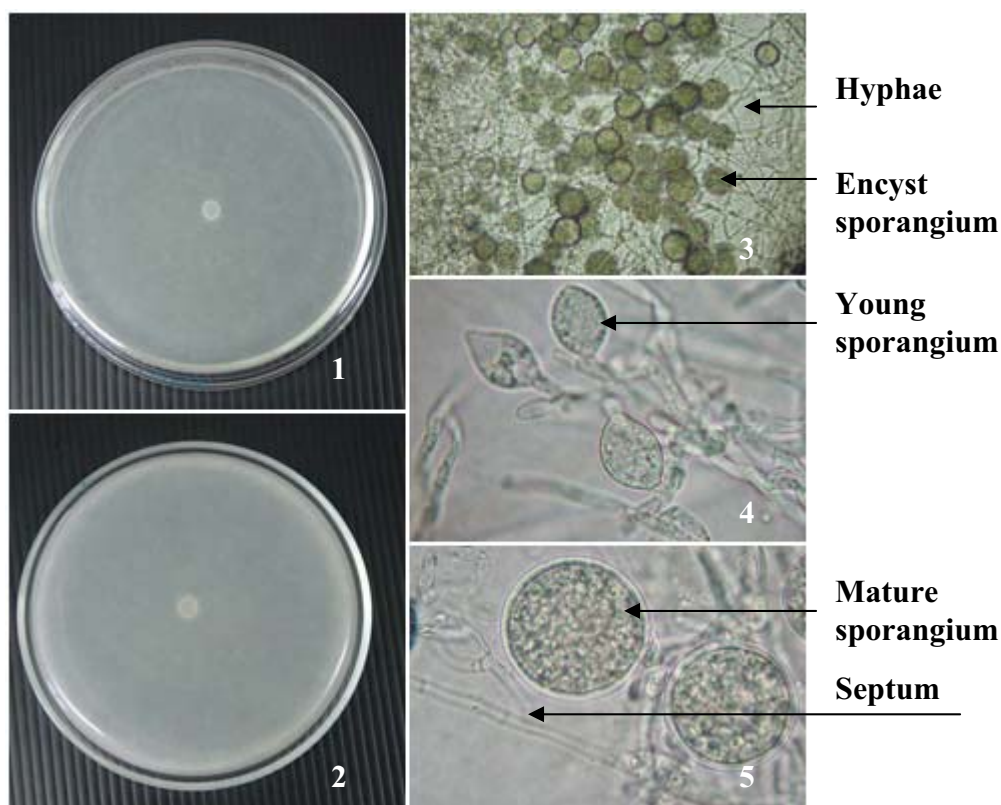
1.3 *Alternaria* sp. BUEN 816 (ภาพที่ 20) แยกได้จากใบ ฝาดดอกขาว



ภาพที่ 20 ลักษณะของรา *Alternaria* sp. BUEN 816 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 1: ลักษณะด้านหน้าโคโลนีบน PDA; 2: ด้านใต้โคโลนีบน PDA; 3: ลักษณะเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (20X); 4: ผนังกันเส้นใยและลักษณะโคนิเดียบนปลายก้านชู 5: โคนิเดียที่ต่อยาวเป็นสายยาวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (20X)

โคโลนีเจริญบนอาหาร PDA มีสีเหลืองอมส้ม ระยะอ่อนมีสีขาว เมื่อแก่จะมีสีส้มอ่อนถึงน้ำตาลแดง สร้างสารสี (pigment) ในเนื้ออาหารสีส้มอมน้ำตาล โคโลนีขอบเรียบสีขาว ผิวหน้าโคโลนีเรียบสม่ำเสมอ พูเล็กน้อยเป็นปุย ด้านหลังโคโลนีมีสีส้มน้ำตาล เจริญเร็ว เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน โคโลนีมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 6.0 เซนติเมตร เส้นใย (hyphae) มีการสร้างผนังกัน (septum) กว้างประมาณ 2.5 - 7.5 ไมโครเมตร เส้นใยระยะแรกไม่มีสี เมื่อแก่เส้นใยจะมีสีน้ำตาล พบการสร้างโคนิเดีย (conidia) บนปลายก้านชู (conidiophore) ที่หยักเล็กน้อย โคนิเดียมีสีน้ำตาล ในระยะอ่อนมีลักษณะค่อนข้างเรียบ เมื่อแก่ผิวขรุขระ มีหลายเซลล์ ผนังกันสปอร์มีทั้งตามยาวและตามขวาง สปอร์จะต่อกันเป็นสาย ขนาดประมาณ 50.0- 62.5 x 12.5-15.0 ไมโครเมตร

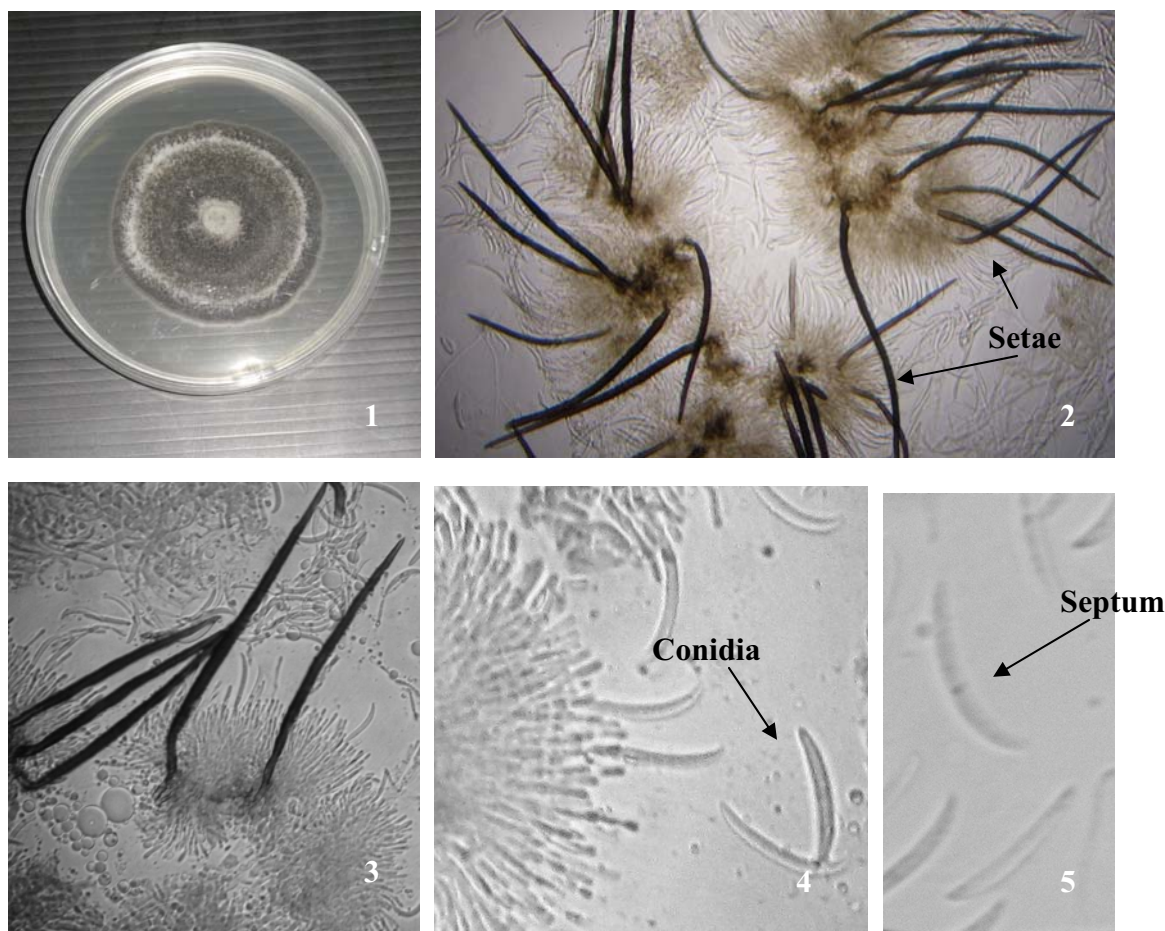
1.4 Oomycete like BUEN 827 (ภาพที่ 21) แยกได้จากใบพังกาหัวส้มดอกขาว



ภาพที่ 21 ลักษณะของรา Oomycete like BUEN 827 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 1: ลักษณะด้านหน้าโคโลนีบน PDA; 2: ด้านใต้โคโลนีบน PDA; 3: ลักษณะเส้นใย (hyphae) และสปอร์แรงเจียม ระยะพัก (encyst sporangium) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (20X); 4: ลักษณะสปอร์แรงเจียมที่ยังอ่อนภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (40X); 5: ลักษณะสปอร์แรงเจียมและลักษณะเส้นใย (hyphae) ที่มีผนังกันภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (40X)

โคโลนีเจริญบนอาหาร PDA ค่อนข้างใส บางละเอียดแบนติดเนื้ออาหาร ขอบเรียบ ไม่สร้างสารสี (pigment) ในเนื้ออาหาร ด้านใต้โคโลนีมีสีขาว เจริญเร็วมากเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน โคโลนีมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 9.0 เซนติเมตร เส้นใยตรง ผิวเรียบ มีผนังกัน (septum) กว้างประมาณ 2.5 ไมโครเมตร (ปกติไม่พบในราน้ำ) สร้างสปอร์แรงเจียมรูปร่างต่างๆ กันจำนวนมากบนก้านชูสปอร์ (sporangiophore) ขนาดสั้นซึ่งอยู่บนเส้นใย สปอร์แรงเจียมมีผนังกันสปอร์แรงเจียมมีผนังกันสปอร์แรงเจียมระยะอ่อนลักษณะคล้ายผลมะนาว (lemon shape) อายุมากขึ้นรูปร่างกลม สปอร์แรงเจียมระยะพักรูปร่างกลมขนาดใหญ่ผนังหนา ขนาดประมาณ 30.0-50.0 ไมโครเมตร

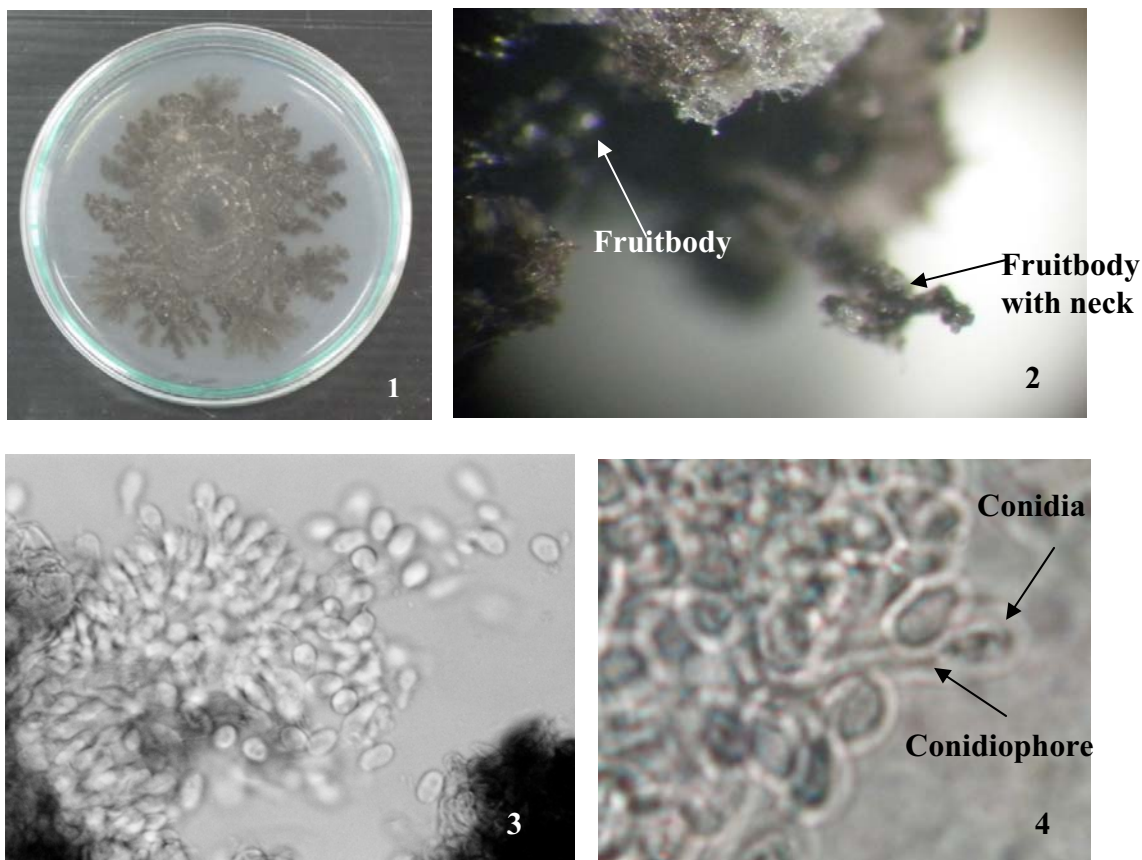
1.5 *Colletotrichum* sp. BUEN 830 (ภาพที่ 22) แยกจากใบโปรงแดง



ภาพที่ 22 ลักษณะของรา *Colletotrichum* sp. BUEN 830 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 1: ลักษณะด้านหน้าโคโลนีบนอาหาร PDA ที่เลี้ยง 7 วัน; 2, 3: ลักษณะ squash sclerotium จากโคโลนีบนอาหาร; 4: ลักษณะ conidia และ conidiophore ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (40X); 5 ภาพขยายโคนีเดียแสดงผนังกันสปอร์

โคโลนีที่เจริญบนอาหาร PDA มีลักษณะเป็นเส้นใยสีเทาอมนเหลือง มีลักษณะฟูเล็กน้อย เจริญเร็วปานกลาง เมื่อเลี้ยงประมาณ 1 สัปดาห์ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5.0 เซนติเมตร เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบเส้นใยไม่มีสี มีผนังกัน กว้างประมาณ 2.5-5.0 ไมโครเมตร ขณะอ่อนอยู่ไม่พบการสร้างสปอร์ เมื่อแก่จัดสร้าง sclerotia ที่มี setae บนอาหาร โดยเฉพาะอย่างยิ่งสร้างได้ดีบนอาหาร low nutrient โคนีเดียรูปเสี้ยวขนาดประมาณ 25.0 x 2.5 ไมโครเมตร มี 0-1 ผนังกัน อยู่บนโคนีดีโอฟอร์สั้นๆ ที่อยู่รวมกันมีลักษณะเป็น sporodochium

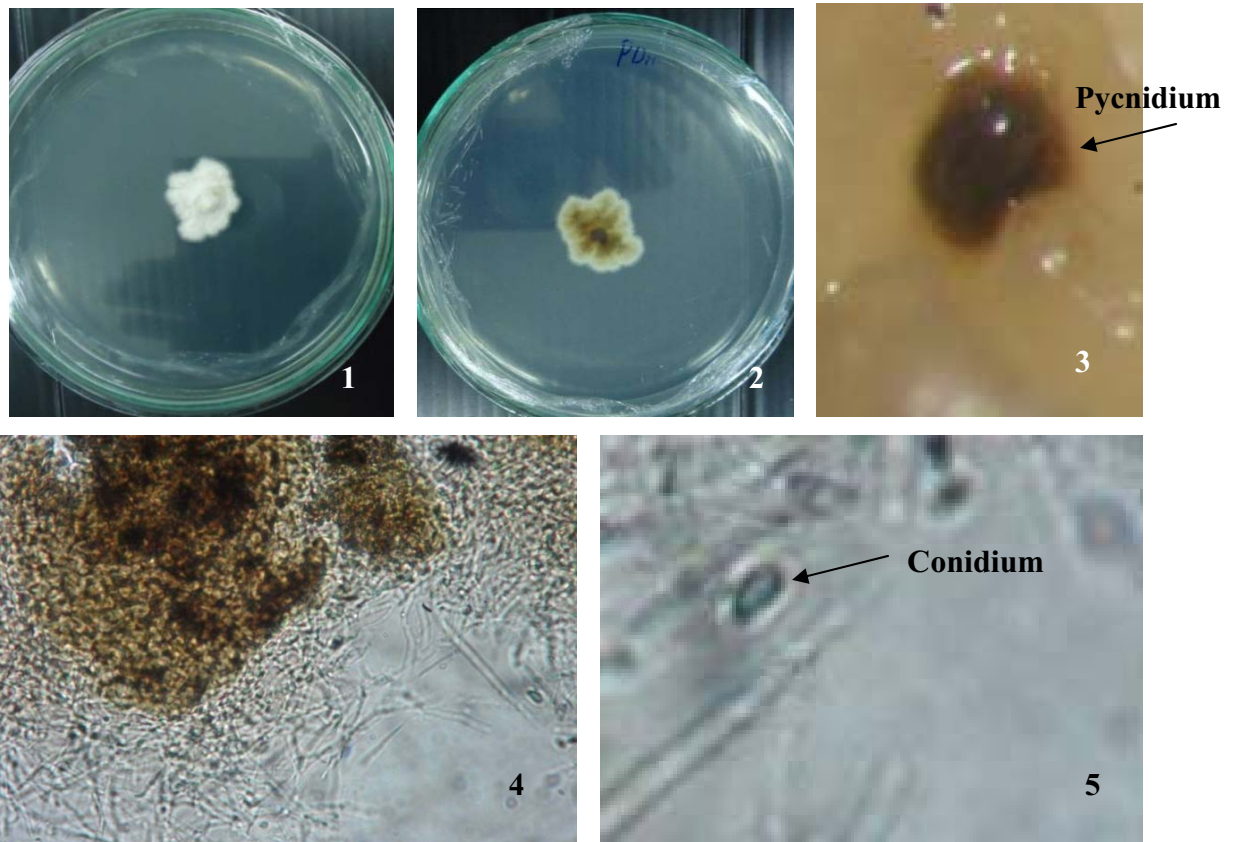
1.6 BUEN 836 (ภาพที่ 23) แยกจากใบโปรงแดง



ภาพที่ 23 ลักษณะของรา BUEN 836 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 1: ลักษณะด้านหน้าโคโลนีบนอาหาร PDA ที่เลี้ยง 14 วัน; 2: ลักษณะฟรุตบอดี้รูปคนโท มีและไม่มีคอบนอาหารได้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ; 3: ลักษณะ squash fruitbody แสดงให้เห็นสปอร์รูปไข่ เซลเดียว ไม่มีสี; 4: ภาพขยายแสดงโคนิเดียและโคนิดิโอฟอร์

โคโลนีที่เจริญบนอาหาร PDA มีลักษณะเป็นเส้นใยสีเทาดำ มีลักษณะฟูเล็กน้อย ขอบหยัก (rhizoid like) เจริญเร็วปานกลาง เมื่อเลี้ยงประมาณ 1 สัปดาห์ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 4.0 เซนติเมตร เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบเส้นใยไม่มีสี มีผนังกัน กว้างประมาณ 2.5-5.0 ไมโครเมตร ขณะอ่อนอยู่ไม่พบการสร้างสปอร์ เมื่อแก่จัดสร้างฟรุตบอดี้รูปคนโทหรือคนโทที่มีคอยาวสีดำ สร้างโคนิเดีย เซลเดียว รูปไข่ค่อนข้างกลม บนโคนิดิโอฟอร์ตรงที่มีปลายหยักเล็กน้อย สปอร์ไม่มีสีขนาดประมาณ 10.0-12.5 x 5.5 ไมโครเมตร

1.8 *Phomopsis* sp. BUEN 846 (ภาพที่ 24) แยกจากใบโพธิ์ทะเล



ภาพที่ 24 ลักษณะของรา *Phomopsis* sp. BUEN 846 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA 1: ลักษณะด้านหน้า โคลนบนอาหาร PDA; 2: ลักษณะด้านใต้โคลนบนอาหาร PDA; 3: ลักษณะด้านบน ฟรุตบอดีแบบ คนโทบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ; 4: ลักษณะ squash fruitbody ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (40X); 5: ภาพขยายสปอร์

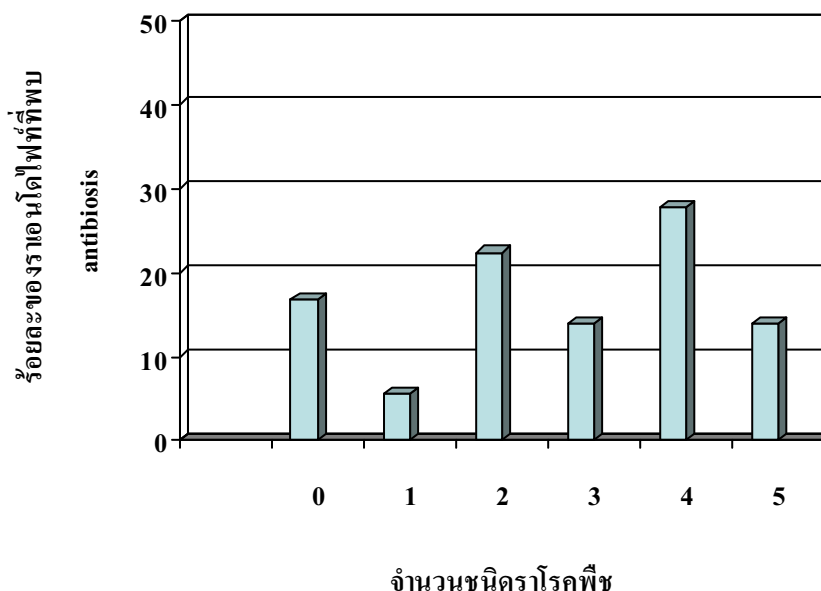
โคลนเจริญบนอาหาร PDA เส้นใยอ่อนสีขาว สานกันแน่น ขอบไม่เรียบ ด้านหลังโคลนมี สีเหลือง สร้างสารสี (pigment) สีเหลืองในเนื้ออาหาร ด้านหลังโคลนมีสีขาว เจริญช้า เมื่อเลี้ยง ประมาณ 1 สัปดาห์ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3.0 เซนติเมตร เส้นใยตรง ผิวเรียบ มีผนังกัน (septum) กว้างประมาณ 2.5 ไมโครเมตร สร้างฟรุตบอดีรูปคนโทฝังในเนื้ออาหาร ภายในมีโคนเดี่ยว รูปรียาว หรือคล้ายหยดน้ำ ไม่มีสี ขนาดประมาณ 7.5 x 1.25 ไมโครเมตร

2. ปฏิสัมพันธ์รูปแบบ antibiosis ระหว่างราเอนโดไฟท์กับราโรคพืช

2.1 รูปแบบปฏิสัมพันธ์

จากการนำราเอนโดไฟท์ 36 สายพันธุ์ มาศึกษาปฏิสัมพันธ์รูปแบบ antibiosis ระหว่างราทดสอบกับราโรคพืช 5 ชนิด ได้แก่ *Colletotrichum capsici* (Cc) DOAC 1511, *C. gloeosporioides* (Cg) DOAC 0782, *Fusarium oxysporum* (Fo) DOAC 1808, *F. subglutinans* (Fs) DOAC 0761 และ *Pestalotiopsis* sp. (Ps) DOAC 1098 บนอาหาร 4 ชนิด คือ PDA, SBA, YMG และ LNA ที่เตรียมด้วยน้ำกลั่น รวมทั้งหมด 720 คู่ พบระดับ ปฏิสัมพันธ์รูปแบบ antibiosis แตกต่างกันตั้งแต่ไม่พบ antibiosis (0) จนกระทั่งพบในระดับแรงมาก (4+) ระดับความแรง antibiosis และจำนวนสายพันธุ์รา เอนโดไฟท์ ที่ให้ผลบวกขึ้นกับชนิดของราเอนโดไฟท์และราโรคพืชที่นำมาทดสอบ

ราเอนโดไฟท์ 30 สายพันธุ์ จาก 36 สายพันธุ์ (83.3 %) สามารถแสดงผล antibiosis เมื่อเลี้ยงร่วมกับราโรคพืชชนิดใดชนิดหนึ่ง 20 สายพันธุ์จาก 36 สายพันธุ์ (55.6 %) แสดงผล antibiosis เมื่อเลี้ยงร่วมกับราโรคพืชตั้งแต่ 3 ชนิด และ 5 สายพันธุ์จาก 36 สายพันธุ์ (13.9%) คือ สายพันธุ์ BUEN 829, BUEN 830, BUEN 832, BUEN 834 และ BUEN 836 แสดงผล antibiosis เมื่อเลี้ยงร่วมกับราโรคพืชได้ทุกชนิด ความสามารถในการแสดงผล antibiosis ของราเอนโดไฟท์ แสดงไว้ใน ภาพที่ 25 และ ตารางที่ 17



ภาพที่ 25 ร้อยละของราเอนโดไฟท์ที่แสดงผล antibiosis ต่อจำนวนชนิดราโรคพืช

ตารางที่ 17 ระดับ antibiosis ของราเอนโดไฟท์ บนอาหารแข็งชนิดต่างๆ ที่มีต่อราโรคพืช

ลำดับ	ราเอนโดไฟท์	อาหาร	ระดับ antibiosis ต่อราโรคพืช				
			Cc	Cg	Fo	Fs	Ps
1	BUEN 801	PDAdw	1+	0	0	0	0
		SBA dw	1+	0	0	0	0
		YMGdw	1+	0	0	0	0
		LNAdw	1+	0	1+	1+	0
2	BUEN 802	PDAdw	1+	0	0	0	0
		SBA dw	1+	0	1+	0	3+
		YMGdw	0	0	0	0	0
		LNAdw	1+	0	1+	1+	0
3	BUEN 803	PDAdw	2+	1+	3+	0	1+
		SBA dw	2+	0	2+	0	1+
		YMGdw	2+	0	1+	0	0
		LNAdw	3+	0	1+	0	1+
4	BUEN 804	PDAdw	1+	0	1+	1+	1+
		SBA dw	0	0	2+	2+	0
		YMGdw	0	0	2+	0	0
		LNAdw	2+	0	2+	1+	1+
5	BUEN 805	PDAdw	0	0	2+	0	0
		SBA dw	0	0	1+	0	0
		YMGdw	0	0	1+	0	0
		LNAdw	0	0	0	0	0
6	BUEN 806	PDAdw	0	0	0	0	0
		SBA dw	0	0	0	0	0
		YMGdw	0	0	0	0	0
		LNAdw	0	0	0	0	0

ตารางที่ 17 ระดับ antibiosis ของราเอนโดไฟท์ บนอาหารแข็งชนิดต่างๆ ที่มีต่อราโรคพืช (ต่อ)

ลำดับ	ราเอนโดไฟท์	อาหาร	ระดับ antibiosis ต่อราโรคพืช				
			Cc	Cg	Fo	Fs	Ps
7	BUEN 807	PDAdw	0	0	0	0	0
		SBA dw	1+	0	0	0	0
		YMGdw	0	0	0	0	0
		LNAdw	1+	0	0	0	0
8	BUEN 808	PDAdw	0	0	0	0	1+
		SBA dw	1+	1+	0	1+	1+
		YMGdw	0	0	0	0	0
		LNAdw	1+	0	0	0	2+
9	BUEN 809	PDAdw	0	1+	0	0	2+
		SBA dw	1+	1+	0	0	2+
		YMGdw	0	1+	0	0	1+
		LNAdw	0	1+	0	0	2+
10	BUEN 810	PDAdw	0	0	1+	1+	1+
		SBA dw	0	0	1+	1+	1+
		YMGdw	0	0	0	0	0
		LNAdw	0	1+	0	0	0
11	BUEN 811	PDAdw	0	0	0	0	2+
		SBA dw	0	0	0	0	1+
		YMGdw	0	1+	0	0	2+
		LNAdw	0	0	0	0	1+
12	BUEN 812	PDAdw	0	0	1+	0	1+
		SBA dw	0	0	1+	0	2+
		YMGdw	0	1+	0	0	2+
		LNAdw	0	0	2+	0	1+

ตารางที่ 17 ระดับ antibiosis ของราเอนโดไฟท์ บนอาหารแข็งชนิดต่างๆ ที่มีต่อราโรคพืช (ต่อ)

ลำดับ	ราเอนโดไฟท์	อาหาร	ระดับ antibiosis ต่อราโรคพืช				
			Cc	Cg	Fo	Fs	Ps
13	BUEN 813	PDAdw	0	1+	1+	0	0
		SBA dw	0	4+	4+	3+	3+
		YMGdw	0	0	0	0	0
		LNAdw	0	4+	4+	4+	4+
14	BUEN 814	PDAdw	0	0	0	0	0
		SBA dw	0	0	0	0	0
		YMGdw	0	0	0	0	0
		LNAdw	0	0	0	0	0
15	BUEN 815	PDAdw	0	0	1+	1+	2+
		SBA dw	0	0	0	0	0
		YMGdw	0	0	1+	2+	1+
		LNAdw	0	0	0	0	2+
16	BUEN 816	PDAdw	0	0	0	0	0
		SBA dw	0	1+	0	0	0
		YMGdw	0	0	0	0	1+
		LNAdw	0	0	0	0	1+
17	BUEN 817	PDAdw	0	2+	0	0	0
		SBA dw	0	2+	1+	0	0
		YMGdw	0	1+	0	0	0
		LNAdw	0	3+	0	0	0
18	BUEN 819	PDAdw	0	0	0	0	0
		SBA dw	0	0	0	0	0
		YMGdw	0	0	0	0	0
		LNAdw	0	0	0	0	0

ตารางที่ 17 ระดับ antibiosis ของราเอนโดไฟท์ บนอาหารแข็งชนิดต่างๆ ที่มีต่อราโรคพืช (ต่อ)

ลำดับ	ราเอนโดไฟท์	อาหาร	ระดับ antibiosis ต่อราโรคพืช				
			Cc	Cg	Fo	Fs	Ps
19	BUEN 820	PDAdw	1+	1+	1+	0	0
		SBA dw	0	0	1+	0	0
		YMGdw	0	0	1+	0	0
		LNAdw	0	0	2+	0	0
20	BUEN 823	PDAdw	0	0	0	0	0
		SBA dw	0	0	0	2+	0
		YMGdw	0	0	0	0	0
		LNAdw	0	0	1+	1+	0
21	BUEN 827	PDAdw	0	0	0	0	0
		SBA dw	0	0	0	0	0
		YMGdw	0	0	0	0	0
		LNAdw	0	0	0	0	0
22	BUEN 828	PDAdw	0	1+	0	0	1+
		SBA dw	0	0	0	0	0
		YMGdw	1+	1+	2+	0	2+
		LNAdw	0	2+	0	0	1+
23	BUEN 829	PDAdw	0	1+	0	2+	0
		SBA dw	1+	1+	0	1+	1+
		YMGdw	1+	0	0	2+	1+
		LNAdw	0	1+	1+	2+	0
24	BUEN 830	PDAdw	4+	4+	4+	3+	1+
		SBA dw	3+	4+	3+	2+	2+
		YMGdw	3+	3+	3+	4+	0
		LNAdw	1+	1+	1+	2+	1+

ตารางที่ 17 ระดับ antibiosis ของราเอนโดไฟท์ บนอาหารแข็งชนิดต่างๆ ที่มีต่อราโรคพืช (ต่อ)

ลำดับ	ราเอนโดไฟท์	อาหาร	ระดับ antibiosis ต่อราโรคพืช				
			Cc	Cg	Fo	Fs	Ps
25	BUEN 831	PDAdw	4+	4+	0	0	0
		SBA dw	0	4+	4+	3+	0
		YMGdw	0	2+	2+	0	0
		LNAdw	0	2+	1+	1+	0
26	BUEN 832	PDAdw	0	1+	0	0	3+
		SBA dw	1+	4+	4+	0	0
		YMGdw	1+	2+	3+	1+	3+
		LNAdw	2+	1+	0	0	3+
27	BUEN 833	PDAdw	0	1+	3+	3+	0
		SBA dw	3+	4+	3+	1+	0
		YMGdw	2+	3+	3+	2+	0
		LNAdw	1+	4+	3+	2+	0
28	BUEN 834	PDAdw	2+	4+	1+	0	0
		SBA dw	3+	3+	2+	2+	1+
		YMGdw	4+	3+	3+	2+	0
		LNAdw	2+	4+	1+	0	0
29	BUEN 835	PDAdw	1+	3+	4+	2+	0
		SBA dw	3+	4+	4+	2+	0
		YMGdw	3+	3+	2+	2+	0
		LNAdw	1+	4+	4+	3+	0
30	BUEN 836	PDAdw	2+	1+	2+	0	0
		SBA dw	2+	4+	4+	1+	3+
		YMGdw	2+	4+	3+	3+	0
		LNAdw	0	4+	3+	1+	0

ตารางที่ 17 ระดับ antibiosis ของราเอนโดไฟท์ บนอาหารแข็งชนิดต่างๆ ที่มีต่อราโรคพืช (ต่อ)

ลำดับ	ราเอนโดไฟท์	อาหาร	ระดับ antibiosis ต่อราโรคพืช				
			Cc	Cg	Fo	Fs	Ps
31	BUEN 837	PDAdw	1+	0	0	0	0
		SBA dw	1+	0	0	0	0
		YMGdw	0	0	0	0	0
		LNAdw	0	0	0	0	0
32	BUEN 841	PDAdw	0	0	0	0	0
		SBA dw	0	0	0	0	0
		YMGdw	0	0	0	0	0
		LNAdw	0	0	0	0	0
33	BUEN 842	PDAdw	0	2+	0	1+	0
		SBA dw	0	2+	0	3+	0
		YMGdw	0	1+	0	0	0
		LNAdw	0	1+	0	0	0
34	BUEN 843	PDAdw	0	0	0	0	0
		SBA dw	0	0	0	0	0
		YMGdw	0	0	0	0	0
		LNAdw	0	0	0	0	0
35	BUEN 844	PDAdw	0	0	0	0	2+
		SBA dw	0	0	0	2+	1+
		YMGdw	0	0	0	3+	2+
		LNAdw	0	0	0	0	0
36	BUEN 845	PDAdw	0	0	0	3+	0
		SBA dw	0	0	0	2+	0
		YMGdw	0	0	0	2+	0
		LNAdw	0	0	0	0	0

หมายเหตุ Cc = *Colletotrichum capsici* DOAC 1511, Cg = *C. gloeosporioides* DOAC 0782,
Fo = *Fusarium oxysporum* DOAC 1808, Fs = *F. subglutinans* DOAC 0761,
Ps = *Pestalotiopsis* sp. DOAC 1098
PDA = potato dextrose agar, SBA= Sabouraud agar, YMG = yeast malt glucose agar,
LNA = low nutrient agar, dw = distilled water

จากภาพและตารางข้างต้นจะเห็นว่าเมื่อนำราเอนโดไฟท์มาเลี้ยงร่วมกับราโรคพืชชนิดต่างๆกัน พบผล antibiosis แตกต่างกัน ไม่มีแบบแผนแน่นอน และเมื่อกำหนดให้ระดับ antibiosis 1+ และ 2+ เป็นระดับอ่อนและปานกลาง (antibiosis) ส่วน 3+ และ 4+ เป็นระดับดีและดีมาก (strong antibiosis) เช่นเดียวกับการกำหนดระดับในราทะเล พบว่าไม่มีราสายพันธุ์ใดที่ให้ผลยับยั้งระดับ strong antibiosis ต่อราโรคพืชได้ครบทั้ง 5 ชนิด แต่มีราเอนโดไฟท์ 6 สายพันธุ์ (16.7 %) คือ BUEN 813, BUEN 830, BUEN 831, BUEN 833, BUEN 835 และ BUEN 836 ที่ให้ผลบวกระดับ strong antibiosis ต่อราโรคพืชได้ 4 ชนิด BUEN 830 ให้ผลดีที่สุด รองลงมาคือ BUEN 836 รา 14 สายพันธุ์จาก 36 สายพันธุ์ (41.7%) แสดงผล antibiosis ระดับ strong antibiosis ต่อราโรคพืชอย่างน้อย 1 ชนิด

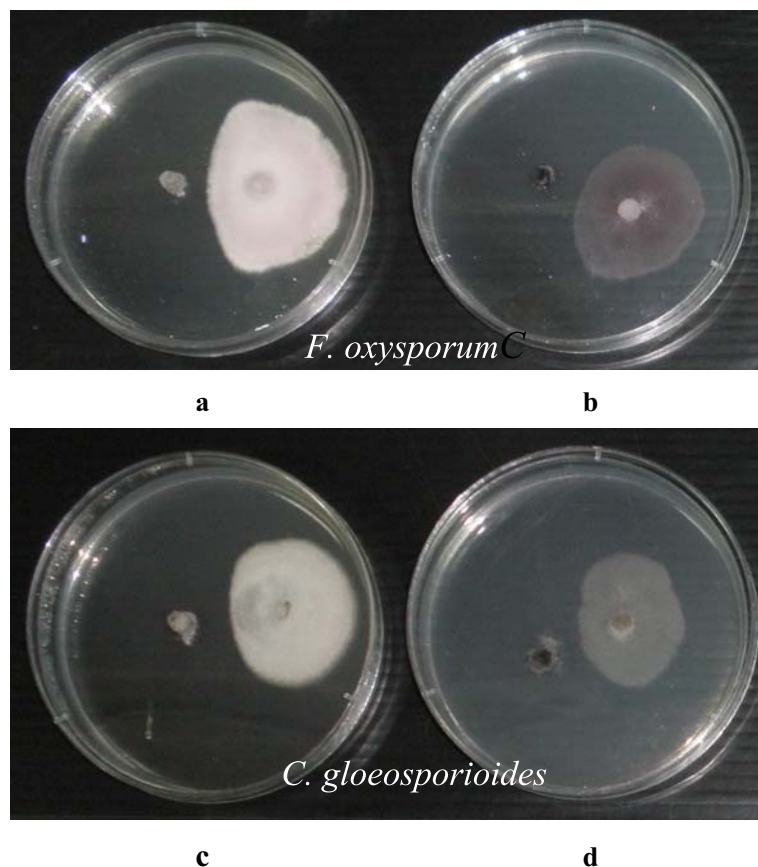
2.2 ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ ต่อความสามารถในการแสดงผล antibiosis

เมื่อนำข้อมูลจากตารางที่ 17 มาวิเคราะห์จำนวนสายพันธุ์ราเอนโดไฟท์ที่แสดงผล antibiosis ระดับต่างๆ เห็นได้ว่า อาหารต่างชนิดกันมีผลต่อการแสดงผล antibiosis ของราเอนโดไฟท์ค่อนข้างชัดเจน (ตารางที่ 18) ข้อมูลในตารางที่ 18 แสดงว่าราเอนโดไฟท์บน SBA ให้ผล antibiosis 4+ จำนวนมากที่สุด 13 สายพันธุ์ รองลงมาคือ LNA มีจำนวน 9 สายพันธุ์ ผลของอาหารต่อการแสดงผล antibiosis ของรา 6 สายพันธุ์ที่ให้ผลดีที่สุดจากการศึกษานี้แสดงในตารางที่ 19 ตัวอย่างผล antibiosis ระดับต่างๆ แสดงในภาพที่ 26-28

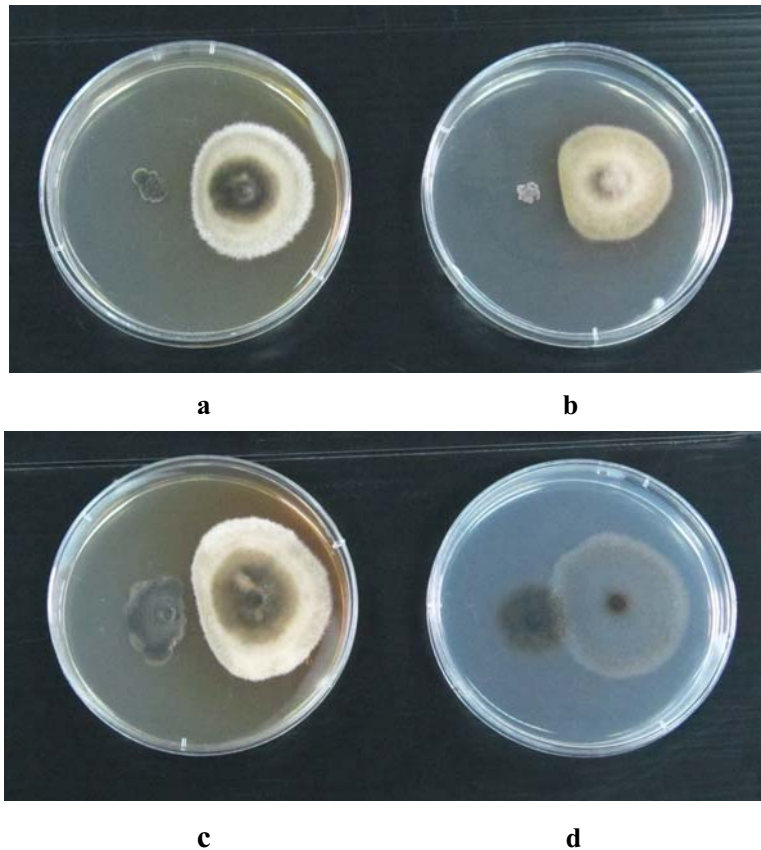
ตารางที่ 19 ระดับ antibiosis ของราเอนโดไฟท์ที่ดีที่สุด บนอาหารแข็งชนิดต่างๆ ที่มีต่อราโรคพืช

ลำดับ	ราเอนโดไฟท์	อาหาร	ระดับ antibiosis ต่อราโรคพืช				
			Cc	Cg	Fo	Fs	Ps
1	BUEN 813	PDAdw	0	1+	1+	0	0
		SBA dw	0	4+	4+	3+	3+
		YMGdw	0	0	0	0	0
		LNAdw	0	4+	4+	4+	4+
2	BUEN 830	PDAdw	4+	4+	4+	3+	1+
		SBA dw	3+	4+	3+	2+	2+
		YMGdw	3+	3+	3+	4+	0
		LNAdw	1+	1+	1+	2+	1+
3	BUEN 831	PDAdw	4+	4+	0	0	0
		SBA dw	0	4+	4+	3+	0
		YMGdw	0	2+	2+	0	0
		LNAdw	0	2+	1+	1+	0
4	BUEN 833	PDAdw	0	1+	3+	3+	0
		SBA dw	3+	4+	3+	1+	0
		YMGdw	2+	3+	3+	2+	0
		LNAdw	1+	4+	3+	2+	0
5	BUEN 835	PDAdw	1+	3+	4+	2+	0
		SBA dw	3+	4+	4+	2+	0
		YMGdw	3+	3+	2+	2+	0
		LNAdw	1+	4+	4+	3+	0
6	BUEN 836	PDAdw	2+	1+	2+	0	0
		SBA dw	2+	4+	4+	1+	3+
		YMGdw	2+	4+	3+	3+	0
		LNAdw	0	4+	3+	1+	0

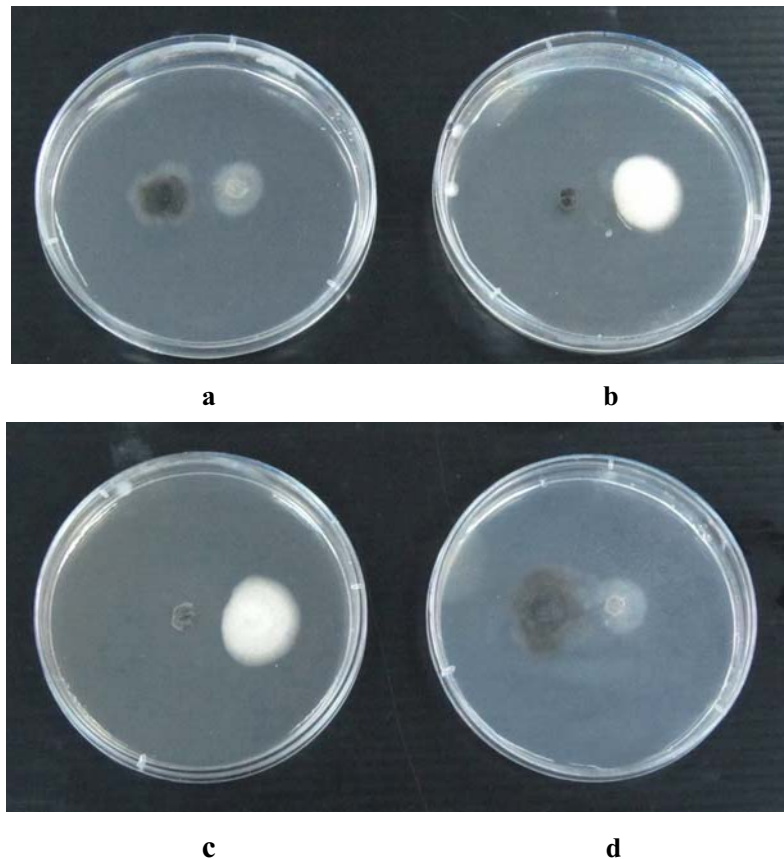
หมายเหตุ Cc = *Colletotrichum capsici* DOAC 1511, Cg = *C. gloeosporioides* DOAC 0782, Fo = *Fusarium oxysporum* DOAC 1808, Fs = *F. subglutinans* DOAC 0761, Ps = *Pestalotiopsis* sp. DOAC 1098
PDA = potato dextrose agar, SBA = Sabouraud agar, YMG = yeast malt glucose agar,
LNA = low nutrient agar, dw = distilled water



ภาพที่ 26 ระดับความแรง antibiosis 4+ เมื่อเลี้ยงเอนโดไฟต์ BUEN 813 (โคโลนีด้านซ้ายของจานอาหารใน a-d) ร่วมกับราโรคพืช (โคโลนีด้านขวาของจานอาหารใน a-d) a. เมื่อเลี้ยงร่วมกับ *F. oxysporum* บนอาหาร SBA; b. เมื่อเลี้ยงร่วมกับ *F. oxysporum* บนอาหาร LNA; c. เมื่อเลี้ยงร่วมกับ *C. gloeosporioides* บนอาหาร SBA; d. เมื่อเลี้ยงร่วมกับ *C. gloeosporioides* บนอาหาร LNA



ภาพที่ 27 ระดับความแรง antibiosis เมื่อเลี้ยงราเอนโดไฟท์ BUEN 830 (โคโลนีด้านซ้ายของจานอาหารใน a-d) ร่วมกับราโรคพืช *C. capsici* (โคโลนีด้านขวาของจานอาหารใน a-d) บนอาหารที่เตรียมด้วยน้ำกลั่น a. ระดับความแรง 4+ บนอาหาร PDA; b. ระดับความแรง 3+ บนอาหาร SBA; c. ระดับความแรง 3+ บนอาหาร YMG; d. ระดับความแรง 1+ บนอาหาร LNA



ภาพที่ 28 ระดับความแรง antibiosis เมื่อเลี้ยงราเอนโดไฟท์ BUEN 836 (โคโลนีด้านซ้ายของจานอาหารใน a-d) ร่วมกับราโรคฟิซ *C. gloeosporioides* (โคโลนีด้านขวาของจานอาหารใน a-d) บนอาหารที่เตรียมด้วยน้ำกลั่น a. ระดับความแรง 1+ บนอาหาร PDA; b. ระดับความแรง 4+ บนอาหาร SBA; c. ระดับความแรง 4+ บนอาหาร YMG; d. ระดับความแรง 4+ บนอาหาร LNA

3. การศึกษาผลของสารสกัดต่อการยับยั้งการเจริญราโรคฟิซ

3.1 ผลของระยะเวลาหมักในอาหารเหลือต่อความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ชีวภาพ

การเปรียบเทียบสารสกัดที่เตรียมได้จากการหมัก 14 วัน และ 28 วัน ของสารสกัดจากราเอนโดไฟท์ จำนวน 10 สายพันธุ์ ไม่พบว่าสารสกัดคู่ใดให้ผลแตกต่างกันอย่างชัดเจน BUEN 829 และ BUEN 830 ยับยั้งราโรคฟิซได้ดีกว่าสารสกัดอื่น ๆ เล็กน้อย (ตารางที่ 20) ตัวอย่างผลยับยั้งการเจริญราโรคฟิซของสารสกัดแสดงในภาพที่ 29

ตารางที่ 20 การยับยั้งการเจริญของเส้นใยราโรคพืชของสารสกัดจากราเอนโดไฟท์ที่เตรียมจากการหมักเป็นเวลา 14 วันและ 28 วัน

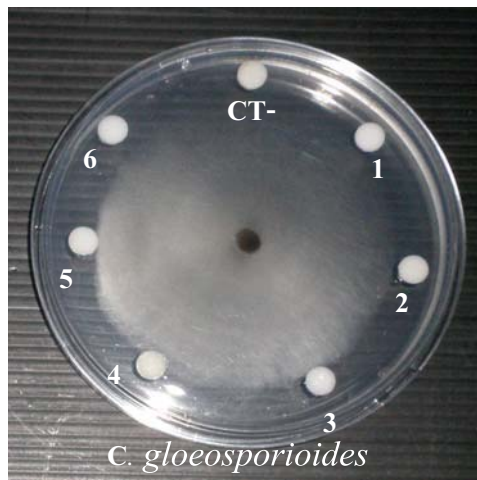
สารสกัด	ระยะเวลาเลี้ยงรา	ระดับการยับยั้งรา				
		<i>C.</i>		<i>F.</i>	<i>F.</i>	<i>Pestalotiopsis</i>
		<i>C. capsici</i>	<i>gloeosporioides</i>	<i>oxysporum</i>	<i>subglutinans</i>	sp.
802 LNBdw	7 วัน	2+	-	-	1+	1+
	14 วัน	1+	-	-	-	-
803 LNBdw	7 วัน	2+	-	-	-	-
	14 วัน	1+	-	-	-	-
805 LNBdw	7 วัน	-	-	-	-	1+
	14 วัน	-	-	-	-	-
813 LNBdw	7 วัน	1+	1+	-	1+	-
	14 วัน	1+	-	-	-	-
829 LNBdw	7 วัน	-	1+	-	2+	1+
	14 วัน	1+	2+	1+	1+	2+
830 PDBdw	7 วัน	-	-	2+	1+	-
	14 วัน	1+	1+	2+	1+	-
831 PDBdw	7 วัน	-	1+	-	-	1+
	14 วัน	1+	1+	-	-	-
834 SBBdw	7 วัน	1+	-	-	1+	-
	14 วัน	-	-	1+	1+	-
835 SBBdw	7 วัน	-	1+	-	1+	1+
	14 วัน	-	1+	-	1+	1+
836	7 วัน	1+	-	-	-	-
YMGBdw	14 วัน	1+	-	-	-	-

หมายเหตุ Cc = *Colletotrichum capsici* DOAC 1511, Cg = *C. gloeosporioides* DOAC 0782, Fo = *Fusarium*

oxysporum DOAC 1808, Fs=*F. subglutinans* DOAC 0761, Ps =*Pestalotiopsis* sp.DOAC 1098

PDB = potato dextrose broth, SBB= Sabouraud broth, YMGB = yeast malt glucose broth,

LNB = low nutrient broth , dw = distilled water



ภาพที่ 29 การยับยั้งการเจริญเส้นใยราโรคพืช *C. gloeosporioides* บนอาหาร LNA ของสารสกัดจากรา เอนโดไฟท์ที่เลี้ยงบนอาหาร LNAdw 1: สารสกัด 802 LNBdw จากรา BUEN 802 ที่เลี้ยง 14 วัน (ไม่ยับยั้ง); 2: สารสกัด 803 LNBdw จากรา BUEN 803 ที่เลี้ยง 14 วัน (ไม่ยับยั้ง); 3: สารสกัด 805 LNBdw จากรา BUEN 805 ที่เลี้ยง 7 วัน (ไม่ยับยั้ง); 4: สารสกัด 805 LNBdw จากรา BUEN 805 ที่เลี้ยง 14 วัน (ไม่ยับยั้ง); 5: สารสกัด 829 LNBdw จากรา BUEN 829 ที่เลี้ยง 7 วัน (ระดับการยับยั้ง 1+); 6: สารสกัด 829 LNBdw จากรา BUEN 829 ที่เลี้ยง 14 วัน (ระดับการยับยั้ง 2+); CT-คือแผ่น disc ที่ทำให้แห้งแล้ว หลังจากหุบสารละลาย 0.5% DMSO

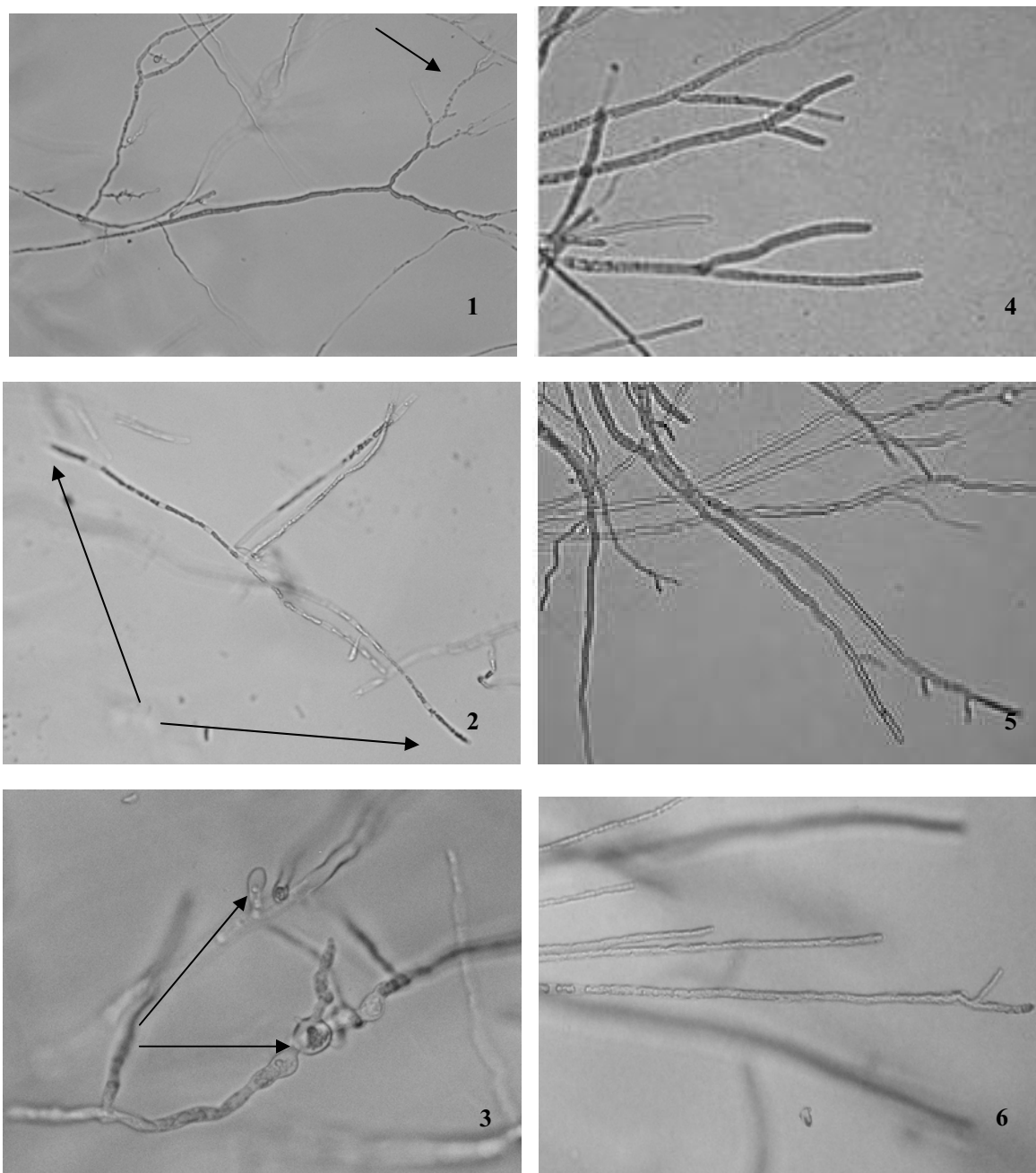
3.2 การเปรียบเทียบผลการยับยั้งการเจริญราโรคพืชของสารสกัดกับผล antibiosis

เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างผล antibiosis กับผลการยับยั้งราโรคพืช ของสารสกัดที่เตรียมจากเอนโดไฟท์ 10 สายพันธุ์ ผลจากการทดลอง 20 แสดงให้เห็นว่าผล antibiosis ไม่สามารถใช้ทำนายความสามารถของราเอนโดไฟท์ว่าสร้างสารยับยั้งราได้ดีแตกต่างกันหรือไม่อย่างชัดเจน เอนโดไฟท์ที่แสดงผล antibiosis ทุกระดับ สามารถตรวจพบการสร้างสารยับยั้งการเจริญราโรคพืช (antifungus) ได้แตกต่างกันทั้งระดับอ่อนถึงปานกลาง ไม่มีรูปแบบที่แน่นอน

เมื่อนำราที่ผลปฏิสัมพันธ์และผลการทดสอบสารสกัดแตกต่างกัน 2 ลักษณะ คือ antibiosis + : antifungus + และ antibiosis + : antifungus - มาตรวจดูลักษณะที่เปลี่ยนไปของปลายเส้นใยของราที่ทดสอบกับสารสกัดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เทียบกับ antibiosis - : antifungus - และ disc ที่หุบสารละลาย 0.5 % DMSO ที่ทำให้แห้งแล้ว พบว่าการเปลี่ยนไปของลักษณะเส้นใยราโรคพืชเมื่อทดสอบกับสารสกัด สอดคล้องกับระดับ antibiosis ราเอนโดไฟท์ที่มีผล antibiosis ดี (BUEN 830 และ BUEN 836) จะพบลักษณะที่เปลี่ยนไปของเส้นใยหลากหลายลักษณะและรุนแรงกว่าราเอนโดไฟท์ที่มีผล antibiosis อ่อน (ตาราง 21 และภาพที่ 30)

ตารางที่ 21 ลักษณะเส้นใยของราโรคพืชได้กลี้องจุลทรรศน์ที่แสดงลักษณะต่างๆเมื่อทดสอบกับสารสกัดจากราเอนโดไฟท์

ลักษณะ ปฏิสัมพันธ์	สารสกัด	ราโรคพืช	ระดับ antibiosis/ ผลสารสกัด	ลักษณะเส้นใย เมื่อทดสอบ กับสารสกัด
-	0.5% DMSO	<i>C. gloeosporioi</i> des, <i>F. subglutinans</i> , <i>Pestalotiopsis</i> sp.		การแตกกิ่งปลายยอด เล็กน้อย (เป็นลักษณะที่พบ ได้ในเส้นใยปกติ)
antibiosis - antifungus +	835 SBBdw 14d	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	- / +	ปลายเส้นใย มีปุ่มปม มากมาย มีการแตกกิ่งปลาย ยอดผิดปกติ และหยิกงอ
antibiosis + antifungus -	803 LNBdw 14d	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	1+/-	ปลายเส้นใย และมีปุ่มปม ละมีการสลายตัวของ โปรโตพลาสขนาดเล็กน้อย
	830 PDBdw 14d	<i>C. gloeosporioides</i>	4+/1+	ปลายเส้นใยโป่งพอง มีปุ่ม ปม มีการสลายตัวของ โปรโตพลาสมากมาย พบเส้นใยแตกสลายและ ขาดหลุดออก
antibiosis + antifungus +	830 PDBdw 14d	<i>F. subglutinans</i>	3+/2+	ปลายเส้นใยโป่งพอง มีการสลายตัวของ โปรโตพลาสมากมาย พบเส้นใยแตกสลายและ ขาดหลุดออก
	836 YMGdw 14d	<i>C. gloeosporioides</i>	4+/1+	ปลายเส้นใยโป่งพอง มากมาย มีการสลายตัว ของโปรโตพลาสมากมาย



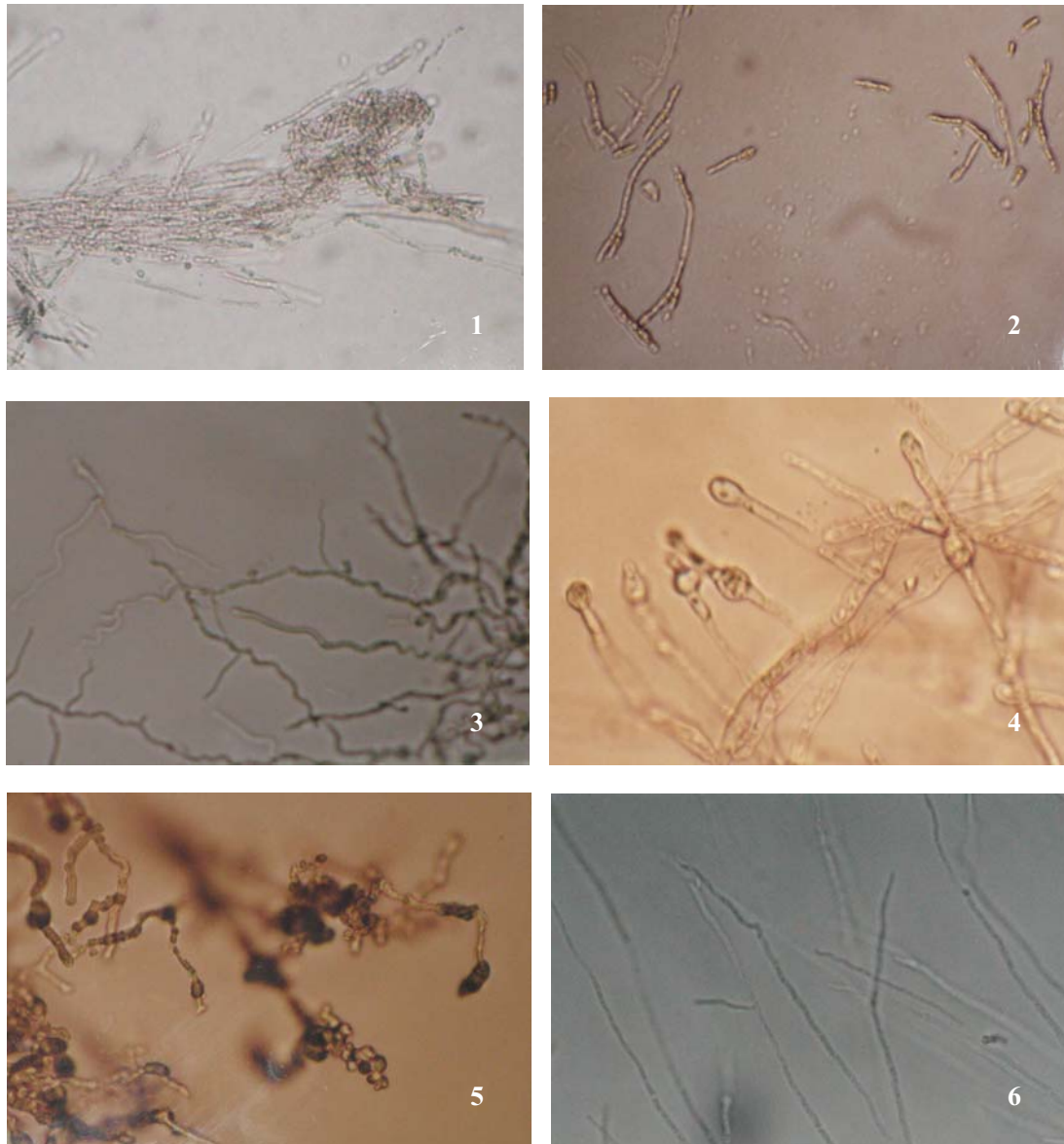
ภาพที่ 30 ลักษณะปลายเส้นใยที่เปลี่ยนไปของปลายเส้นใยราโรคพืชเมื่อสัมผัสกับสารสกัดที่เตรียมจาก เอนโดไฟท์ 1: ปลายเส้นใยที่มีการแตกกิ่งปลายยอดผิดปกติ และหยิกงอของ *Pestalotia* sp. เมื่อทดสอบ กับสารสกัด 835 SBdw 14d; 2: ปลายเส้นใยที่แตกสลายและขาดหลุดออก ของ *F. subglutinans* เมื่อ ทดสอบกับสารสกัด 830 PDBdw14d; 3: ปลายเส้นใยที่โป่งพองมากมาย ของ *C. gloeosporioides* เมื่อ ทดสอบกับสารสกัด 836 YMGdw 14d; 4, 5,6 ปลายเส้นใยของ *Pestalotia* sp, *F. subglutinans*. และ *C. gloeosporioides* เมื่อทดสอบกับ disc ที่ทำให้แห้งแล้วหลังจากชุบสารละลาย 0.5% DMSO

4. การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะเส้นใยใต้กล้องจุลทรรศน์กับผล antibiosis ใน dual culture และผลการทดสอบกับสารสกัด

เนื่องจากในหลายกรณีพบว่าผลยับยั้งของสารสกัดของราเอนโดไฟท์ ไม่สอดคล้องกับผล antibiosis จึงทำการศึกษาลักษณะเส้นใยราโรคพืชใน dual culture โดยนำรา BUEN 830 และ BUEN 836 ที่ผลปฏิสัมพันธ์และผลการทดสอบสารสกัดแตกต่างกัน 2 ลักษณะ คือ antibiosis + : antifungus + และ antibiosis + : antifungus - มาตรวจดูลักษณะที่เปลี่ยนไปของปลายเส้นใยของราโรคพืช ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เทียบกับสารละลายควบคุม ปรากฏว่าพบเมื่อ ผล antibiosis เป็นบวก ราโรคพืชส่วนใหญ่จะพบลักษณะการเปลี่ยนแปลงเส้นใยใต้กล้องจุลทรรศน์อย่างชัดเจน โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อทดสอบ BUEN 836 กับ *C. gloeosporioides* และ *Pestalotiopsis* sp. (ตาราง 22 และภาพที่ 31)

ตารางที่ 22 ลักษณะเส้นใยของราโรคพืชใต้กล้องจุลทรรศน์เมื่อเลี้ยงร่วมกับราเอนโดไฟท์ BUEN 830 และ BUEN 836 ใน dual culture

เอนโดไฟท์	ราโรคพืช	ระดับ antibiosis / ผลสารสกัด	ลักษณะเส้นใย
-	<i>C. gloeosporioides</i> , <i>F. subglutinas</i> , <i>Pestalotiopsis</i> sp.	-	ปกติ
BUEN 830	<i>C. gloeosporioides</i>	4+/1+ (830 PDBdw 14d)	ปลายเส้นใยโป่งพองเล็กน้อยและ สูญเสียโปรโตพลาสตามกลาง เส้นใยปลายยอดแตกสลาย
BUEN 830	<i>F. subglutinans</i>	3+/2+ (830 PDBdw 14d)	ปานกลาง
BUEN 830	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	1+/- (830 PDBdw 14d)	ปลายเส้นใยหยิกงออย่างมาก
BUEN 836	<i>C. gloeosporioides</i>	4+/1+ (836 YMGdw 14d)	ปลายเส้นใยโป่งพองเป็นปุ่มปม มากมาย
BUEN 836	<i>F. oxysporum</i>	3+/- (836 YMGdw 14d)	ปกติ
BUEN 836	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	3+/- (836 SBdw 14d)	ปลายเส้นใยหยิกงอและโป่งพอง เป็นปุ่มปมมากมาย



ภาพที่ 31 ลักษณะปลายเส้นใยที่เปลี่ยนไป ของปลายเส้นใยราโรคพืชเมื่อเลี้ยงร่วมกับราเอนโดไฟท์
 1: *C. gloeosporioides* สร้าง rhizomorph เมื่อเลี้ยงร่วมกับ BUEN 830; 2: เส้นใยที่แตกสลายของ *F. subglutinans* เมื่อเลี้ยงร่วมกับ BUEN 830; 3: ปลายเส้นใยหยิกงอของ *Pestalotiopsis* sp. เมื่อเลี้ยงร่วมกับ BUEN 830; 4: ปลายเส้นใยโป่งพองของ *C. gloeosporioides* เมื่อเลี้ยงร่วมกับ BUEN 836; 5: ปลายเส้นใยตายมีสีเข้มขึ้นของ *Pestalotiopsis* sp. เมื่อเลี้ยงร่วมกับ BUEN 836; 6: เส้นใยปกติ

5. การยับยั้งการงอกของสปอร์ราโรคพืชของสารสกัดจากราเอนโดไฟท์

จากการเตรียมสารสกัดจากรา เอนโดไฟท์ ที่หมักในอาหารเหลว LNA_{dw} เป็น เวลา 7 วัน และ 14 วัน นำสารสกัดมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการงอกของสปอร์ราโรคพืชกลุ่มอะนามอร์ฟ 2 ชนิดคือ *F. oxysporum* และ *F. subglutinans* ผลการศึกษาไม่พบว่าสารสกัดจาก เอนโดไฟท์ ทดสอบ ให้ผลบวกทั้งกับ *F. oxysporum* และ *F. subglutinans* (ตารางที่ 23)

ตารางที่ 23 การยับยั้งการงอกของสปอร์ของราโรคพืชของสารสกัดจากราเอนโดไฟท์

สารสกัด*	ระยะเวลาเลี้ยงรา	การงอกของสปอร์	
		<i>F. oxysporum</i>	<i>F. subglutinans</i>
802 PDB _{dw}	7 วัน	+	+
	14 วัน	+	+
803 PDB _{dw}	7 วัน	+	+
	14 วัน	+	+
805 PDB _{dw}	7 วัน	+	+
	14 วัน	+	+
829 PDB _{dw}	7 วัน	+	+
	14 วัน	+	+

หมายเหตุ + = มีสปอร์งอก

PDB = potato dextrose broth, dw = distilled water

6 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมของการเตรียมสารสกัดจาก *Colletotrichum* sp. BUEN 830

ทำการหมัก *Colletotrichum* sp. BUEN 830 ใน PDB_{dw} เป็นระยะเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน สกัดด้วยสารละลายเอทานอล-เอธิลอะซีเตท เพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการยับยั้งราโรคพืช พบว่า เฉพาะสารสกัด BUEN 830- PDB_{dw} ที่หมักเป็นเวลา 7 วัน และ 14 วัน สามารถยับยั้ง ราโรคพืชที่ทำการทดสอบคือ *C. gloeosporioides* ได้ในระดับอ่อน (1+) ส่วนสารสกัดที่สกัดจากราเดียวกันที่เลี้ยง 21 และ 28 วัน ไม่ยับยั้ง *C. gloeosporioides* (ไม่ได้แสดงข้อมูลในที่นี้)

บทที่ 6

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

ราทะเลเกือบทุกสายพันธุ์คือ 63 สายพันธุ์ จากทั้งหมด 65 สายพันธุ์ (96.9%) สามารถยับยั้งการเจริญราโรคพืชชนิดใดชนิดหนึ่งใน dual culture และส่วนใหญ่ (41.5%) สามารถยับยั้งการเจริญราโรคพืชทั้ง 5 ชนิดที่ทำการศึกษาร 20 สายพันธุ์ยับยั้งราโรคพืชได้ดี มีระดับ antibiosis 3+ - 4+ (ระยะยับยั้ง > 6 มิลลิเมตร) อย่างน้อยกับรา 4 ชนิด บ่งชี้ว่ามีการสร้างเมตาบอไลต์บางชนิดออกมายับยั้งราโรคพืช (Dix and Webster, 1995) ยืนยันให้เห็นถึงศักยภาพของราทะเลในฐานะแหล่งของสารยับยั้งราโรคพืชที่สำคัญ ดังเช่นที่มีรายงานไว้ในการศึกษาแหล่งของราทะเล ในการผลิตสารออกฤทธิ์ประเภทต่างๆ (Proksch *et al.*, 2010) ลักษณะความสามารถในการยับยั้งการเจริญราโรคพืชพร้อมกันหลายชนิด อาจเป็นไปได้ที่เป็นลักษณะพันธุกรรม ที่เป็นผลมาจากการปรับตัวในสิ่งแวดล้อมเป็นเวลานาน ดังเช่นการพบพลาสมิดในราทะเล *Lulworthia* ที่สามารถเจริญในที่ที่มีสารประกอบ hydrocarbon (Baisden and Cooney, 1996) นอกจากการควบคุมระดับยีนแล้ว มีรายงานว่าในราบก ความสามารถในการสร้างสารยับยั้งราปรักษ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ถูกควบคุมด้วยอาหารและปัจจัยต่างๆ ในสภาวะแวดล้อม เช่น แสง อุณหภูมิ และ pH ซึ่งจะมีผลกระทบแตกต่างกันไป (Ouimet *et al.*, 1997) ในกรณีการศึกษานี้ พบว่าปัจจัยที่มีผลมากต่อราทะเล ได้แก่ความเค็มและความสมบูรณ์ของอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อขณะทดสอบ การยับยั้งราโรคพืชใน dual culture จะเกิดได้ดีบนอาหารที่เตรียมด้วยน้ำกลั่น และอาหารที่มีสารอาหารจำกัด (ในการศึกษานี้คือ LNA) การสร้างสารยับยั้งการเจริญราโรคพืชของราทะเลที่เลี้ยงในน้ำกลั่นมีรายงานก่อนหน้านี้ (Abbanant *et al.*, 1998; Motti *et al.*, 2007) เนื่องจากในน้ำทะเล ราต้องใช้พลังงานส่วนหนึ่งไปในการสร้างสารควบคุมแรงดันออสโมซิส ทำให้ประสิทธิภาพในการสร้างเมตาบอไลต์ลดลง (Bugni and Ireland, 2004) แต่ในรายงานเดียวกันมีรายงานว่าอาหารที่มีน้ำทะเล 20-60% ช่วยเพิ่มการผลิตเมตาบอไลต์ ของ marine derived fungi ขณะที่ *Aspergillus niger* สายพันธุ์ที่แยกได้จากระบบนิเวศทางทะเลยับยั้งราปรักษ์ได้น้อยสุดในอาหารที่มีน้ำทะเล 40-60% Gallo *et al.*, (2004), Yamada (2004) และ San-Martin *et al.* (2008) ใช้อาหารที่เตรียมจากน้ำทะเลในการหมักรากุ่มอะนามอร์ฟได้ดี เช่นเดียวกับที่พบว่ามีบางชนิดจากการศึกษานี้ซึ่งส่วนใหญ่เป็นกลุ่มอะนามอร์ฟให้ผลยับยั้งคืบหน้าอาหารที่เตรียมด้วยน้ำทะเล กรณีนี้อาจเป็นราบกที่ตกลงไปเจริญในน้ำทะเล จะเห็นว่าไม่สามารถทำนายได้ว่าน้ำกลั่นหรือน้ำทะเล จะสามารถส่งเสริมให้ราสายพันธุ์ที่กำลังศึกษายับยั้งปรักษ์ได้ดีที่สุด อย่างไรก็ตามจากผลที่ได้ในการศึกษานี้ควรพิจารณาอาหารที่เตรียมด้วยน้ำกลั่นเป็นทางเลือกลำดับแรก ในการคัดกรองราทะเล (obligate) ที่สามารถยับยั้งราปรักษ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

การขาดสารอาหารเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ antibiosis บนอาหารเกิดได้ดี ซึ่งน่าจะเนื่องจากสารอาหารต่ำจะทำให้เชื้อต้องแข่งขันแย่งอาหาร ทำให้ต้องมุ่งเจริญไปยังแหล่งอาหารใหม่อย่างรวดเร็ว

เส้นใยที่พบจึงมีลักษณะเส้นใยเล็กและแผ่บาง เป็นผลให้เมื่อต้องเผชิญหน้ากับราที่สร้างสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญ (antagonistic fungi) ใน dual culture จะสัมผัสกับสารที่ antagonistic fungi ผลิตออกมาได้มาก จึงเห็นผลการยับยั้งได้อย่างชัดเจน จากการศึกษาส่วนใหญ่ราที่ให้ผล antibiosis อ่อนจะให้ผลบวกเฉพาะบน LNA แต่เนื่องจากการเจริญของเส้นใยของราบน LNA ไม่นักเมื่อเทียบกับอาหารที่สมบูรณ์ในการสกัดสารออกฤทธิ์ LNA จึงไม่ใช่อาหารที่เหมาะสมในการคัดกรองราที่ผลิตสารออกฤทธิ์ แต่ควรเลือกใช้อาหารที่สมบูรณ์เช่น PDA, SBA และ YMG

ข้อมูล antibiosis กับการทดสอบราโรคพืชพร้อมกัน 4-5 ชนิด บนอาหารต่างๆ กัน สามารถนำมาใช้เป็นวิธีคัดกรองราทะเลที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งราโรคพืชได้ดี จากการศึกษาการคัดเลือกราทะเล 16 สายพันธุ์ ที่ให้ผล strong antibiosis มาทำการหมักและสกัดสารออกฤทธิ์ จะเห็นว่า ราทะเล 15 สายพันธุ์ ยกเว้น *Aigialus* like BUCS 004 ยับยั้งราโรคพืชได้ แต่ผลยับยั้งลดลงเมื่อเทียบกับผล antibiosis จาก dual culture

เมื่อพิจารณาสารอาหารที่เหมาะสมในการนำมาเลี้ยงราทะเลเพื่อเตรียมสารสกัด โดยใช้ผลของ antibiosis เป็นหลัก พบว่าผลไม่สอดคล้องกันหลายกรณี ราทะเลที่เลี้ยงเพื่อเตรียมสารสกัดใน LNB จะเจริญช้า ซึ่งอาจส่งผลให้มีเชื้อที่ผลิตสารยับยั้งน้อย รวมทั้งแหล่งไนโตรเจนที่มีอยู่จำกัดอาจทำให้ราผลิตสารออกฤทธิ์ได้น้อย สารสกัดที่เตรียมได้จึงให้ผลยับยั้งไม่นัก จากการศึกษาได้ทดลองเตรียมสารสกัดจากราทะเล *Leptosphaeria peruviana* BUCS 002 ที่เลี้ยงใน LNB เทียบกับ PDB พบว่า สารสกัดจากราทะเลที่เลี้ยงใน LNB ให้ผลยับยั้งการเจริญไม่ดีเท่าราที่เลี้ยงใน PDB จึงได้เตรียมสารออกฤทธิ์จาก rich medium โดยเฉพาะอย่างยิ่ง PDB เป็นหลัก เช่นเดียวกับที่ปรากฏในรายงานอื่นๆ (Oh *et al.* 1999; Mabrouk *et al.* 2008; Abdel-Wahub *et al.* 2007; Abbanat *et al.* 1998)

สารออกฤทธิ์ชีวภาพที่สกัดได้ส่วนใหญ่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของราเพียงอย่างเดียว มีเพียงสารสกัดจากราทะเล *Saagaromyces ratnagiriensis* BUCS 032-2 และ สารสกัดจาก *Astrosphaeriella striatispora* BUCS 055-1 ยับยั้ง *F. oxysporum* ได้ แต่ทั้งสารสกัดจาก *S. ratnagiriensis* BUCS 032-1 และ BUCS 032-2 รวมถึงสารสกัดจากราทะเล *Astrosphaeriella striatispora* BUCS 055-1 ยับยั้งการออกสปอร์ของราโรคพืชที่ทำการทดสอบ *F. subglutinans* ไม่ได้ด้วย ราทั้ง 3 ชนิดนี้สร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญราโรคพืชที่ทดสอบได้ทั้ง 5 ชนิด แสดงให้เห็นว่าน่าจะจะสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ได้หลากหลาย ซึ่งเป็นประโยชน์ในการนำมาใช้ในการควบคุมทางชีวภาพ เนื่องจากจะทำอันตรายสิ่งแวดล้อมน้อยกว่าการใช้สาร fungicide ซึ่งส่วนใหญ่ออกฤทธิ์จำเพาะกับราโรคพืชแต่ละชนิด ทำให้ต้องใช้หลายๆชนิดร่วมกัน (Edgington *et al.* 1980) การตรวจพบลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไปของเส้นใยบริเวณปลายยอดที่สัมผัสกับสารสกัดที่สกัดจากราทะเล สนับสนุนการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิดพร้อมๆกัน นอกเหนือจากเอนไซม์ซึ่งเป็น primary metabolite ที่ส่งออกมาทำลายผนังเซลล์ เนื่องจากพบการเปลี่ยนแปลงหลากหลายลักษณะพร้อมๆกัน ตั้งแต่ระดับอ่อนถึงระดับรุนแรง ลักษณะที่พบได้บ่อย

ได้แก่การสูญเสียโปรโตพลาสซึม ตั้งแต่สูญเสียบางส่วนถึงสูญเสียโปรโตพลาสซึมทั้งหมด การแตกสลายของผนังเซลล์เฉพาะบริเวณปลายยอด หรือแตกสลายเป็นบริเวณกว้าง รวมถึงการแตกกิ่งออกเป็น 2 แฉก 3 แฉกจนถึงเป็นพุ่มและการสร้าง rhizomorph เพื่อด้านสารยับยั้ง ลักษณะการแตกสลายของเส้นใยหรือองค์ประกอบของเส้นใยของราที่มีต้นเหตุจากสารสกัด เป็นผลจากกลไกที่คล้ายคลึงกับที่มีรายงานในสารออกฤทธิ์ที่เป็นสารระเหยประเภท terpenes ของราว่า สารนี้เป็นสาเหตุให้ผนังเซลล์ฉีกขาด มีรูรั่ว (Lancotti *et al.*, 2004) มีผลให้ราเสียองค์ประกอบและไอออนต่างๆ ภายในเซลล์จึงถูกทำลายไปในที่สุด

เมื่อเปรียบเทียบระยะเวลาการหมักเชื้อเพื่อเตรียมสารสกัด ระหว่าง 14 วัน และ 28 วัน ให้ผลไม่แตกต่างกันมากนัก อย่างไรก็ตาม ไม่พบว่าราที่หมัก 28 วัน ได้ผลดีกว่า ขณะที่ราบางสายพันธุ์ที่การหมักที่ 14 วัน ให้ผลสารสกัดดีกว่า ดังนั้นหากไม่ทราบระยะเวลาที่เหมาะสมของราทะเลสายพันธุ์ที่กำลังศึกษาหรือในการศึกษากลุ่มราที่เป็นราทะเล การเลือกระยะเวลาหมัก 7-14 วันน่าจะเป็นระยะเวลาที่เหมาะสมในการคัดกรองราทะเลที่สร้างสารยับยั้งราโรคพืช ผลจากการคัดเลือกราทะเล *S. ratnagiriensis* BUCS 032-2 และ *Aigialus* like BUCS 004 มาศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเตรียมสารสกัดแสดงให้เห็นว่า สารสกัดที่เตรียมจากราที่เลี้ยงเป็นระยะเวลาสั้น ๆ (7-14 วัน) ให้ผลดีกว่าราที่เลี้ยงเป็นเวลานาน

การศึกษารายับยั้งราโรคพืชของเอนโดไฟต์ในลักษณะเดียวกับราทะเล ให้ผลแตกต่างจากราทะเลในหลายลักษณะ ราเอนโดไฟต์ 83.3 % สามารถแสดงผล antibiosis เมื่อเลี้ยงร่วมกับราโรคพืชชนิดใดชนิดหนึ่ง ส่วนใหญ่แสดงผลระดับอ่อนถึงปานกลาง และมีเพียง 5 สายพันธุ์จาก 36 สายพันธุ์ (13.9%) คือ สายพันธุ์ BUEN 829, BUEN 830, BUEN 832, BUEN 834 และ BUEN 836 แสดงผล strong antibiosis เมื่อเลี้ยงร่วมกับราโรคพืชได้ทุกชนิด บ่งชี้ว่าน่าจะมีการสร้างเมตาบอไลต์ออกมายับยั้งราโรคพืชได้เช่นเดียวกับราทะเล ราเอนโดไฟต์ในป่าชายเลนมีลักษณะก้ำกึ่งระหว่างรากับและราทะเล รากลุ่มนี้ในบางกรณีถูกจัดให้เป็นกลุ่มหนึ่งของราทะเล (Proksch *et al.*, 2010) ซึ่งน่าจะเป็นการจัดเนื่องจากแหล่งที่อยู่ ประกอบกับมีรายงานว่าพืชในป่าชายเลนมีคุณสมบัติพิเศษคือสามารถเก็บเกลือไว้ที่ส่วนใบ ทำให้ราที่อาศัยอยู่ต้องมีการปรับตัวให้เข้ากับความเป็นกรดในหลายประการ (Kathiresan and Bringham, 2001) และมีรายงานว่าสารที่ผลิตขึ้นมีโครงสร้างทางเคมีแตกต่างจากราก ส่วนสมมุติฐานว่าราเอนโดไฟต์ในป่าชายเลนเป็นรากับ มาจากการพบว่าสารที่ผลิตขึ้นมีความหลากหลายมากกว่าสารจากราทะเล (Jensen and Fenical, 2002) ราที่พบส่วนใหญ่เป็นราอะนาโมอร์ฟที่ไม่สร้างสปอร์รวมทั้งราที่พบได้ทั่วไปในดิน กลุ่มเด่นๆได้แก่ *Aspergillus*, *Penicillium* และ *Trichoderma* (Jones *et al.*, 2008) หลายชนิดเป็นชนิดเดียวกับราที่ก่อโรคในพืช เช่น *Alternaria*, *Colletotrichum* หรือ *Phomopsis* (Kumaresan and Suryanarayanan, 2001) รองลงมาเป็นจึงเป็นกลุ่มของ coelomycete และ ascomycete ในขณะที่ราทะเลส่วนใหญ่เป็นรา ascomycete

จากการศึกษาจะเห็นว่าราเอนโดไฟท์ไม่มีรูปแบบการยับยั้งราโรคพืช พร้อมกันหลายๆชนิดสูงซึ่งต่างจากราทะเล อาจเกิดจากในเนื้อเยื่อพืชมีอาหารสมบูรณ์กว่าในทะเลจึงไม่ต้องแข่งขันสูงเท่ากับราทะเล ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ มีผลต่อความสามารถในการยับยั้งราโรคพืชของเอนโดไฟท์ในใบพืช ขยายเลนค่อนข้างมากเมื่อเทียบกับราทะเล ราหลายสายพันธุ์ที่ให้ผล strong antibiosis ดิบนาอาหารชนิดหนึ่งไม่จำเป็นต้องแสดงผลดี antibiosis บนอาหารชนิดอื่น ผลที่ได้นี้สอดคล้องกับผลจากการทดสอบ สารสกัด เห็นได้ว่าเมื่อเปลี่ยนชนิดอาหารที่ใช้หมัก ความสามารถในการยับยั้งราโรคพืชของสารสกัดอาจเปลี่ยนไปอย่างชัดเจน ซึ่งทำให้การคัดกรองราเอนโดไฟท์ที่น่าจะสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญราโรคพืชโดยวิธี antibiosis มาเตรียมสารสกัด ต้องคำนึงถึงอาหารที่เหมาะสมในการหมักราเอนโดไฟท์ แต่ละสายพันธุ์ในการเตรียมสารสกัด

การทดสอบการยับยั้งราโรคพืชของสารสกัดจากราเอนโดไฟท์ให้ผลไม่ชัดเจน เมื่อเทียบกับราทะเล แม้ว่าเมื่อทดสอบกับราโรคพืชทั้ง 5 ชนิด ราเอนโดไฟท์ BUEN 829 และ BUEN 830 จะเป็นราที่ให้ผล strong antibiosis บนอาหารส่วนใหญ่ก็ตาม ซึ่งเป็นไปได้ว่าสารออกฤทธิ์ชีวภาพจากราเอนโดไฟท์ให้ผลยับยั้งไม่รุนแรงเท่าราทะเล และอาจเป็นสารคนละประเภทกันตามที่มีผู้รายงานไว้ แต่จากการศึกษา ลักษณะที่เปลี่ยนไปได้กล้องจุลทรรศน์ของเส้นใยราโรคพืช ที่เลี้ยงร่วมกับราเอนโดไฟท์ BUEN 830 และ BUEN 836 ใน dual culture หรือเมื่อทดสอบกับสารสกัด พบลักษณะการเปลี่ยนแปลงของเส้นใยที่รุนแรงและชัดเจน แม้ในกรณีของ BUEN 836 ที่ผลการทดสอบกับสารสกัดเป็นลบ การเปลี่ยนแปลงที่พบมีหลากหลายลักษณะพร้อม ๆ กันทั้งลักษณะเดียวกับที่พบในราทะเลและที่แตกต่างออกไป ตั้งแต่ระดับอ่อนถึงระดับรุนแรง ลักษณะที่พบได้บ่อยได้แก่ การสูญเสียโปรโตพลาสตั้งแต่สูญเสียบางส่วนถึงสูญเสียโปรโตพลาสทั้งหมด การแตกสลายของผนังเซลล์เฉพาะบริเวณปลายยอด หรือแตกสลายเป็นบริเวณกว้าง การหยิกงอหรือการเปลี่ยนแปลงลักษณะเส้นใยไปจากเดิมอย่างผิดปกติที่เห็นได้ชัด เป็นต้น

การยับยั้งการเจริญราโรคพืชจากการสร้างสารยับยั้ง (antibiosis) มี 2 ลักษณะ คือยับยั้งการเจริญและยับยั้งการงอกของสปอร์ สารยับยั้งที่มีรายงานอาจเป็นสารปฐมภูมิ (primary metabolites) หรือสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) สารปฐมภูมิมักเป็นเอนไซม์ประเภทต่างๆ เอนไซม์ที่ยับยั้งการเจริญของราคือเอนไซม์ไคตินเอส (Vyas and Deshpande, 1989) ส่วนสารออกฤทธิ์ที่ราหรือจุลินทรีย์อื่น ๆ ผลิตขึ้นเป็นสารทุติยภูมิ ซึ่งมีโครงสร้างทางเคมีต่างๆ กัน ส่วนใหญ่เป็นสารประเภทไม่มีขั้วหรือมีขั้วอ่อน (AMN-Hazalin *et al.*, 2009) ในระดับแตกต่างกัน สามารถสกัดออกมาได้โดยใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วเหมาะสม ซึ่งส่วนใหญ่นิยมใช้ ethyl acetate หรือในการศึกษานี้ใช้ร่วมกันระหว่าง ethanol และ ethyl acetate เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดให้ได้สารออกฤทธิ์ชีวภาพ สารที่มีโครงสร้างทางเคมีคล้ายกัน จะมีคุณสมบัติคล้ายกัน และส่วนใหญ่ถูกผลิตขึ้นจากจุลินทรีย์ชนิดเดียวกัน สารที่ผลิตมาใช้ควบคุมจุลินทรีย์เมื่อใช้ไปนานๆ สามารถกระตุ้นให้จุลินทรีย์สร้างกลไกต่างๆ ให้เกิดการทนหรือดื้อต่อสารนั้น ทำให้จำเป็นต้องมีการหาสารชนิดใหม่ๆ จากจุลินทรีย์ชนิดใหม่อยู่เสมอ (Schulz *et al.*, 2002) แหล่งของ

จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารใหม่จำเป็นต้องมาจากแหล่งที่ต่างจากที่ค้นหายุคเดิม และควรมีลักษณะพิเศษที่เอื้อให้จุลินทรีย์สร้างสารเมตาบอไลต์ได้ดี เช่นมีสภาวะแวดล้อมที่จุลินทรีย์ต้องมีการแข่งขันสูง หรือต้องมีการปรับตัวเข้ากับสิ่งแวดล้อมสูง (Schulz *et al.*, 2002)

Astrosphaeriella striatispora BUCS 055-1 ซึ่งให้ผลยับยั้งการเจริญราโรคพืชทั้ง 5 ชนิดและยับยั้งการสร้างสปอร์ของ *F. oxysporum* และ *F. subglutinans* ได้นั้น เป็นราที่แยกมาจากดินจากในป่าชายเลน ซึ่งเป็นแหล่งที่อยู่ของราทะเลที่มีรายงานการศึกษาผลิตสารออกฤทธิ์ชนิดใหม่น้อยมาก และยังไม่มียางานการพบสารออกฤทธิ์ชีวภาพในราชนิดนี้ และเนื่องจากรานี้รวมทั้งสารสกัดสามารถยับยั้งราโรคพืชได้ดี เป็นไปได้ว่ารานี้อาจสร้างสารออกฤทธิ์ที่ยังไม่มีผู้รายงานไว้ *Saagaromyces ratnagiriensis* เป็นราทะเล obligate อีกชนิดหนึ่งจากไม้ในป่าชายเลนที่อาจเป็นราที่สร้างสารชนิดใหม่ได้ เนื่องจากการทบทวนวรรณกรรมที่ผ่านมายังไม่พบรายงานสารที่ผลิต ส่วนราสายพันธุ์ BUCS 004 ที่เคยรายงานว่าเป็น *Aigialus* like จากการศึกษาทางพันธุศาสตร์เบื้องต้น พบว่าไม่ใช่ *Aigialus* แต่เป็นอะนามอร์ฟในกลุ่ม marine-derived fungi (ไม่ได้แสดงผลการจัดจำแนกสายพันธุ์ในการศึกษานี้)

ราเอนโดไฟท์ที่มีแนวโน้มว่าจะสามารถนำมายับยั้งราโรคพืชได้ดี ได้แก่ BUEN 829 BUEN 830 และอาจรวมถึง BUEN 836 เนื่องจาก ให้ผล strong antibiosis บนอาหารส่วนใหญ่ แต่ผลการยับยั้งการเจริญราโรคพืชของสารสกัดที่ได้ยังไม่ดีนัก ส่วนใหญ่ให้ผลระดับอ่อน หรือให้ผลไม่แน่นอน แต่เมื่อตรวจสอบเส้นใยได้กล้องจุลทรรศน์ เห็นการเปลี่ยนแปลงเส้นใยชัดเจน แสดงให้เห็นว่าการต่อสู้ยับยั้งแบบ antibiosis (dual culture) หรือ antifungus (คูผลของสารสกัด) นอกจากจะดูระยะยับยั้งแล้วในบางกรณีจะต้องดูผลต่อเส้นใยโดยตรง ดังนั้นการศึกษาและควบคุมสภาวะที่ใช้เลี้ยงและเตรียมสารสกัดอย่างเป็นระบบจึงมีความจำเป็น เช่นการทดลองใช้อาหารหลายชนิดทั้งอาหารเหลว อาหารกึ่งแข็ง และอาหารแข็งดังที่พบในรายงานอื่น ๆ (Krohn, *et al.*, 2003; Istifadah, *et al.* 2006; Aly *et al.*, 2008) การเปลี่ยนจากน้ำกลั่นมาใช้น้ำทะเลสัดส่วนต่างๆ กันในขั้นตอนการเลี้ยงในอาหารเหลวก่อนสกัดสาร หรือการเปลี่ยนวิธีการทดสอบการยับยั้งการเจริญจากวิธีที่ดัดแปลงจาก disc diffusion ที่ใช้ทดสอบแบคทีเรียมาเป็นวิธี broth หรือ agar dilution

เอนโดไฟท์ BUEN 829 แยกจากใบพังกาหัวสุ่มดอกขาว BUEN 830 และ BUEN 836 แยกได้จากใบโปรงแดง (*Ceriops tagal*) ซึ่งยังไม่มีรายงานการศึกษารเอนโดไฟท์ในพืชชนิดนี้ (BUEN 832, 834 และ 836 มีลักษณะโคโลนีเหมือนกัน และอาจเป็นเชื้อชนิดเดียวกัน) BUEN 829 และ BUEN 836 ขณะนี้ยังจัดจำแนกไม่ได้ BUEN 830 พบว่าเป็น *Colletotrichum* sp. สร้างสปอร์รูปเสี้ยวคล้าย *C. capsici*

ดังนั้น นอกจากการศึกษาสารสกัดแล้ว การศึกษา novel species หรือความหลากหลายของราใน marine environments รวมทั้งพืชจากป่าชายเลน ก็เป็นเรื่องน่าสนใจที่อาจนำไปสู่การค้นพบราชนิดใหม่ หรือสารออกฤทธิ์ชีวภาพชนิดใหม่

เอกสารอ้างอิง

- บุญชนะ กลั่นคำสอน และธงชัย จารุพัฒน์. 2530. การศึกษาสภาพความเปลี่ยนแปลงพื้นที่ป่าชายเลนในประเทศไทยโดยใช้ภาพถ่ายจากดาวเทียม. กองจัดการป่าไม้ กรมป่าไม้. กรุงเทพฯ. ศศิธร วุฒิวิชัย. 2545. โรคของผักและการควบคุมโรค. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 173 หน้า.
- สนธิ อักษรแก้ว. 2541. ป่าชายเลน: นิเวศวิทยาและการจัดการ. (พิมพ์ครั้งที่ 2). คอมพิวเตอร์ แอดเวอร์ไทซิง. กรุงเทพฯ.
- วิสุทธิ ไบไม้. 2549. ทูทางธรรมชาติเพื่อการพัฒนาประเทศไทย. BRT Newsletter. 20, 4-11.
- อนุวัฒน์ นทีวัฒนา. 2551. พื้นที่คุ้มครองทางทะเลในประเทศไทย : เป้าหมายปี ค.ศ. 2010/2012 ภายใต้กฎหมายว่าด้วยความหลากหลายทางชีวภาพ. เอกสารเผยแพร่สำนักอนุรักษ์ทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง ฉบับที่ 35. กรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง. 239 หน้า.
- Abbanat, D., Leighton, M., Maiese, W., Jones, E.B.G., Pearce, C. and Greenstein, M. 1998. Cell wall active antifungal compounds produced by the marine fungus *Hypoxylon oceanicum* LL-15G256 I. Taxonomy and fermentation. The Journal of Antibiotics. 51, 296-302.
- Abdel-Wahab, M.A., Asolkar, R.N., Inderbitzin, P. and Fenical, W. 2007. Secondary metabolite chemistry of the marine derived fungus *Massarina* sp., strain CNT-016. Phytochemistry. 68, 1212-1218.
- Adams, P.B. 1990. The potential of mycoparasites for biological control of plant disease. Annual Review of Phytopathology. 28, 59-72.
- Adaskaveg, J.E. and Hartin, R.J. 1997. Characterization of *Colletotrichum acutatum* isolates causing anthracnose of almond and peach in California. Phytopathology. 87, 979-987.
- Addy, H.D., Piercey, M.M. and Currah, R.S. 2005. Microfungal endophytes in roots. Canadian Journal of Botany. 83, 1-13.
- Alam, M., Jones, E.B.G., Hossain, M.B. and Van der Heim, D. 1996. Isolation and structure of isoculmorin from the Marine fungus *Kallichroma tethys*. Journal of Natural Products. 59, 454-456.
- Aly, A.H., RuAngelie E.E., Wray, V., Müller, W.E.G., Kozytska, S., Hentschel, U. Proksch, P. and Ebel, R. 2008. Bioactive metabolites from the endophytic fungus *Ampelomyces* sp. isolated from the medicinal plant *Urospermum picroides*. Phytochemistry. 69, 1716-1725.

- AMN Hazalin, N., Ramasamy, K., Lim, S.M., Abdul Wahab, I., LJ Cole, A. and Abdul Majeed, A.B. 2009. Cytotoxic and antibacterial activities of endophytic fungi isolated from plants at the National Park, Pahang, Malaysia. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 9, 46-53.
- Arnold, A. E., Maynard Z. and Gilbert, G.S. 2001. Fungal endophytes in dicotyledonous neptropical trees: pattern of abundance and diversity. *Mycological Research*. 105, 1502-1507.
- Baisden, C.M. and Cooney, J.J. 1996. Screening marine fungi for plasmids and characteriation of a linear mitochondrial plasmid in a *Lulworthia* sp. *Mycologia*. 88, 350-357.
- Barghoon , E.S. and Linder, D.H. 1944. Marine fungi: their taxonomy and biology. *Farlowia*. 1, 395- 497.
- Besitulo, A.D., Sarma, V.V. and Hyde, K.D. 2002. Mangrove fungi from Siargao Island, Philippines. *In: Fungi in Marine Environments* (ed. K.D. Hyde), *Fungal Diversity Research Series*. 7, 293-315.
- Boonpragob, K. 2004. Lichens. *In: Thai Fungal Diversity*. (eds E.B.G. Jones, M. Tantichareon and K.D. Hyde), *BIOTEC Thailand*, 79-85.
- Boontim, N., Lumyong, S., Thongkantha, S. and Boontim, S. 2001. Study of endophytic fungi from native Thai bamboo capable of antibiotic production. *Journal of Multidisciplinary Research*. 14, 1566-1571.
- Bringmann, G., Lang, G, Steffens, D. Günther, E. and Schaumann, K. 2003. Evariquinone, isomericiellin, and stromemycin from a sponge derived strain of the fungus *Emericella variecolor*. *Phytochemistry*. 63, 427-443.
- Bugni, T. and Ireland C.M. 2004. Marine-derived fungi : a chemically and biologically diverse group of microorganisms. *Natural Product Reports*. 21, 143-163.
- Bu'lock, J.D. 1975. Secondary metabolism in fungi and its relationship to growth and development. *In: The filamentous fungi Vol. I Industrial Mycology*. (eds. J.E. Smith and D.R. Berry), Wiley, New York, 35-58.
- Carroll, G. 1988. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology*. 69, 2-9.
- Carroll, G.C. and Carroll, F.E. 1978. Studies on the incidence of coniferous needle endophytes in the Pacific Northwest. *Canadian Journal of Botany*. 56, 3034-3043.

- Chareprasert, S., Piapukiew, J., Thienhirun, S. Whalley, A.L.S and Sihanonth, P. 2006. Endophytic fungi of teak leaves *Textona grandis* L. and rain tree *Samanea saman* Merr. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 22, 481- 486.
- Chen, G., Lin, Y., Vrijmoed, L.L.P. and Fong, W.F. 2006. A new isochroman from marine endophytic fungus 1893#. Chemistry of Natural Compounds. 42, 138-141.
- Chen, G. Lin, Y., Wen, L., Vrijmoed, L.L P. and Jones, E.B.G. 2003. Two new metabolites of a marine endophytic fungus (No. 1893) from an estuarine mangrove on the South China Sea coast Tetrahedron. 59, 4907-4909.
- Christensen, M.J. 1996. Antifungal activity in grasses infected with *Acremonium* and *Epichloë* endophytes. Australasian Plant Pathology. 25, 186-191.
- Daferner, M., Anke, T. and Sterner, O. 2002. Zopfiellamides A and B, antimicrobial pyrrolidinone derivatives from the marine fungus *Zopfiella latipes*. Tetrahedron. 58, 7781-7784.
- Denoyes, B. and Baudry, A. 1995. Species identification and pathogenicity study of French *Colletotrichum* strains isolated from strawberry using morphological and cultural characteristics. Phytopathology. 85, 53-57.
- Dix, N.J. and Webster, J. 1995. Fungal Ecology. Chapman and Hall. London, UK.
- Dobranic, J.K., Johnson, J.A. and Alikhan, Q. R. 1995. Isolation of endophytic fungi from eastern larch (*Larix laricina*) leaves from New Brunswick, Canada. Canadian Journal of Botany. 41, 194-198.
- Edgington, V., Martin, R.A., Bruin, G.C. and Parsons, I.M. 1980. Systemic fungicides: A perspective after 10 years. Plant Disease. 64, 19-23.
- 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.
- Gao, S.S., Li, X.M., Du, F.Y., Proksch, P. and Wang, B.G. 2011. Secondary metabolites from a marine - derive endophytic fungus *Penicillium chrysogenum* QEN24S. Marine Drugs. 9, 59-70.
- Gloer, J.B. 1997. Application of fungal ecology in the search for new bioactive natural products *In*: The Mycota. Vol. IV. Environmental and Microbial Relationships (eds. D.T. Wicklow and B.E. Soderstrom), Springer-Verlag, New York, 249-268.

- Guan, S.H., Sattler, I., Lin, W.H., Guo, D.A. and Grabley, S. 2005. *p*-Aminoacetophenonic acids produced by a mangrove endophyte: *Streptomyces griseus* subsp. *Journal of Natural products*. 68, 1198-1200.
- Guerriero, A, D'Ambrosio, M., Cuomo, V. and Pietra, F. 2004. A novel, degraded polyketidic lactone, leptosphaerolide, and its likely diketone precursor, leptosphaerodione. isolation from cultures of the marine ascomycete *Leptosphaeria oraemaris* (Linderi). *Helvetica Chimica Acta*. 74, 1445-1450.
- Guo, B., Wang, Y., Sun, X. and Tang, K. 2008. Bioactive natural products from endophyte: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 44, 136-142.
- Hambleton, S. and Currah, R.S. 1997. Fungal endophytes from the roots of alpine and boreal Ericaceae. *Canadian Journal of Botany*. 75, 1570-1581.
- Hata, K. and Futai, K. 1996. Variation in fungal endophyte populations in needles of the genus *Pinus*. *Canadian Journal of Botany*. 74, 103-114.
- Hawksworth, D.L. 1991. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance and conservation. *Mycological Research*. 95, 641-655.
- Hawksworth, D.L. 2001. The Magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimated revised. *Mycological Research*. 105, 1422-1431.
- Hostettmann, K. and Marston, A. 1994. Search for new antifungal compounds from higher plants. *Pure and Applied Chemistry*. 66, 2231-2234.
- Hyde, K.D. 1988. The genus *Linocarpon* from the mangrove palm *Nypa fruticans*. *Transactions of the Mycological Society of Japan*. 29, 339-350.
- Hyde, K.D. 1992. Fungi from decaying intertidal fronds of *Nypa fruticans*, including three new genera and four new species. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 110, 95-110.
- Hyde, K.D. 2001. Increasing the likelihood of novel compound discovery from filamentous fungi. *In* : Bio-Exploitation of filamentous Fungi (eds. S.B. Pointing and K.D. Hyde), *Fungal Diversity Research Series*. 6, 77-91.
- Hyde, K.D., Sarma, V.V. and Jones, E.B.G. 2000. Morphology and taxonomy of higher marine fungi. *In*: *Marine Mycology-A Practical approach* (eds. K.D. Hyde and S.B. Pointing), *Fungal Diversity Research Series*. 1, 172-204.
- Hyde, K.D., Goh, T.K., Lu, B.S. and Alias, S.A. 1999. Eleven new intertidal fungi from *Nypa fruticans*. *Mycological Research*. 103, 1409-1422.

- Hyde, K.D., Jones, E.B.G., Leano, E., Pointing, S.B., Poonyth, A.D. and Vrijmoed, L.L.P. 1998. Role of fungi in marine ecosystem. *Biodiversity and Conservation*. 7, 1147-1161.
- Intana, W., Suwanno, T. and Chamswarnng, C. 2005. Use of antifungal metabolite from *Trichoderma virens* for controlling Chinese kale leaf spots caused by *Alternaria brassicicola* Walailuk Journal of Science and Technology. 2, 1-9.
- Istifadah, N., Saleeba, J.A. and McGee, P.A. 2006. Isolates of endophytic *Chaetomium* spp. inhibit the fungal pathogen *Pyrenophora tritici-repentis* in vitro. *Canadian Journal of Botany*. 84, 1148-1155.
- Jensen, P.R. and Fenical, W. 2002. Secondary metabolites from marine fungi. *In: Marine Environments* (ed. K.D. Hyde), Fungal Diversity Research Series. 7, 293-315.
- Jeffries, P., Dodd, J.C., Jeger, M.J. and Plumbley, R.A. 1990. The biology and control of *Colletotrichum* species on tropical fruit crops. *Plant pathology*. 39, 343-366.
- Jones, E.B.G. 1995. Ultra structure and Taxonomy of the aquatic ascomycetous order Halosphaeriales. *Canadian Journal of Botany*. 73 (suppl.), 5790-5801.
- Jones, E.B.G. and Alias, A. 1997. Biodiversity of mangrove fungi. *In: Biodiversity of tropical microfungi* (ed. K.D. Hyde), Hong Kong University Press, Hong Kong, 71-92.
- Jones, E.B.G. and Mitchell, J.I. 1996. Biodiversity of marine fungi. *In: Biodiversity. International Biodiversity Seminar* (eds. A. Cimerman and N. Gunde-Cimerman), National Institute of Chemistry and Slovenia National Commission for UNESCO, Ljubljana, Slovenia, pp 31-42.
- Jones, E.B.G., Stanley, S. J. and Umpava, P. 2008. Marine endophyte sources of new chemical natural products: a review. *Botanica Marina*. 51, 163-170.
- Jones, E.B.G., Tantichareon, M. and Hyde, K.D. 2004. Thai Fungal Diversity. BIOTEC Thailand, 281 p.
- Kathiresan, K. and Bringham, B.L. 2001. Biology of mangroves and mangrove ecosystems. *Advances in Marine Biology*. 40, 81-251.
- Kasettrathat, C., Ngamrojanavanich, N., Wiyakrutta, S., Mahidol, C., Puchirawat, S. and Kittakoop, P. 2008. Cytotoxic and antiplasmodials substances from marine-derived fungi, *Nodulisporium* CR1247-01. *Phytochemistry*. 69, 2621-2626.
- Kim, H.Y., Choi, G. J., Lee, H.B., Lee, S.W., Kim, H.K., Jang, K. S., Son, S.W., Lee, S.O, Cho, K.Y., Sung, N.D. and Kim, J.C. 2007. Some fungal endophytes from vegetable crops and their anti-oomycete activities against tomato late blight. *Letters in Applied Microbiology*. 44, 332-337.

- Kittakoop, P., Isaka, M., Rungrod, A., Tanticharoen, M. and Thebtaranonth, Y. 2002. Halorosellins A and B, unique isocoumarin glucosides from the marine fungus *Halorosellinia oceanica*. Royal Society Chemistry, Perkin Transactions. 1, 2473-2476.
- Kohlmeyer, J. and Kohlmeyer, E. 1979. Marine Mycology - The Higher Fungi. Academic Press, New York.
- Koitaishi, M. and Tsushima, S. 2007. Studies on biocontrol of air-borne plant disease by a filamentous fungus producing antifungal volatiles. JARQ. 41, 261-265.
- Krohn, K., Flörke, U., Rao M.S. Steingröver, K., Aust, H.J., Draeger, S. and Schulz, B. 2003. Metabolites from Fungi. 15. New isocoumarins from an endophytic fungus isolated from the Canadian thistle *Cirsium arvense*. Natural Product Research. 15, 353 – 361.
- Kumaresan, V. and Suryanarayanan, T.S. 2001. Occurrence and distribution of endophytic fungi in a mangrove community. Mycological Research. 105, 1388-1391.
- Lanciotti, R., Gianotti, A., Patrigani, F., Belletti, N., Guerzoni, M.E. and Gardini, F. 2004. Use of natural aroma compound to improve shelf life: and safety of minimally process fruits. Trends in Food Science and Technology. 15, 201-208.
- Lewis, F.J. 1924. An endotrophic fungus in the coniferae. Nature. 114, 860.
- Li, D.L., Li, X.M., Li, T.G., Dang, H.Y., Proksch, P. and Wang, B.G. 2008. Benzaldehyde derivatives from *Eurotium rubrum*, an endophytic fungus derived from the mangrove plant *Hibiscus tiliaceus*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin (Tokyo). 56, 1282-1285.
- Liberra, K., Jansen, R. and Inequist, U. 1998. A new phthalide derivative from the marine fungus *Corollospora maritima* Werderm. 1069 . Pharmazie. 53, 578-581.
- Lin, C., Lu, C. and Shen, Y. 2010. Three new 2-pyranone derivatives from mangrove endophytic actinomycete strain *Nocardiopsis* sp. A00203. Records of Natural Products. 4, 176-179.
- Lin, X., Huang, Y., Fang, M., Wang, J., Zheng, Z. and Su, W. 2005. Cytotoxic and antimicrobial metabolites from marine lignicolous fungi, *Diaporthe* sp. FEMS Microbiology Letters. 251, 53-58.
- Lin, Y.C., Wu, X., Deng, Z., Wang, J., Zhou, S., Vrijmoed, L.L.P., and Jones, E.B.G. 2002. The metabolites of the mangrove fungus *Verruculina enalia* No. 2606 from the mangrove lake in the Bahamas. Phytochemistry. 59, 469-471.

- Lin Z J, Lu, Z Y., Zhu T. J., Fang, Y.C., Gu, Q.Q and Zhu, W.M. 2008. Penicillenols from *Penicillium* sp. GQ-7, an endophytic fungus associated with *Aegiceras corniculatum*. Chemical Pharmaceutical Bulletin (Tokyo). 56, 217-221.
- Lin, Z.J., Zhang, G.J., Zhu, T.J., Liu, R., Wei, H.J. and Gu, Q.Q. 2009. Bioactive cytochalasins from *Aspergillus flavipes*, an endophytic fungus associated with the mangrove plant *Acanthus ilicifolius*. Helvetica Chimica Acta. 92, 1538-1544.
- Liu, C.H., Zou, W. X., Lu, H. and Tan, R.X. 2001. Antifungal activity of *Artemisia annua* endophyte cultures against phytopathogenic fungi. Journal of Biotechnology. 88, 277-282.
- Lorbeer, J.W. 1996. Synergism, antagonism, and additive action of fungicides in mixtures. 1996. Phytopathology. 86, 1261-1262.
- Lu, Z., Wang, Y., Miao, C. Liu, P., Hong, K. and Zhu, W. 2009. Sesquiterpenoids and benzofuranoids from the marine-derived fungus *Aspergillus ustus* 094102. Journal of Natural Products. 72, 1761-1767.
- Lumyong, S., Lumyong, P. and Hyde, K.D. 2004. Endophytes In: Thai Fungal Diversity. (eds. E.B.G. Jones, M. Tantichareon and K.D. Hyde), BIOTEC Thailand, 197-205.
- Mabrouk A.M., Kheiralla, Z.H., Hamed, E.R., Youssry, A.A. and Abd El Aty, A.A. 2008. Production of some biological active secondary metabolites from marine-derived fungus *Vericosporina ramulosa*. Malaysian Journal of Microbiology. 41, 14-28.
- Menzies, J.G., Koch, C. and Seywerd, F. 1990. Addition to the host range of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. Plant disease. 74, 569-572.
- Miller, J.D. 2000. Screening for secondary metabolites In: Marine Mycology - A practical approach (eds. K.D. Hyde and S.B. Pointing), Fungal Diversity Research Series I, Fungal Diversity Press, Hong Kong, 158-171.
- 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. and Tapiolas, D.M. 2007. Screening marine fungi for inhibitors of the C₄ plant enzyme pyruvate phosphate dikinase: unguinol as a potential novel herbicide candidate. Applied and Environmental Microbiology. 73, 1921-1927.
- Nagai, K., Kamigiri, K., Masumoto, H., Kawano, Y., Yamaoka, M., Shimoi, H, Watanabe, M. and Suzuki, K. 2002. YM-202204, a new antifungal antibiotic produced by marine fungus *Phoma* sp. Journal of Antibiotics. 55, 1036-1041.

- Oh, H., Gloer, J.B. and Shearer, C.A. 1999. Massarinolins A-C: New Bioactive sesquiterpenoids from the aquatic fungus *Masarina tunica*. *Journal of Natural Products*. 62, 497-501.
- Ouimet, A., Carisse, O. and Neumann, P. 1997. Environmental and nutritional factors affecting the in vitro inhibition of the vegetative growth of *Venturia inaequalis* by five antagonistic fungi. *Canadian Journal of Botany*. 75, 632-639.
- Oxford, A.E., Raistrick, H. and Simonart, P. 1939. Studies on the biochemistry of microorganisms 60. Griseofulvin. C₁₇H₁₇O₆Cl. a metabolic product of *Penicillium griseofulvum* Dierckx. *Biochemical Journal*. 33, 340.
- Park, J.H., Choi, G.J., Lee, H.B., Kim, K.M., Jung, H.S., Lee, S.W., Jang, K.S. and Cho, K.Y., 2005. Griseofulvin from *Xylaria* sp. Strain F0010, and endophytic fungus of *Abies holophylla* and its antifungal activity against plant pathogenic fungi. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 15, 112-117.
- Pan, J.H., Jones, E.B.G., She, Z. G., Pang, J.Y. and Lin, Y.C. 2008. Review of bioactive compounds from fungi in the South China Sea. *Botanica Marina*. 51, 179-190.
- Pilantanapak, A. 2003. Ecological and Biological studies of marine fungi in Thailand. Ph.D. Thesis, University of Portsmouth, UK.
- Pilantanapak A, Jones, E.B.G., Eaton, E.A. 2005. Marine fungi on *Nypa fruticans* in Thailand. *Botanica Marina*. 48, 365-373.
- Platas, P., Peláez, F., Collado, J., Villuendas, G. and Diez, T. 1998. Screening of antimicrobial activities by aquatic hyphomycetes cultivated on various nutrient sources. *Cryptogamie. Mycologie*. 19, 33-43.
- Poch, G.K. and Gloer, J.B. 1989. Helicascolides A and B; New lactones from the marine fungus *Helicascus kanaloanus*. *Journal of Natural Products*. 52, 257-260.
- Pretini, O. 1991. Fungal endophytes of tree leaves. In : *Microbial Ecology of leaves*. (eds. J. Andrews and S. Hirano), Springer-Verlag, New York, 179-197.
- Proksch, P., Putz, A., Ortlepp, S., Kjer, J. and Bayer, M. 2010. Bioactive natural products from marine sponges and fungal endophytes. *Phytochemistry Reviews*. 9, 475-489.
- Qiang L.D., Hong-Jun, S., Hua-Jie, Z., Ji-Kai, L. 2005. Activity in vitro and in vivo against plant pathogenic fungi of grifolin isolated from the basidiomycete *Albatrellus dispansus*. *A Journal of Biosciences*. 60, 50-67.

- Rai, M. K. 1996. In vitro evaluation of medicinal plant extracts against *Pestalotiosis magiferae*. Hindustan antibiotic Bulletin. 38, 53-56.
- Ribeiro, R. de L. D. and Hagedorn, D.J. 1979. Screening for resistance to an pathogenic specialization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Phaseoli*, the causaul agents of bean yellows. Phytopathology. 69, 272-276.
- Rodriguez, K.F. and Petrini, O. 1997. Biodiversity of endophytic fungi in tropical regions. In : Biodiversity of tropical microfungi (ed. K.D. Hyde), Hong Kong University Press, Hong Kong, 57-69.
- Rodriguez, R.J., White, J.E., Arnold, A.E. and Redman, R.S. 2009. Fungal endophytes: diversity and functional roles. New Phytologist. 182: 314-330.
- Saleem, M, Ali, M.S, Hussain, S., Jabbar, A., Ashraf, M. and Lee, Y. S. 2007. Marine natural products of fungal origin. Natural Product Report. 24, 1142-1152.
- San-Martin, A., Orejarena S., Gallardo, C., Silva M., Becerra, J., Reinoso R., Chamy, M.C., Vergara, K. and Roviroso J. 2008. Sterols from the marine fungus *Geotrichum* sp. Journal of the Chilean Chemical Society. 53, 1377-1378.
- Sanago, S. and Pennypacker, S.P. 1997. Factors affecting sporogenic and myceliogenic germination of sclerotia of *Colletotrichum coccodes*. Plant Disease. 81, 333-336.
- Sakayaroj, J., Jones E.B.G., Chatmala, I. and Phongpaichit, S. 2004. Marine Fungi. In: Thai Fungal Diversity. (eds. E.B.G. Jones, M. Tantichareon and K.D. Hyde), BIOTEC Thailand, 107-117.
- Sanders, G.M. and Korsten, L. 2003. A comparative morphological study of South African avocardo and mango isolates of *Colletotrichum gloeosporioides*. Canadian Journal of Botany. 81, 877-885.
- Santisuk, T. 1983. Taxonomy and distribution of terrestrial trees and shrubs in the mangrove formations in Thailand. Natural History Bulletin of the Siam Society. 31, 63-91.
- Sarma, V.V. and Vittal, B.P.R. 2000. Biodiversity of mangrove fungi on different substrata of *Rhizophora apiculata* and *Avicennia* spp. from Godavari and Krishna deltas, East coast of India. Fungal Diversity. 5, 23-41.
- Schmeda-Hirschmann, G., Hormazabal, E., Astudillo, L., Rodriguez, J. and Theoduloz, C. 2005. Secondary metabolites from endophytic fungi isolated from the Chilean gymnosperm *Prumnopitys andina* (Lleuque). World Journal of Microbiology and Biotechnology. 21, 27-32.
- Schulz, B., Boyle, C., Draeger, S., Römmert, A.K. and Krohn, K. 2002. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. Mycological Research. 106, 996-1004.

- Shahi, S.K., Shukla, A.C., Dikshit, A. and. Uperti, D. K. 2001. Broad spectrum antifungal properties of the lichen *Heterodermia leucomela*. *The Lichenologist*. 33, 177-179.
- Shao, C., Wang, C., Zheng, C., She, Z., Gu, Y. and Lin, Y. 2010. A new anthraquinone derivative from the marine endophytic fungus *Fusarium* sp. (No. b77). *Natural Product Research*. 24, 81 – 85.
- Shearer, C.A. and Zare-Maivan, H. 1988. In vitro hyphal interactions among wood- and leaf- inhabiting ascomycetes and fungi imperfecti from freshwater habitats. *Mycologia*. 80, 31-37.
- Sieber, T.N. 1989. Endophytic fungi in twigs of healthy and diseased Norway spruce and white fir. *Mycological Research*. 103, 306-310.
- Snowdon, A.L. 1990. A color atlas of post-harvest disease and disorders fruit and vegetables. Vol. 1-2 CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.
- Somrithipol, S. 2004. Coprophilus Fungi. *In: Thai Fungal Diversity*. (eds. E.B.G. Jones, M. Tantichareon and K.D. Hyde), BIOTEC Thailand, 119-128.
- Somrithipol, S. And Hyde, K.D. 2004. Plant pathogens. *In: Thai Fungal Diversity*. (eds. E.B.G. Jones, M. Tantichareon and K.D. Hyde), BIOTEC Thailand, 207-212.
- Srinon, W., Chuncheen, K., Jirattiwarutkul, K., Soyong, K. and Kanokmedhakul, S. 2006. Efficacies of antagonistic fungi against *Fusarium* wilt disease of cucumber and tomato and the assay of its enzyme activity. *Journal of Agriculture Technology*. 2, 191-201.
- Stefani, F.O.P. and Bérubé, J.A. 2006. Biodiversity of foliar fungal endophytes in white spruce (*Picea glauca*) from Québec. *Canadian Journal of Botany*. 84, 777-790.
- Strobel, G.A. 2003. Endophytes as sources of bioactive products. *Microbe and Infection*. 5, 535-544.
- Suryanarayanan, T. S., Kumaresan, V. and Johnson, J.A. 1998. Foliar fungal endophytes from two species of the mangrove *Rhizophora*. *Canadian Journal of Microbiology*. 44, 1003-1006.
- Sutjaritvorakul, T., Whalley, A.L.S., Sihanonth, P. and Roengsumrun, S. 2011. Antimicrobial activity from endophytic fungi isolated from plant leaves in Dipterocarpous forest at Viengsa district Nan Province, Thailand. *Journal of Agricultural Technology*. 7, 115-121.
- Snyder, W.C. and Hansen, H.N. 1940. The species concept in *Fusarium*. *American Journal of Botany*. 27, 64-67.
- Than, P.P., Jeewon, R., Hyde, K.D., Pongsupasamit, S., Mongkolporn, O. and Taylor, P.W.J. 2008. Characterization and pathogenicity of *Colletotrichum* species associated with anthracnose on chilli (*Capsicum* spp.) in Thailand. *Plant Pathology*. 57, 562-572.

- Uchida, J. Y. 2004. Pestalotiopsis diseases. *In: Diseases and Disorders of Ornamental Palms*. (eds. M.L. Elliott, T. K. Broschat, J. Y. Uchida, and G. W. Simone), pp 27-28, American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
- Vyas, P.R., Deshpande, M.V. 1989. Chitinase production by *Myrothecium verrucaria* and its significance for fungal mycelia degradation. *Journal of Applied and General Microbiology*. 35, 348-350.
- Walker, J.C. and Foster, R.E. 1946. Plant nutrition in relation to disease development III. Fusarium wilt of tomato. *American Journal of Botany*. 33, 259-264.
- Watson, J. G. 1928. Mangrove forests of the Malay Peninsula. *Malayan forest records* no. 6, Fraser and Neave, Singapore.
- Webber, J. 1981. A natural control of Dutch elm disease. *Nature*. 292, 449-451.
- Whiffen, A.J., Bohonos, N., Emerson, R.L. 1946. The production of an antifungal antibiotic by *Streptomyces griseus*. *Journal of Bacteriology*. 56, 283-291.
- Wu, Z.J., Ouyang, M.A and Tan, Q.W. 2009. New asperxanthone and asperbihenyl from the marine fungus *Aspergillus* sp. *Pest Management Science*. 65, 60-65.
- Xie, L.W., Jiang, S.M., Zhu, H.H., Sun, W., Ouyang, Y.C., Dai, S.K. and Xiang, L. 2008. Potential inhibitors against *Sclerotinia sclerotium* produced by the fungus *Myrothecium* sp. associated with the marine sponge *ixinella* sp. *European Journal of Plant Pathology*. 122, 571-578.
- Xia, X.K., Huang, H.R., She, Z.G., Cai, J.W., Liu, L., Zhang, J.Y., Fu, L.W. Vrijmoed, L.L.P. and Lin, Y.C. 2007. Structural and biological properties of vermistatin and two new vermistatin derivatives isolated from the marine mangrove endophytic fungus *Guinardia* sp. NO. 4382. *Helvetica Chimica Acta*. 90, 1925-1931.
- Xu, J, Aly, H., Wray, V and Proksch, P. 2011. 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, H., Edrada, R., Müller, W.E., Bayer, M., Lin, W., Wu, J. and Proksch, P. 2009. Cytosporones, coumarins, and an alkaloid from the endophytic fungus *Pestalotiopsis* sp. isolated from the Chinese mangrove plant *Rhizophora mucronata*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 17, 7362-7367.

- Yamada T., Iritani M., Minoura K., Kawai K. and Numata A. 2004 Peribysins A-D, potent cell-adhesion inhibitors from a sea hare-derived culture of *Periconia* species. *Organic and Biomolecular Chemistry*. 2, 2131-2135.
- Yu, C.M., Curtis, J.M., Walter, J.A., Wright, J.L.C., Ayer, S. W., Kaleta J., Querengesser, L. and Fathi-Afshar, Z. R. 1995. Potent inhibitors of cysteine protease from the marine fungus *Microascus longilostris*. *The Journal of Antibiotics*. 49, 395-397.
- Zabalgoitia, I. 2008. Review, Fungal endophytes and their interaction with plant pathogens. 2008. *Spanish Journal of Agricultural Research*. (special issue), 138-146.
- Zhang, Y., Li, X.M., Wang, C.Y., Wang, B.G. 2007. A new naphthoquinimine derivative from the marine algal derived endophytic fungus *Aspergillus niger* EN-13. *Chinese Chemical Letters*. 18, 951-953.
- Zhang, D., Li, X., Kang, J.S., Choi, H.D. and Son, B.W. 2007. A new alpha-pyrone derivative, 6- (E)-Hept-1-enyl)-alpha-pyrone, with tyrosinase inhibitory activity from a marine isolated of the fungus *Botrytis*. *Bulletin of the Korean Chemical Society*. 28, 887-888.
- 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.W. and Fu, L.W. 2010. Anthracenedione derivatives as anticancer agents isolated from secondary metabolites of the mangrove endophytic fungi. *Marine Drugs*. 8, 1469-1481.
- Zulfiqar, M., Brlansky, R.H. and Timmer, I.W. 1996. Infection of flower and vegetative tissues of citrus by *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides*. *Mycologia*. 88, 121-128.

ภาคผนวก

สิ่งที่ได้จากโครงการวิจัย

จากการศึกษาวิจัยนี้ได้รายน้อย 5 สายพันธุ์ เป็นราทะเล 3 สายพันธุ์และราเอนโดไฟท์ 2 สายพันธุ์ ที่สามารถนำไปพัฒนาและศึกษาต่อเพื่อใช้ประโยชน์ในการควบคุมราโรคพืชได้ ทั้งในแง่ของการควบคุมด้วยสารสกัดที่เป็นสารออกฤทธิ์ชีวภาพและการควบคุมด้วยตัวราโดยตรง

ความรู้ที่ได้จากงานวิจัยนี้ ได้ถ่ายทอดให้นักศึกษาปริญญาตรีและปริญญาโท สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา มีนักศึกษาปริญญาตรี 2 คนและปริญญาโท 1 คน นำความรู้นี้ไปใช้ในการทำ senior project และวิทยานิพนธ์ เกี่ยวกับการควบคุมราโรคพืชด้วยราเอนโดไฟท์จากพืชชายเลนชนิดต่างๆ ตามลำดับ

แผนดำเนินการต่อ

ผลการศึกษาที่ได้จะนำไปเขียนบทความวิชาการเพื่อตีพิมพ์ในวารสารทางด้านโรคพืช หรือด้านราวิทยา โดยคาดว่าจะเป็วารสาร

Crop Protection Impact factor 5 ปี = 1.492

เรื่อง Broad spectrum antifungal activities against plant pathogenic fungi
of a marine fungus isolated from mangrove wood

Mycological Progress Impact factor 2009 = 1.082

เรื่อง Control of fungal phytopathogens by marine endophytic fungus isolated from leave
of mangrove plants