รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาฤทธิ์ต้านราก่อโรคพืชของราที่แยกได้จากนาเกลือ

Study of anti-plant pathogenic fungi of fungi isolated from solar saltern land

อภิรดี ปิลันธนภาคย์ และ สุดารัตน์ สวนจิตร

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้

จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำ ปีงบประมาณ พ. ศ. ๒๕๕๘

มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 177397

สัญญาเลขที่ 89/2558

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาฤทธิ์ต้านราก่อโรคพืชของราที่แยกได้จากนาเกลือ

Study of anti-plant pathogenic fungi of fungi isolated from solar saltern land

อภิรดี ปิลันธนภาคย์ และ สุดารัตน์ สวนจิตร

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ธันวาคม พ. ศ. 2560

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัย “การศึกษาฤทธิ์ต้านรากก่อโรคพืชของราที่แยกได้จากนาเกลือ” ดำเนินการสำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนจากรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 89/2558 ผู้วิจัยขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้ และขอขอบคุณ คุณสโรชา ประสงค์ผลชัย คุณจิราภรณ์ ลำมูล และคุณนันทิพัฒน์ สุริยะวงศ์ ผู้ช่วยวิจัย ที่ช่วยให้งานวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยดี

บทคัดย่อ

รานาเกลือ 64 สายพันธุ์ จากจำนวน 150 สายพันธุ์ (42.7%) สามารถยับยั้งราก่อโรคแอนแทรกโนส *Colletotrichum* spp. โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *C. gloeosporioides* DOAC 0782 ด้วยปฏิสัมพันธ์แบบ antibiosis บนอาหาร PDA/dw และ/หรือ PDA/$SW_{30\ ppt}$ ในจำนวนนี้รา 50 สายพันธุ์ จากจำนวน 62 สายพันธุ์ ที่นำมาทดสอบ (80.6%) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคพืช อย่างน้อย 1 ชนิด มากกว่าร้อยละ 35 (%IE≥35) ทั้งในสภาวะการเลี้ยงที่มีความเค็มหรือไม่มีความเค็ม และรา 44 สายพันธุ์ (71.0%) ยับยั้งได้ทั้ง *C. capsici* DOAC 1511 และ *C. gloeosporioides* DOAC 0782 เมื่อเลี้ยงร่วมกัน 5 วัน บนอาหาร PDA/$SW_{30\ ppt}$ รานาเกลือรหัส SSPB4225 ให้ผลยับยั้ง *C. capsici* DOAC 1511 และ *C. gloeosporioides* DOAC 0782 ด้วยค่า %IE สูงสุดเท่ากับ 75.0 และ 76.0 ตามลำดับ จากการทดสอบด้วยวิธี disc diffusion พบว่าสารสกัดหยาบเอธิลอะซิเตท 90 สาร ที่สกัดจากอาหาร PDA/dw และ PDA/$SW_{30\ ppt}$ ที่ผ่านการเลี้ยงราที่มี %IE ≥35 รวม 45 สายพันธุ์ ส่วนใหญ่ยับยั้งราก่อโรคพืชได้ สารสกัด 86.7% และ 81.1% ยับยั้ง *C. gloeosporioides* DOAC 0782 และ *C. capsici* DOAC 1511 ได้ตามลำดับ สารสกัด 10 สาร แสดงฤทธิ์ยับยั้งสูงสุด มีค่า %IE ≥70 สารสกัด SSPB3124 และ SSPB3208 ที่สกัดจาก PDB/$SW_{30\ ppt}$ แสดงฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคพืชสูงสุด ค่า MIC ของสารสกัดนี้เมื่อทดสอบกับราก่อโรคพืช *C. gloeosporioides* DOAC 0782 และ *C. capsici* DOAC 1511 เป็นเวลา 3 วัน มีค่าระหว่าง 256-512 µg/ml การจัดจำแนกรานาเกลือโดยใช้ข้อมูลทางสัณฐานวิทยาและการเปรียบเทียบลำดับเบสบนสาย DNA พบว่ารา SSPB3124 และ รา SSPB3208 น่าจะเป็น *Aspergillus* สปีชีส์เดียวกัน แต่ยังไม่สามารถระบุสปีชีส์ได้แน่ชัด และอาจเป็นสปีชีส์ใหม่

คำสำคัญ: รานาเกลือ ฤทธิ์ต้านรา ราก่อโรคพืช แอนแทรกโนส

Abstract

Sixty four out of 150 solar saltern fungi (42.7%) exhibited antibiosis interaction against anthracnose causing *Colletotrichum* spp., especially against *C. gloeosporioides* DOAC 0782, on both or either PDA/dw or PDA/$SW_{30\ ppt}$. Among these fungi, fifty out of 62 fungi tested (80.6%) inhibited at least one *Colletotrichum* sp. with %IE $\geq$35 either on PDA/dw or PDA/$SW_{30\ ppt}$. After 5 days incubation, 44 fungi (71.0%) exhibited inhibitory activity against both *C. capsici* DOAC 1511 and *C. gloeosporioides* DOAC 0782 on PDA/$SW_{30\ ppt}$. The highest activity against *C. capsici* DOAC 1511 and *C. gloeosporioides* DOAC 0782 were obtained from fungus SSPB4225, with %IE 75.0 and 76.0, respectively. Disc diffusion test of 90 extracts from both PDA/dw and PDA/$SW_{30\ ppt}$ culture filtrates of 45 fungi with %IE ≥ 35 revealed 86.7% and 81.1% inhibition against *C. gloeosporioides* DOAC 0782 and *C. capsici* DOAC 1511, respectively. Ten extracts exhibited strong activity with %IE $\geq$70. Extracts from PDB/$SW_{30\ ppt}$ filtrate of SSPB 3124 and SSPB 3028 fungi exhibited the highest inhibitory activity. The MIC against *C. gloeosporioides* DOAC 0782 and *C. capsici* DOAC 1511 were 256-512 µg/ml. Morphological identification and DNA sequence comparison indicated that SSPB3124 and SSPB3208 had tendency to be the same *Aspergillus* species and may be new to Sciences.

Keywords: solar saltern fungi, antifungal activity, fungal phytopathogen, anthracnose

สารบัญเรื่อง

หน้า

บทนำ..... 1

ทบทวนเอกสารและวรรณกรรม..... 3

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง..... 6

ผลการทดลอง..... 16

การคัดกรองราที่สามารถยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืช โดยวิธี dual culture 16

การศึกษาคุณสมบัติการชอบเค็มของราที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชด้วย %IE มากกว่าหรือเท่ากับ 35..... 33

การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากอาหารเลี้ยงรานาเกลือต่อการยับยั้งราก่อโรคพืช..... 35

การศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญ (MIC) และทดสอบหาความ เข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดในการทำลาย (MLC) ราก่อโรคพืช 43

ความสามารถในการยับยั้งราโรคพืชอื่นๆ..... 46

การจัดจำแนกราที่ใช้ในการศึกษา..... 48

การระบุแทกซอนของราที่คัดเลือกเพื่อการจัดจำแนก..... 57

สรุปและอภิปรายผล..... 58

บรรณานุกรม..... 63

ภาคผนวก..... 70

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1	รานาเกลือที่นำมาทดสอบจำนวน 150 สายพันธุ์.....	7
2	องค์ประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์ เพื่อเพิ่มจำนวนยีน beta tubulin และ DNA บริเวณ ITS...	14
3	ขั้นตอนของการดำเนินปฏิกิริยาพีซีอาร์ DNA บริเวณ ITS.....	14
4	ขั้นตอนของการดำเนินปฏิกิริยาพีซีอาร์ยีน beta tubulin	15
5	ระยะทางที่รานาเกลือยับยั้งการเจริญราก่อโรคพืช (ID) เมื่อเลี้ยงร่วมกันบนอาหารที่มีความเค็มต่างกันเป็นระยะเวลา 3 วัน และ 5 วัน.....	17
6	ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญ (%IE) ราก่อโรคพืชของรานาเกลือ เมื่อเลี้ยงร่วมกันบนอาหารที่มีความเค็มต่างกันเป็นระยะเวลา 3 วัน และ 5 วัน	27
7	จำนวนสารสกัดจากอาหารเลี้ยงรานาเกลือที่แสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคพืชที่ระดับ %IE ต่าง ๆ กัน เมื่อเลี้ยงร่วมกัน เป็นเวลา 3 และ 5 วัน.....	33
8	ระดับความชอบเค็มของรานาเกลือ.....	34
9	จำนวนรานาเกลือชอบเค็มที่ระดับต่างๆกัน	35
10	ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญ (%IE) ของสารสกัดจากรานาเกลือที่มีต่อราก่อโรคพืช...	36
11	สารสกัดที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญ (%IE) ราก่อโรคพืชในระดับดีมากขึ้นไป.....	41
12	จำนวนสารสกัดรานาเกลือที่แสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชที่ระดับ %IE ต่าง ๆ เมื่อเลี้ยง ร่วมกัน เป็นเวลา 3 และ 5 วัน.....	41
13	ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่ในการยับยั้งการเจริญ (MIC) ราก่อโรคพืช เมื่อเลี้ยงราบนอาหาร PDB/dw เป็นเวลา 3 และ 5 วัน.....	44
14	ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่ในการฆ่ารา (MLC) ราก่อโรคพืช เมื่อเลี้ยงราบนอาหาร PDB/dw เป็นเวลา 5 วัน.....	45
15	ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญราก่อโรคพืชนอกเหนือจากแอนแทรกโนส.....	47
16	การจัดจำแนกรานาเกลือทางสัณฐานวิทยา.....	48
17	ผลการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน beta-tubulin ของรา SSPB3124 เปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank วิเคราะห์โดยโปรแกรม BLASTn.....	49

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
18	ผลการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ITS ของรา SSPB3208 เปรียบเทียบกับข้อมูลบนฐานข้อมูล GenBank วิเคราะห์โดยโปรแกรม BLASTn.....	50
19	ผลการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ITS ของรา SSPB4107 เปรียบเทียบกับข้อมูลบนฐานข้อมูล GenBank วิเคราะห์โดยโปรแกรม BLASTn.....	52
20	ผลการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน beta-tubulin ของรา SSPB4207 เปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank โดยโปรแกรม BLASTn	53
21	ผลการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของรา SSPB4215 เปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank วิเคราะห์โปรแกรม BLASTn.....	55
22	ผลการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของรา SSPB4225 เปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank โดยโปรแกรม BLASTn.....	56
23	การระบุแทกซอนของราที่คัดเลือก 6 สายพันธุ์.....	57

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

1 ลักษณะนาเกลือในแปลงเก็บตัวอย่าง 3 แปลง ที่มีลักษณะที่เห็นภายนอกและความเค็มแตกต่างกันชัดเจน..... 6

2 ลักษณะการศึกษาการเจริญรานาเกลือ บนอาหาร PDA ที่มีความเค็ม 0-250 ppt ในจานเพาะเชื้อแบบ 24 หลุม 9

3 การศึกษา inhibition distance (ID) ที่เกิดจากปฏิสัมพันธ์แบบ antibiosis โดยวิธี dual culture..... 9

4 การศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญที่เกิดจากปฏิสัมพันธ์แบบ antibiosis โดยวิธี dual culture 10

5 ตัวแปรที่ใช้ในการคำนวณร้อยละการยับยั้งการเจริญของสารสกัดที่เตรียมจากอาหารเลี้ยงรานาเกลือ เมื่อทดสอบ ด้วยวิธี disc diffusion..... 11

6 ฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคแอนแทรกโนสของราจากนาเกลือ SSPB4207 ในการยับยั้งราก่อโรคพืช *C. capsici* DOAC 1511 และยับยั้งรา *C. gloeosporioides* DOAC 0782 บนอาหาร PDA/$SW_{30\ ppt}$ 32

7 ฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคแอนแทรกโนสของสารสกัดราจากอาหารเลี้ยงรานาเกลือ SSPB4225 ในการยับยั้งราก่อโรคพืช *C. capsici* DOAC 1511 และ *C. gloeosporioides* DOAC 0782 บนอาหาร PDA/$SW_{30\ ppt}$..... 32

8 ฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคแอนแทรกโนสของสารสกัดราจากอาหารเลี้ยงรานาเกลือ SSPB3124 ที่เตรียมจาก PDB/dw ในการยับยั้งรา *C. capsici* DOAC 1511 และ *C. gloeosporioides* DOAC 0782 บนอาหาร PDB/dw..... 42

9 ฤทธิ์ยับยั้งฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคแอนแทรกโนสของสารสกัดราจากอาหารเลี้ยงรานาเกลือ SSPB3208 ที่เตรียมจาก PDB/dw ในการยับยั้งรา *C. capsici* DOAC 1511 และ *C. gloeosporioides* DOAC 0782 บนอาหาร PDB/dw..... 42

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

10 ฤทธิ์ยับยั้งฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคแอนแทรกโนสของสารสกัดราจากอาหารเลี้ยงรานาเกลือ SSPB4207 ที่เตรียมจาก PDB/$SW_{30\ ppt}$ ในการยับยั้งรา *C. capsici* DOAC 1511 และ *C. gloeosporioides* DOAC 0782 บนอาหาร PDB/dw..... 43

11 ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญ ของราก่อโรคพืช *C. capsici* DOAC 1511 ที่ความเข้มข้น 2,048-256 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยวิธี agar dilution เมื่อบ่ม 5 วัน..... 46

12 ฤทธิ์ยับยั้งฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคแอนแทรกโนสของสารสกัดราจากอาหารเลี้ยงรานาเกลือ ที่เตรียมจาก PDB/$SW_{30\ ppt}$ ในการยับยั้งรา *F. oxysporum* DOAC 1808 และ *Pestilotiopsis* sp. DOAC 1098..... 47

13 ลักษณะของรา *Aspergillus* sp.2 SSPB3124 เมื่อบ่มบนอาหาร PDA/$SW_{30\ ppt}$ เป็นเวลา 14 วัน.... 49

14 ลักษณะของรา *Aspergillus* sp.2 SSPB3208 บนอาหาร PDA/$SW_{30\ ppt}$ เมื่อบ่มเป็นเวลา 5 วัน..... 50

15 ลักษณะของรา *Aspergillus* sp.1 SSPB4107 บนอาหาร PDA/$SW_{30\ ppt}$ เมื่อบ่มเป็นเวลา 14 วัน.... 51

16 ลักษณะของรา *Aspergillus* sp.1 SSPB4207 บนอาหาร PDA/$SW_{30\ ppt}$ เมื่อบ่มเป็นเวลา 14 วัน.... 53

17 ลักษณะของรา *Aspergillus* sp.1 SSPB4215 บนอาหาร PDA/$SW_{30\ ppt}$ เมื่อบ่มเป็นเวลา 14 วัน.... 54

18 ลักษณะของรา *Aspergillus* sp.1 SSPB4225 บนอาหาร PDA/$SW_{30\ ppt}$ เมื่อบ่มเป็นเวลา 14 วัน.... 56

บทที่ 1

บทนำ

ราเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีการปรับตัวได้ดีจึงพบการแพร่กระจายในระบบนิเวศที่หลากหลาย แม้จะเป็นระบบนิเวศที่ไม่เหมาะสมกับจุลินทรีย์ทั่วไป เช่น ราที่เจริญในระบบนิเวศที่มีค่า water activity (a_w) ต่ำ หรือรากลุ่มที่สามารถเจริญในระบบนิเวศที่มีความเค็มหรือความเข้มข้นของแร่ธาตุสูงดังเช่นนาเกลือ ราที่เจริญได้ดีในที่ที่มีความเค็มสูง จัดว่าเป็นราชอบเค็ม (Halophilic fungi, Halophile) ขณะที่ราที่เจริญได้หรือทนอยู่ได้ในที่ที่มีความเค็มสูง จัดว่าเป็นราทนเค็ม (Halotolerant fungi) (Tuomela *et al.,* 2000) ราสามารถปรับตัวทางสัณฐานวิทยาในสภาวะวิกฤต ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงรูปแบบลักษณะของการเจริญ ลักษณะเซลล์ ขนาดเซลล์ การสร้างสี และการเปลี่ยนแปลงลักษณะ colony (Han & Prade, 2002) เชื่อกันว่าสิ่งเหล่านี้มีความสำคัญต่อการเจริญการอยู่รอดภายใต้สภาวะที่มีความเค็มสุดขีด (Extremely saline condition)

นาเกลือ (Solar salterns) เป็นระบบที่มีลักษณะเป็นบ่อลักษณะตื้นหลายบ่อ โดยทุกบ่อเชื่อมกันบริเวณมุมบ่อเพื่อเป็นช่องทางนำน้ำทะเลเข้ามาในบ่อ (Mani *et al.,* 2012) และเกลือถูกผลิตโดยอาศัยการระเหยของน้ำทะเลด้วยวิธีทางธรรมชาติ (Oren, 2002) น้ำในนาเกลือจะมีการเพิ่มระดับความเค็มอย่างต่อเนื่อง จากระดับปานกลางจนถึงระดับที่มีความเค็มสูง (Hypersaline) (Oren, 2002; Zajc *et al.*, 2012) ในช่วงที่มีการทำนาเกลือความเค็มของน้ำทะเลในนาเกลือจะเพิ่มขึ้น มากกว่า 10 เท่าของความเค็มน้ำทะเลซึ่งปกติมีค่าประมาณ 35 ส่วนในพันส่วน (Part per thousand, ppt) เมื่อน้ำระเหยส่งผลให้น้ำในนาเกลือ มีค่าความเค็มมากถึง 90-250 ppt เมื่อเกลืออิ่มตัวจึงเกิดเป็นผลึกเกลือ (NaCl crystal หรือ Halite crystal) (Chatchawan *et al.,* 2011; Oren, 2002) นาเกลือจัดเป็นสภาวะวิกฤตยากแก่การดำรงชีวิต เนื่องจากความเข้มข้นของเกลือ ความเป็นกรดด่าง (pH) อุณหภูมิ ความเข้มข้นของสารอาหาร ปริมาณออกซิเจน ปริมาณน้ำที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้ (Water activity, a_w) รังสีจากแสงอาทิตย์ และไอออนต่าง ๆ ที่ไม่เหมาะสม (Griffith, 1994)

มีรายงานว่าราสายหลายกลุ่ม โดยเฉพาะอย่างยิ่งราในสิ่งแวดล้อมพิเศษหรือสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต้องมีกลไกพิเศษในการปรับตัวเพื่อให้อาศัยอยู่ได้ รวมถึงสามารถผลิตสารหลากหลายชนิดแล้วส่งออกนอกเซลล์ (Extrolites) (Gunde-Cimerman & Zalar, 2014; Frisvad & Samson, 2004) สารดังกล่าวอาจเป็นสารประกอบทุติยภูมิ เอนไซม์ หรือกรด (Margesin & Schinner, 2001; Behal, 2003) สารประกอบทุติยภูมิที่ราสร้างขึ้นมีฤทธิ์ทางชีวภาพหลากหลายและมีประสิทธิภาพสูง (Hyde, 2001; Kurtboke & Swings, 2004) เช่นมีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ ต้านไวรัส ต้านอนุมูลอิสระ และต้านเซลล์มะเร็ง เป็นต้น (Phongpichit *et al.*, 2006, 2007) ดังนั้นราสายที่เป็น Halotolerant ที่พบในนาเกลือ (Bernan *et al*., 1997; Ireland *et al*., 1988, 1993; Kobayashi & Ishibashi, 1993**)** ซึ่งเป็นสภาวะที่มีปัจจัยทางกายภาพแตกต่างจากสภาพแวดล้อมทั่วไป จึงเป็นแหล่งที่น่าสนใจสำหรับการค้นหาราที่ผลิตสารออกฤทธิ์ชีวภาพชนิดใหม่

ทางด้านการเกษตรโรคพืชนับเป็นปัญหาหลักของเกษตรกร โรคพืชส่วนใหญ่เกิดจากราซึ่งทำความเสียหายต่อพืชและยังส่งผลให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจ (Horbach *et al.,* 2011) ราที่เป็นสาเหตุโรคพืช (Plant phytopathogenic fungi) มีมากกว่า 8,000 ชนิด (Adams, 1997) *Colletotrichum* เป็นหนึ่งในราก่อโรคพืชที่ก่อให้เกิดโรคแอนแทรกโนส (Anthracnose) ซึ่งทำให้เกิดความเสียหายต่อพืชเศรษฐกิจหลายชนิดทั่วโลก (Gautam, 2014; Than *et al.,* 2008) โดยทำให้ผลผลิตพืชทางการตลาดลดลงร้อยละ 10-80 ในประเทศกำลังพัฒนาโดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศไทย (Poonpolgul & Kumphai, 2007) เนื่องจากโรคแอนแทรกโนสเป็นปัญหาที่เกิดในพืช ผัก ผลไม้ ก่อให้เกิดความสูญเสียอย่างรุนแรงทั้งก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว (Hadden & Black, 1989; Bosland & Votava, 2003) ปัจจุบันเกษตรกรมีการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืช (Pesticides) เพื่อกำจัดราก่อโรคพืช ทำให้เกิดปัญหาสารเคมีตกค้างเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค สัตว์ แมลง รวมถึงสิ่งแวดล้อม (Arcury *et al.,* 2002; Cabrito *et al.,* 2009) นอกจากนี้อาจทำให้ราก่อโรคพืชมีความต้านทานต่อสารเคมีเพิ่มมากขึ้นส่งผลให้มีการใช้สารในปริมาณที่สูงขึ้นและมีค่าใช้จ่ายที่สูง ดังนั้นสารกำจัดศัตรูพืชที่มาจากธรรมชาติซึ่งมีประสิทธิภาพและปลอดภัยจึงเป็นทางเลือกที่กำลังเป็นที่สนใจ ราเป็นทางเลือกหนึ่งที่ดีสำหรับใช้ผลิตสารชีวภาพที่มีความสามารถกำจัดศัตรูพืช เนื่องจากมีรายงานสารฆ่าราหลายชนิด

ปัจจุบันมีการนำเชื้อจุลินทรีย์และราจากแหล่งต่างๆ มาใช้ประโยชน์ทางเทคโนโลยีชีวภาพหลากหลาย รวมถึงผลิตสารที่ใช้เป็นตัวควบคุมโรคพืชทางชีวภาพ (Pal & Gardener, 2006; Kaewchai *et al.,* 2009) ซึ่งปัจจุบันมีการนำราหลายชนิดมาขายเป็นการค้า เช่น Ketomium ผลิตจาก *Chaetomium globosum C. cupreum* Promote ผลิตจาก *Trichoderma harzianum T. viride* SoilGard ผลิตจาก *Gliocladium virens* และ Trichodex ผลิตจาก *T. harzianum* (Kaewchai *et al.,* 2009) อย่างไรก็ตามสารฆ่าราจากราทนเค็มยังไม่มีผู้ศึกษาและรายงานไว้

ประเทศไทยมีพื้นที่ติดกับทะเลและมีแหล่งผลิตเกลือทะเลที่สำคัญหลายจังหวัด เช่น จังหวัดสมุทรสาคร สมุทรสงคราม สมุทรปราการ ชลบุรี และเพชรบุรี (Chatchawan *et al*., 2011) แต่ยังไม่มีผู้ใดศึกษาคุณสมบัติในแง่ที่ใช้เป็นตัวควบคุมโรคพืชทางชีวภาพ และการสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุโรคพืช

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดกรองราสาย ที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคพืชแอนแทรกโนสจากนาเกลือในในประเทศไทย รวมถึงศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของราที่ผลิตสารและคุณสมบัติเบื้องต้นของสารออกฤทธิ์ที่ราผลิตขึ้น เพื่อใช้เป็นแหล่งข้อมูลในการตรวจคัดกรองราที่มีคุณสมบัติอื่นๆ รวมถึงเพื่อคัดเลือกราที่มีคุณสมบัติเด่นในการยับยั้งหรือผลิตสารยับยั้งราราก่อโรคพืชแอนแทรกโนส ไว้ใช้ประโยชน์ต่อไป

บทที่ 2

ทบทวนเอกสารและวรรณกรรม

1. นาเกลือและระบบนิเวศที่มีความเค็มสูง

นาเกลือ (solar salterns, Marine salterns) เป็นระบบนิเวศทางทะเลประเภทหนึ่งที่มนุษย์สร้าง (Man-made ecosystem) ระบบนิเวศนาเกลือมีสภาพแวดล้อมที่แตกต่างจากระบบนิเวศอื่นๆ โดยมีปัจจัยสิ่งแวดล้อมหลายประการที่มีผลต่อการดำรงชีวิตของจุลินทรีย์รวมทั้งราที่อาศัยอยู่ในบริเวณนี้ ปัจจัยทางกายภาพที่มีผลในนาเกลือได้แก่ ความเค็ม pH อุณหภูมิ ความเข้มแสง และปริมาณสารอาหาร (Nayak *et al.,* 2012) ความเค็มมีผลต่อราในด้านแรงดันออสโมติก (Osmotic pressure) (Greetchen, 2006) ความเค็มในนาเกลืออยู่ในช่วง 3-35% (Buchalo *et al.,* 1998) ซึ่งสูงมากเมื่อเทียบกับความเค็มของน้ำทะเลปกติ จึงจัดเป็น extreme environment เป็นระบบนิเวศที่มีความเค็มสูงแบบ hypersaline environment และจัดเป็นระบบนิเวศความเค็มสูง แบบ thalassohaline ซึ่งเป็นระบบนิเวศที่มีมีอิออนของธาตุต่างๆสูง นาเกลือมีส่วนประกอบของแร่ธาตุหลักในดินและน้ำ คือโซเดียมและคลอไรด์ นอกจากนี้ยังพบว่ามีการตกตะกอนของสารประกอบ calcite, gypsum, halite, sylvite และ carnallite (Brock, 1979) ส่วนปัจจัยทางชีวภาพที่มีอิทธิพลโดยตรงคือพืชและอินทรีย์สาร ที่เป็นทั้งที่อยู่อาศัยและแหล่งอาหารของรา ในต่างประเทศมีรายงานนาเกลือและระบบนิเวศที่มีความเค็มสูง ในประเทศเปอร์โตริโก ประเทศฝรั่งเศส ประเทศสโลวีเนีย ประเทศสเปน ประเทศปอร์ตุเกส และประเทศอินเดีย เป็นต้น (Cantrell *et al.,* 2006; Nayak *et al.,* 2012) นอกจากนาเกลือแล้ว ยังมีระบบนิเวศที่มีความเค็มสูงอื่น ๆ (Hypersaline environment) ที่มีรากลุ่ม halophile และ halotolerant อาศัยอยู่ เช่น saline soil, hyper saline lagoon, salt lake และ Dead Sea เป็นต้น (Buchlo *et al.,* 1998; DasSarma & Arora, 2001, Cantrell *et al.,* 2011)

ประเทศไทยมีพื้นที่ทำนาเกลือทั้งหมดประมาณ 81,485 ไร่ โดยจังหวัดเพชรบุรีมีพื้นที่มากที่สุด ร้อยละ 47.0 รองลงมาได้แก่จังหวัดสมุทรสาคร ร้อยละ 43.1 จังหวัดสมุทรสงคราม ร้อยละ 7.7 นาเกลือในภาคตะวันออก พบที่จังหวัดชลบุรีร้อยละ 1.0 จังหวัดจันทบุรี ร้อยละ 0.6 และจังหวัดฉะเชิงเทรา ร้อยละ 0.2 (ฐานข้อมูลความรู้ทางทะเล, 2553) สถานที่ที่เหมาะสมแก่การทำนาเกลือคือพื้นที่ราบริมทะเลที่น้ำทะเลสามารถขึ้นได้ตลอดปี เพราะดินเป็นดินเหนียว โดยเฉพาะอย่างยิ่งจังหวัดริมทะเล พื้นที่ที่มีการผลิตเกลือมาก ประมาณร้อยละ 90 ของผลผลิตทั้งประเทศอยู่ใน 3 จังหวัดคือ เพชรบุรี สมุทรสาคร และสมุทรสงคราม ส่วนพื้นที่ที่มีการผลิตเกลือเพียงเล็กน้อยประมาณร้อยละ 10 ของผลผลิตเกลือทั้งประเทศ คือ จังหวัดในภาคตะวันออกและภาคใต้ ได้แก่ ชลบุรี จันทบุรี ฉะเชิงเทรา และปัตตานี

2. ลักษณะนาเกลือและการทำนาเกลือในประเทศไทย

การผลิตเกลือของประเทศไทย แบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ เกลือทะเลหรือเกลือสมุทรและเกลือสินเธาว์หรือเกลือหิน เกลือทะเลหรือเกลือสมุทร (Sea salt) คือเกลือที่ผลิตขึ้น โดยนำน้ำทะเลขึ้นมาตากแดดให้น้ำระเหยไปจนเหลือแต่ผลึกเกลือ ส่วนเกลือสินเธาว์ (Rock salt) คือเกลือที่ได้จากการนำน้ำผิวดินที่มีเกลืออยู่หรือเกลือบนผิวดินมาละลายน้ำแล้วต้ม หรือได้จากเกลือหินที่อยู่ใต้ดิน โดยใช้วิธีฉีดน้ำลงไปละลายเกลือในบ่อเกลือ หรือใช้วิธีสูบน้ำเกลือใต้ดินขึ้นมาตากแดด หรือนำไปต้มเพื่อให้ได้ผลึกเกลือ (ฐานข้อมูลความรู้ทางทะเล, 2553) แต่ในการศึกษานี้จะกล่าวถึงเฉพาะการผลิตเกลือสมุทร และเรียกสั้นๆว่าการทำนาเกลือ การทำนาเกลือในภาคกลางจะเริ่มทำประมาณเดือนพฤศจิกายนหรือฤดูแล้งถึงเดือนพฤษภาคมของปีถัดไป ใช้ระยะเวลาประมาณ 6-7 เดือน ขึ้นอยู่กับสภาพภูมิอากาศ เนื่องจากการทำนาเกลือไม่สามารถทำได้ในช่วงฤดูฝน และจะเริ่มเก็บผลผลิตเกลือได้ประมาณกลางเดือนมกราคมเป็นต้นไป สำหรับการทำนาเกลือในภาคใต้ที่จังหวัดปัตตานี จะมีระยะเวลานานกว่าภาคกลาง โดยสามารถทำนาเกลือได้ปีละ 2 ครั้ง ครั้งแรกเริ่มประมาณเดือนกุมภาพันธ์ถึงเดือนมิถุนายน ช่วงเวลาประมาณ 5 เดือน และครั้งที่สองเริ่มประมาณเดือนกรกฎาคมถึงเดือนกันยายน เป็นช่วงเวลาประมาณ 2 เดือน รวมมีช่วงเวลาการทำนาเกลือประมาณ 8 เดือน ส่วนในช่วงเดือนตุลาคม ถึงเดือนมกราคม จะมีฝนตกชุกจึงไม่สามารถทำนาเกลือได้ (คลังปัญญาไทย, 2556)

2.1 ส่วนประกอบของนาเกลือ

นาเกลือประกอบด้วยส่วนต่างๆ แบ่งออกเป็นแปลงคล้ายคันนา แต่ละแปลงมีความเค็มแตกต่างกันและมีชื่อเรียกแตกต่างกัน นอกจากนี้ยังแตกต่างกันในแต่ละพื้นที่ ตัวอย่างการเรียกเช่น วังน้ำเป็นแปลงสำหรับเก็บน้ำทะเลที่นำเข้ามาสำหรับเก็บไว้ใช้ตลอดฤดูกาลทำนาเกลือ นาตากหรือนาประเทียบเป็นแปลงสำหรับให้น้ำตากแดด เพื่อให้น้ำระเหยออกไปเป็นการเพิ่มความเค็ม นาเชื้อรองคือนาสำหรับตากน้ำที่มีความเข้มข้นพอสมควร โดยจะตากน้ำให้ได้ความเค็มประมาณ 150 ส่วนในพันส่วน (ppt) นาเชื้อเป็นนาสำหรับเพาะเชื้อเกลือ ซึ่งต้องตากน้ำให้น้ำมีความเค็มสูงถึง 240 ppt นาปลงเป็นนาขั้นตอนสุดท้ายสำหรับตากน้ำเค็ม เพื่อให้เกลือตกผลึกเป็นเม็ดเกลือ (คลังปัญญาไทย, 2556) อย่างไรก็ตามการเรียกชื่อส่วนประกอบของนาเกลือในแต่ละท้องถิ่นมีต่างกันไปบ้าง

2.2. วิธีทำนาเกลือ

การทำนาเกลือจะเริ่มเมื่อฝนท้ายฤดูจะผ่านไปหรือช่วงประมาณเดือนตุลาคม ขั้นตอนแรก คือการเตรียมพื้นที่สำหรับการทำนาเกลือ เริ่มจากกั้นน้ำฝนที่ขังอยู่ในนา เพื่อไว้ใช้สำหรับขุดรอกร่องนาและเสริมคันดินใหม่เพื่อให้คันดินสูงขึ้นสำหรับใส่น้ำเกลือในปีถัดไป จากนั้นขุดรางส่งน้ำจากนาเกลือถึงชายทะเลและติดตั้งอุปกรณ์วิดน้ำเพื่อเอาน้ำทะเลมาใช้ทำนาเกลือ ขั้นตอนต่อมาคือ วิดน้ำจากรางส่งน้ำ ให้เต็มวังน้ำ และเริ่มดันน้ำเข้าสู่นาตากหรือนาประเทียบ หลังจากนั้นดันจึงน้ำเข้าสู่นาเชื้อรองเป็นส่วนที่ 3 ตากน้ำไว้ประมาณ 5-7 วัน แสงแดดจะทำให้น้ำระเหยจนปริมาณน้ำลดลงและความเค็มเพิ่มมากขึ้น สังเกตจากคราบน้ำที่จับอยู่ริมบ่อ ขั้นตอนต่อมาคือดันน้ำจาก

นาเชื้อรองเข้าสู่นาเชื้อซึ่งเป็นการเตรียมน้ำสำหรับใช้ในนาปลง จากนั้นทำการปรับพื้นที่นาปลงเพื่อรองรับน้ำจากนาเชื้อ โดยใช้วัสดุกลิ้งบดทับผิวดินให้เรียบแน่นไม่ให้มีรอยแตก ประมาณ 4-5 ครั้ง ครั้งละ 3-5 วัน และการบดกลิ้งผิวดิน จะใช้ระยะเวลาห่างกันประมาณ 5-7 วัน ตามสภาพผิวดิน จากนั้นดันน้ำจากนาเชื้อเข้าสู่นาปลง น้ำเกลือจะค่อยๆ ตกผลึกเป็นเม็ดเกลือและเกาะตัวกันหนา มีค่าความเค็มประมาณ 820-870 ppt ขั้นตอนสุดท้ายเป็นการเก็บผลึกเกลือ เริ่มจากเกลือที่ตกผลึกหนาประมาณ 2 เซนติเมตรขึ้นไป จะใช้รั่วซอยเกลือให้ผลึกเกลือแตกออกจากกัน ทำการซอยเกลือจนทั่วนา จากนั้นใช้ทับทา ซึ่งมีลักษณะคล้ายจอบเกลี่ยผลึกเกลือให้เป็นแถวยาวไปตามคันนา แล้วใช้ทับทาซุ่ม (ตะล่อมเกลือ) รวมผลึกเกลือให้เป็นกองนำเข้าเก็บในฉางหรือยุ้งเกลือ (คลังปัญญาไทย, 2556)

2. การทบทวนวรรณกรรม

ราชอบเค็มชนิดแรกที่มีรายงานเป็นราจาก Dead Sea คือรา *Gymnascella marismoutui* (Buchalo *et al.,* 1998) และรา *Cladosporium* like เป็นราชอบเค็มชนิดแรกที่แยกได้จากนาเกลือ จากประเทศสโลวีเนีย (Gunde-Cemerman *et al.,* 2000) ราทนเค็มชนิดเด่นที่พบได้ในบริเวณนี้ ได้แก่ *Aspergillus, Penicillium, Alternaria, Cladosporium* และ *Scopulariopsis* (Gunde-Cemerman *et al.,* 2009) Nayak *et al.,* (2012) สำรวจราทนเค็มและราชอบเค็มในนาเกลือจาก Goa ประเทศอินเดีย พบว่าราที่พบได้แก่รา *Aspergillus* spp. รองลงมาคือพบ *Penicillium* spp. และพบ *Eurotium* ประปราย

ในประเทศไทยมีรายงานการศึกษาราจากนาเกลือ ตั้งแต่ปี พ. ศ. 2012 (Ali *et al*., 2012, 2014) Ali *et al*. (2012) รายงานการแยกรา 17 ชนิด รวม 43 สายพันธุ์ จากตัวอย่างดินในนาเกลืออำเภอบ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรี ในจำนวนนี้เป็นราชอบเค็ม 4 ชนิด รวม 6 สายพันธุ์ Ali *et al*. (2014) รายงานฤทธิ์ต้านแบคทีเรียหลายชนิดของรานาเกลือจากจังหวัดเพชรบุรี แต่นับถึงปัจจุบันยังไม่มีรายงานถึงการศึกษาคุณสมบัติในการต้านราก่อโรคพืชของราจากนาเกลือ ฤทธิ์ต้านราก่อโรคพืชของราที่แยกจากสิ่งแวดล้อมทางทะเลในประเทศไทยมีรายงานไว้ในราเอนโดไฟท์ในใบพืชชายเลนรวมถึงสารสกัด (Khrueayu & Pilantanapak, 2012) ขณะที่ในประเทศอินเดียมีรายงานการต้านราก่อโรคพืชของสารสกัดจากราที่แยกได้จากใบพืชชายเลน *Excoecaria agallocha* (Kumar & Jones, 2013*)*

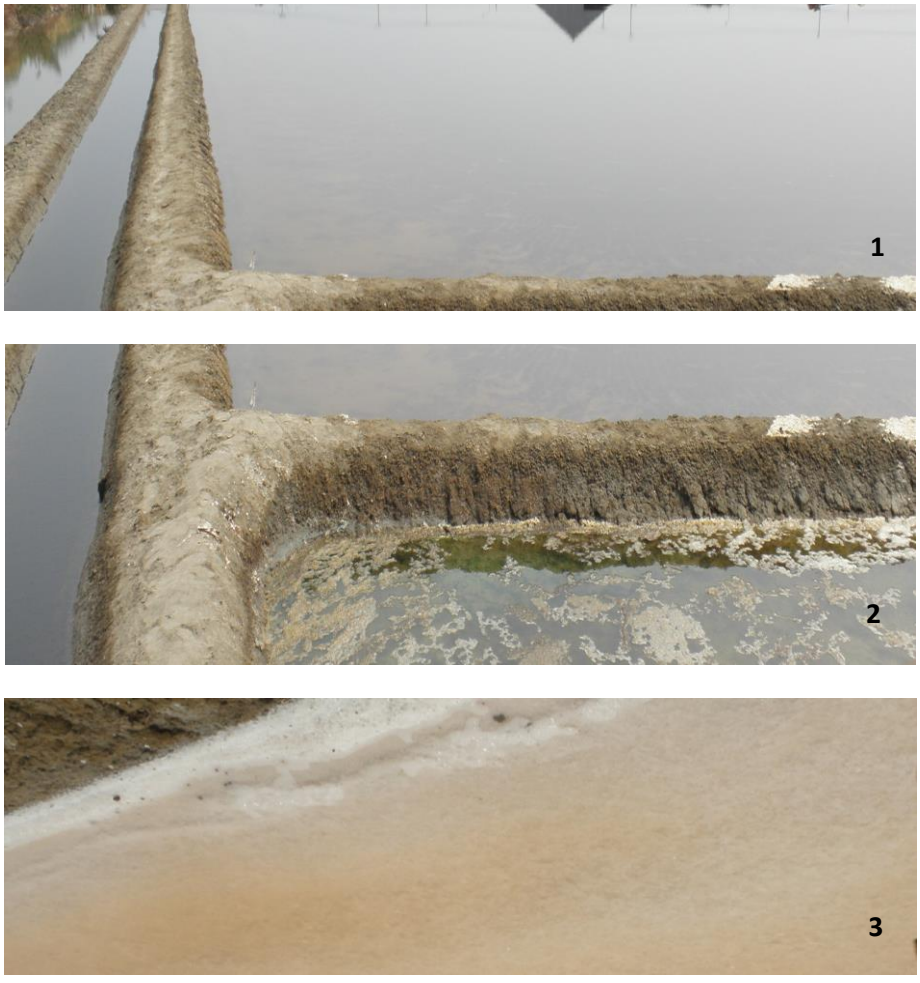
มีรายงานถึงราน้ำจืดกลุ่ม Hyphomycete ในการยับยั้งราก่อโรคพืชหลายชนิด (Platas *et al*., 1998; ซึ่งราน้ำกลุ่ม Hyphomycete ถูกพบว่าเป็นรากลุ่มเด่นของราจากนาเกลือเช่นกัน (Gunde-Cemerman *et al.*, 2014) Sati & Arya (2000) รายงานว่าราน้ำจืดกลุ่ม Hyphomycete; *Tetrachaetum elegans* มีฤทธิ์ต้านราก่อโรคพืช 5 ชนิดรวมถึง *Colletotrichum falcatum* และ *Fusarium oxysporum* จากราก่อโรคพืชที่ทดสอบทั้งหมด 7 ชนิด โดยมีร้อยละของประสิทธิภาพ ร้อยละ 33 และ 30 ตามลำดับ

บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์และวิธีทดลอง

1. สายพันธุ์จุลินทรีย์

ราที่แยกจากดินและน้ำในนาเกลือ อำเภอท่าข้าม จังหวัดฉะเชิงเทรา (SSCS) อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี (SSCH) ในช่วงเดือน มกราคม และ เมษายน พ.ศ. 2553-2554 และอำเภอบ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรี ในเดือนธันวาคม พ.ศ. 2555 (SSPB) จำนวน 150 สายพันธุ์ (ภาพที่ 1 และตารางที่ 1) ราทั้งหมดเก็บรักษาไว้ ณ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา



ภาพที่ 1 ลักษณะนาเกลือในแปลงเก็บตัวอย่าง 3 แปลง ที่มีลักษณะที่เห็นภายนอกและความเค็มแตกต่างกันชัดเจน

ตารางที่ 1 รานาเกลือที่นำมาทดสอบจำนวน 150 สายพันธุ์

SSCH001	SSCS064	SSPB1105	SSPB1301	SSPB2303	SSPB4108
SSCH003	SSCS066	SSPB1109	SSPB1302	SSPB2304	SSPB4206
SSCH006	SSCH069	SSPB1110	SSPB1303	SSPB2305	SSPB4207
SSCH011	SSCH070	SSPB1111	SSPB1306	SSPB2308	SSPB4208
SSCH014	SSCH072	SSPB1116	SSPB1307	SSPB2310	SSPB4215
SSCH015	SSCS074	SSPB1117	SSPB1308	SSPB3101	SSPB4217
SSCH017	SSCS076	SSPB1118	SSPB1309	SSPB3104	SSPB4225
SSCH019	SSCS078	SSPB1119	SSPB1310	SSPB3108	SSPB4234
SSCH022	SSCS079	SSPB1120	SSPB1311	SSPB3111	SSPB4235
SSCH024	SSCS080	SSPB1122	SSPB1312	SSPB3112	SSPB4301
SSCH026	SSCS082	SSCS1123	SSPB1314	SSPB3114	SSPB4304
SSCH031	SSCS085	SSCS1126	SSPB1315	SSPB3117	SSPB4307
SSCH032	SSCS088	SSCS1128	SSPB2101	SSPB3120	SSPB4308
SSCH033	SSCS089	SSPB1130	SSPB2102	SSPB3124	SSPB4309
SSCS034	SSCS091	SSPB1204	SSPB2103	SSPB3203	SSPB4313
SSCH035	SSCS097	SSPB1206	SSPB2104	SSPB3204	SSPB4319
SSCS044	SSCS099	SSPB1209	SSPB2107	SSPB3207	SSPB4320
SSCS045	SSCS101	SSPB1210	SSPB2108	SSPB3208	SSPB4321
SSCS047	SSCS102	SSPB1211	SSPB2202	SSPB3209	SSPB4323
SSCS048	SSCH104	SSPB1212	SSPB2203	SSPB3301	SSPB4324
SSCS050	SSCH105	SSPB1213	SSPB2209	SSPB3304	SSPB4325
SSCS051	SSCH106	SSPB1214	SSPB2210	SSPB3305	SSPB4327
SSCS054	SSCH109	SSCH1215	SSPB2212	SSPB3312	SSPB4328
sSSCS055	SSCH110	SSPB1218	SSPB2213	SSPB3314	SSPB4329
SSCS057	SSCH115	SSPB1219	SSPB2302	SSPB4107	SSPB4332

ราก่อโรคพืชแอนแทรกโนส *Colletotrichum* spp. และราก่อโรคพืชอื่นๆ ที่ใช้เป็นราทดสอบได้แก่ *Colletotrichum capsici* DOAC 1511, *Colletotrichum gloeosporioides* DOAC 0782, *Alternaria brassicicola* DOAC 0436, *Fusarium oxysporum* DOAC 1808, *F. subglutinans* DOAC 0761 *Helminthosporium oryzae* DOAC 2293 และ *Pestalotiopsis* sp. DOAC 1098 จัดซื้อจากกรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

ใช้อาหารที่เตรียมจากน้ำทะเล และน้ำจืด ดังนี้

Potato dextrose agar (Difco, USA) ผสมน้ำทะเลความเข้มข้น 30 ppt (PDA/$SW_{30\ ppt}$)

Potato dextrose broth (Difco, USA) / ผสมน้ำทะเลความเข้มข้น 30 ppt (PDB/$SW_{30\ ppt}$)

Potato dextrose broth/agar (Difco, USA) เตรียมด้วยน้ำกลั่น (PDA/dw/PDB/dw)

3. การเพาะเลี้ยงรา

นำราที่ต้องการศึกษามาเพาะเลี้ยงในอาหาร PDA/$SW_{30\ ppt}$ บ่มที่อุณหภูมิ 28°C เป็นเวลา 4-7 วัน จากนั้นใช้ cock borer ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร เจาะบริเวณขอบโคโลนีเชื้อรา นำไปเลี้ยงซ้ำบน PDA/$SW_{30\ ppt}$ บ่มที่อุณหภูมิห้อง 3-4 วัน ก่อนจะนำไปทดสอบในขั้นตอนต่อไป

ราก่อโรคพืช *Colletotrichum capsici* DOAC 1511 และ *C. gloeosporioides* DOAC 0782 รวมถึงราก่อโรคพืชอื่นๆ นำมาเพาะเลี้ยงในอาหาร PDA เตรียมจากน้ำกลั่น (PDA/dw) บ่มที่อุณหภูมิ 28°C เป็นเวลา 4-7 วัน จากนั้นใช้ cock borer เส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร เจาะบริเวณขอบโคโลนีรา นำไปเลี้ยงซ้ำบน PDA/dw อีกครั้งหนึ่ง บ่มที่อุณหภูมิห้อง 3-4 วัน ก่อนจะนำไปทดสอบในขั้นตอนต่อไป

4. การทดสอบคุณสมบัติการชอบเค็ม

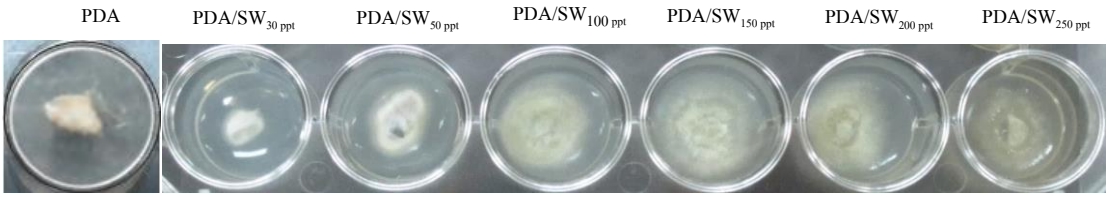
ทดสอบคุณสมบัติการชอบเค็มของราในจานเพาะเชื้อแบบ 24 หลุม (ดัดแปลงจาก Moubasher *et al.,* 1990) (ภาพที่ 2) โดยเลี้ยงราบนอาหาร PDA ปกติ และ PDA ที่ปรับความเค็มด้วยน้ำทะเลจนมีความเค็ม 15, 30, 50, 100, 150, 200 และ 250 ppt บ่มที่อุณหภูมิ 28°C เป็นเวลา 10 วัน จากนั้นสังเกตการเจริญของราและบันทึกผลการเจริญของราบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ความเค็มต่างๆ แปลผลการคุณสมบัติการชอบเค็มของรา ซึ่งดัดแปลงจาก Kushner (1993) โดยใช้เกณฑ์ดังนี้

เจริญเฉพาะบนอาหารที่ไม่มีความเค็ม: ไม่ชอบเค็ม (Non halophile)

เจริญได้สูงสุดบนอาหารที่มีความเค็ม 15 - 30 ppt: ชอบเค็มต่ำ (Mild halophile)

เจริญได้สูงสุดบนอาหารที่มีความเค็ม 50 - 150 ppt: ชอบเค็มปานกลาง (Moderate halophile)

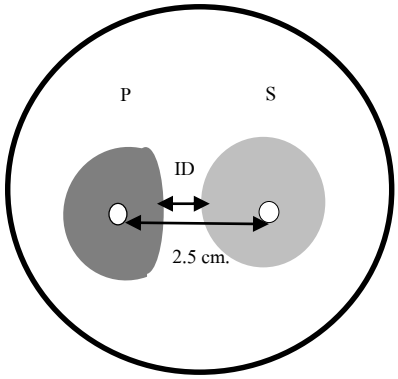
เจริญได้สูงสุดบนอาหารที่มีความเค็ม 200 - 250 ppt: ชอบเค็มสูง (Extreme halophile)



ภาพที่ 2 ลักษณะการศึกษาการเจริญรานาเกลือ บนอาหาร PDA ที่มีความเค็ม 0-250 ppt ในจานเพาะเชื้อแบบ 24 หลุม

5. การคัดกรองและศึกษาประสิทธิภาพของรานาเกลือในการยับยั้งรา่อโรคพืช โดยวิธี dual culture

การคัดกรองรานาเกลือที่สามารถยับยั้งรา่อโรคพืช (ดัดแปลงจาก Whipps, 1987) เริ่มจากใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6 เซนติเมตร ตัดขอบโคโลนีรานาเกลือและรา่อโรคพืช จากนั้นนำชิ้นวุ้นของราทั้งสองชนิดมาเลี้ยงร่วมกันบนอาหาร PDA/dw และ PDA/$SW_{30\ ppt}$ ให้ขอบชิ้นวุ้นห่างกัน 2.5 เซนติเมตร ในกรณีราที่เจริญช้า ให้วางชิ้นวุ้นรานั้นบนอาหารก่อน จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 28°C ทำการทดลอง 3 ซ้ำ สังเกตผลปฏิสัมพันธ์แบบ antibiosis บันทึกระยะทางที่รา่อโรคพืชถูกยับยั้งการเจริญ (Inhibition distance; ID) เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน และ 5 วัน ดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 การศึกษา inhibition distance (ID) ที่เกิดจากปฏิสัมพันธ์แบบ antibiosis โดยวิธี dual culture; S คือ รานาเกลือ, P คือ รา่อโรคพืช

นำรานาเกลือที่มีค่า inhibition distance >2 มิลลิเมตร มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งรา่อโรคพืชโดยวิธี dual culture ดังกล่าวข้างต้นอีกครั้ง แต่เพิ่มชุดควบคุมที่วางเฉพาะชิ้นวุ้นรา่อโรคพืช และเปลี่ยนวิธีการบันทึกผลเป็นการวัดขนาดโคโลนีของรา่อโรคพืชที่ถูกยับยั้งการเจริญเทียบกับขนาดโคโลนีราชุดควบคุมดังภาพที่ 4 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

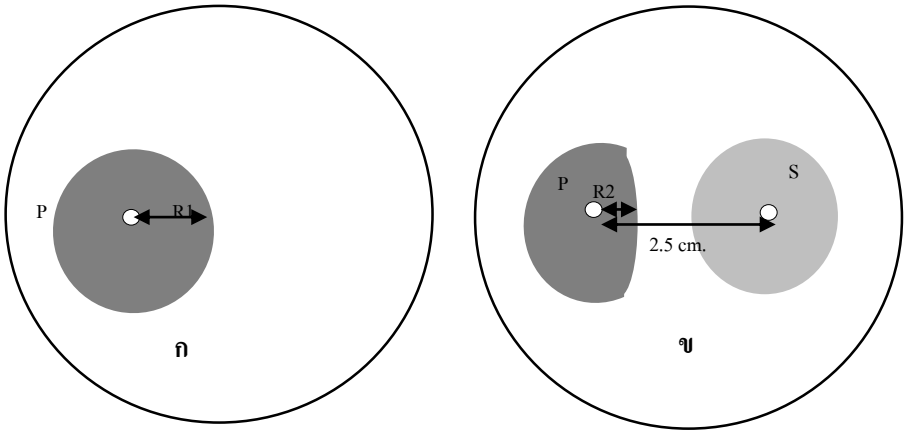
คำนวณประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญในหน่วยร้อยละ (Percentage inhibition efficiency, %IE) จากสูตร %IE = [(R1-R2)/R1] x 100 โดย R1 คือ รัศมีโคโลนีของราก่อโรคพืชในชุดควบคุม R2 คือ รัศมีโคโลนีของราก่อโรคพืชในชุดทดสอบ แปลผลร้อยละการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชด้วยรานาเกลือ ใช้เกณฑ์ประเมินประสิทธิภาพดังนี้

%IE ≥70 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งดีมาก (Strong antagonistic activity)

%IE 50 - <70 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งดี (High antagonistic activity)

%IE 35 - <50 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลาง (Moderate antagonistic activity)

%IE <35 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งน้อย (Low antagonistic activity)



ภาพที่ 4 การศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญที่เกิดจากปฏิสัมพันธ์แบบ antibiosis โดยวิธี dual culture; ก: ชุดควบคุม ข: ชุดทดสอบ, R1 คือ รัศมีโคโลนีของราก่อโรคพืชในชุดควบคุม R2 คือ รัศมีโคโลนีของราก่อโรคพืชด้านที่ถูกยับยั้งเมื่อเลี้ยงร่วมกับรานาเกลือในชุดทดสอบ P คือราก่อโรคพืช S คือรานาเกลือ

6. การเลี้ยงราในอาหารเหลวและการสกัดสาร

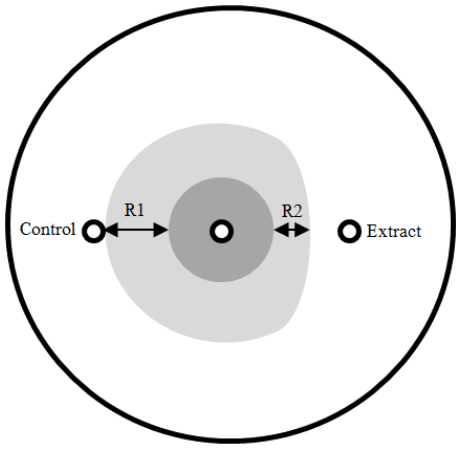
นำรานาเกลือที่เก็บรักษาไว้ มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA/$SW_{30\ ppt}$ บ่มที่อุณหภูมิ 28°C ประมาณ 3-5 วัน เมื่อเชื้อเจริญดี ใช้ cock borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร เจาะวุ้นบริเวณขอบโคโลนี 3 ชิ้นใส่ลงในอาหารเหลว potato dextrose broth (PDB, Difco USA) 100 มิลลิลิตร (ทำ 2 ฟลาสก์ ผสมและไม่ผสมน้ำทะเล) บ่มที่อุณหภูมิ 28°C โดยตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 10 วัน เมื่อครบกำหนด นำมากรองแยกเส้นใยราออกจากอาหารเหลว ด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 นำอาหารเหลวมาสกัดด้วย ethyl acetate (EtOAc) อัตราส่วน 1:1 ในกรวยแยก โดยเขย่ากรวยแยกประมาณ 15 นาที แล้ววางตั้งทิ้งไว้ประมาณ 10 นาทีเพื่อให้สารแยกชั้น นำส่วนอาหารเหลวมาสกัดซ้ำด้วย EtOAc ในลักษณะเดียวกันอีก 1-2 ครั้ง นำสารส่วน EtOAc ทั้งหมดมาระเหยแห้งด้วย rotary

evaporator จะได้สารสกัดหยาบ ชั่งน้ำหนักสารสกัดที่ได้ จากนั้นนำสารสกัดหยาบมาละลายด้วย dimethyl sulphoxide (DMSO) 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อใช้ทดสอบในขั้นต่อไป

7. การศึกษาฤทธิ์ต้านราแอนแทรกโนสของสารสกัดจากรา

นำสารสกัดที่เตรียมจากอาหารเลี้ยงรา PDA/dw มาทดสอบความสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Colletotrichum capsici* DOAC 1511 และ *C. gloeosporioides* DOAC 0782 ด้วยวิธี disc diffusion เริ่มจากใช้ cock borer เส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร เจาะวุ้นเชื้อรา *C. capsici* หรือ *C. gloeosporioides* ที่เลี้ยงไว้ 3 วันที่อุณหภูมิห้องมาวางบนอาหาร PDA/dw จากนั้นนำแผ่นดิสค์ที่หยดสารสกัดปริมาตร 20 ไมโครลิตร และแผ่นดิสค์ที่มีสารละลาย DMSO ปริมาตร 20 ไมโครลิตร (ชุดควบคุม) มาวางบนจานเพาะเชื้อ ตรงข้ามกับรา *C. capsici* หรือ *C. gloeosporioides* โดยวางกัน disc ละฝั่ง ให้ห่างจากขอบโคโลนี 1 เซนติเมตร (ภาพที่ 5) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3-5 วัน ในวันที่เส้นใย *Colettotrichum* spp. เจริญมาถึงขอบแผ่นดิสค์ที่มี DMSO อยู่ บันทึกระยะทางที่ราก่อโรคพืชเจริญเพิ่มขึ้นหลังวาง disc โดยวัดฝั่งที่ถูกสารสกัดยับยั้ง (R2) และฝั่งที่เจริญเข้าหาแผ่นดิสค์ที่มี DMSO อยู่ (R1, 1 เซนติเมตร) และคำนวณร้อยละการยับยั้งการเจริญจากสูตร R1-R2 x100 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ บันทึกค่าเฉลี่ย ทำการทดลองข้างต้นซ้ำอีกครั้งหนึ่ง โดยปลี่ยนมาเป็นสารสกัดที่เตรียมจากอาหารเลี้ยงรา PDA/$SW_{30\ ppt}$

สารสกัดที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *Colletotrichum* spp. ดี จะถูกนำมาทดสอบกับราก่อโรคพืชอีก 5 ชนิด ด้วยวิธีการเดียวกัน คือ *Alternaria brassicicola* DOAC 0436, *Fusarium oxysporum* DOAC 1808, *F. subglutinans* DOAC 0761, *Helminthosporium oryzae* DOAC 2293 และ *Pestalotiopsis* sp. DOAC 1098 ด้วยวิธี disc diffusion เทียบกับ disc ควบคุม DMSO



ภาพที่ 5 ตัวแปรที่ใช้คำนวณร้อยละการยับยั้งการเจริญ (%IE) ของสารสกัดที่เตรียมจากอาหารเลี้ยงรานาเกลือเมื่อทดสอบ ด้วยวิธี disc diffusion, R1 และ R2 คือระยะทางที่ราก่อโรคพืชเจริญเพิ่มขึ้นหลังวาง disc จากการวัดฝั่งที่เจริญเข้าหาแผ่นดิสค์ควบคุม และฝั่งที่ถูกสารสกัดยับยั้ง ตามลำดับ

8. การศึกษาหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากอาหารเลี้ยงรานาเกลือในการยับยั้งการเจริญของรา และฆ่าราโดยวิธี agar dilution

ศึกษาหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากอาหารเลี้ยงรานาเกลือในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืช (ดัดแปลงจาก Kim *et al.,* 2012) โดยตัดชิ้นราจากขอบโคโลนีราก่อโรคพืช ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6 มิลลิเมตร วางชิ้นวุ้นราบนอาหาร ในจานเพาะเชื้อแบบ 24 หลุม ที่มี PDA/dw ปริมาตรหลุมละ 500 ไมโครลิตร ซึ่งผสมอยู่กับสารสกัดให้มีความเข้มข้นลดลงตามลำดับครั้งละ 1 เท่า ตั้งแต่ 2,048-256 ไมโครกรัมกรัมต่อมิลลิลิตร (µg/ml) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28°C เป็นเวลา 3 และ 5 วัน ทำการทดสอบ 2 ซ้ำ โดยชุดควบคุมลบ คือ PDA/dw ที่เติมสารละลาย 10% DMSO ตรวจผลโดยดูการเจริญของเชื้อทดสอบในหลุม บันทึกผลค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (MIC)

การศึกษาหาค่าความเข้มข้นของเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดในการทำลายรา (MLC) ทำโดยนำชิ้นวุ้นราในหลุมที่ทำ MIC และผ่านการบ่ม 5 วัน โดยไม่พบราเจริญ มาวางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA/dw บ่มที่อุณหภูมิ 28°C เป็นเวลา 5 วัน เมื่อครบกำหนดอ่านผลโดยตรวจดูการเจริญของราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ บันทึกค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดในหลุมที่ไม่พบการเจริญ

9. การจัดจำแนกราทางสัณฐานวิทยา

ศึกษาลักษณะการเจริญของราภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo และ ศึกษาโครงสร้างสืบพันธุ์ของราโดยเทคนิคการเพาะเชื้อบนบนสไลด์ (Slide culture) ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ compound บันทึกอัตราการเจริญและลักษณะโคโลนี พร้อมทั้งถ่ายภาพ ทำการจำแนกชนิดของราเทียบกับคู่มือ Illustrated genera of imperfect fungi (Barnett & Hunter, 2006) และคู่มือของ Frisvad & Samson, *et al.* (2004) เป็นหลัก

10. การจัดจำแนกราทางอณูพันธุศาสตร์

10.1 การสกัดดีเอ็นเอ

ราจากจังหวัดจันทบุรีและฉะเชิงเทรา ใช้วิธีของ Atkins & Clark (2004) โดยนำเส้นใยรามาทำให้แข็งด้วยไนโตรเจนเหลว บดเส้นใยให้เป็นผง ทำให้เส้นใยแตกด้วย lysis buffer (100 mM Tris-Cl, 100 mM NaCl, 20 mM EDTA และ 2% SDS) สกัดโปรตีนด้วย phenol และ chloroform-isoamyl alcohol ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย ethanol จากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอใน TE buffer และเก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

ราจากจังหวัดเพชรบุรี นำเส้นใยรามาสกัดด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป E.Z.N.A.® Forensic DNA Kit (Omega Bio-tek) และดำเนินการสกัดตามคำแนะนำในชุดสกัด

10.2 การเพิ่มปริมาณยีนเครื่องหมายโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase chain reaction, PCR)

นำดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดมาใช้เป็นแม่แบบสำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยผสมองค์ประกอบต่างๆ ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2 ลงในหลอดสำหรับทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ คู่ไพร์เมอร์ที่ใช้คือ ITS5/ITS4 (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG/TCCTCCGCTTATTGATATGC) สำหรับเพิ่มปริมาณ DNA บริเวณ ITS ของยีน rRNA ไพร์เมอร์ Bt2a/Bt2b (GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC/ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC) สำหรับเพิ่มปริมาณยีน beta tubulin นำหลอดปฏิกิริยาที่เตรียมได้ไปดำเนินปฏิกิริยาพีซีอาร์ในเครื่อง thermal cycler จำนวน 35 รอบ โดยสภาวะของการดำเนินปฏิกิริยามีขั้นตอนการดำเนินปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังแสดง ในตารางที่ 3-4 ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส

10.3 การอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์

นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ทำบริสุทธิ์แล้ว ส่งไปอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ (Macrogen, Korea)

10.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของราแต่ละไอโซเลทที่ได้จากการอ่าน โดยใช้ไพร์เมอร์แต่ละเส้นมาสร้าง contig โดยใช้โปรแกรม BioEdit และนำไปวิเคราะห์ความคล้ายคลึงโดยเปรียบเทียบกับข้อมูลสาธารณะในฐานข้อมูล GenBank บน NCBI (National Center for Biotechnology Information; http://www.ncbi.nlm.nih.gov) ใช้โปรแกรม Basic alignment search tool (BLASTn)

11. การเก็บรักษาเชื้อ

นำเชื้อที่แยกได้มา subculture ในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง บ่มที่อุณหภูมิ 25°C จนกว่าเชื้อจะเจริญใส่น้ำมันพาราฟินปราศจากเชื้อจนท่วมอาหารที่มีอยู่ในหลอด พันจุกหลอดด้วยพาราฟิล์ม เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25°C ราที่คาดว่าเป็นราชนิดใหม่หรือมีคุณสมบัติน่าสนใจจะส่งไปเก็บรักษาไว้ที่ศูนย์รวบรวมสายพันธุ์รา Biotec Culture Collection (BCC)

ตารางที่ 2 องค์ประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์ เพื่อเพิ่มจำนวนยีน beta tubulin และ DNA บริเวณ ITS

สารองค์ประกอบ	Beta tubulin	ITS
10X reaction buffer	1X	1X
50 mM $MgCl_2$	2.5 mM	2.5 mM
10 mM dNTP (mix)	0.2 mM	0.2 mM
10 µM primer	Bt2a/Bt2b	ITS5/ITS4
- forward	0.2 µM	0.2 µM
- reverse	0.2 µM	0.2 µM
Taq DNA polymerase	1U	1U
template	50-100 ng	50-100 ng
ปริมาตรรวม	50 µl	50 µl

ตารางที่ 3 ขั้นตอนของการดำเนินปฏิกิริยาพีซีอาร์ DNA บริเวณ ITS

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลาที่ใช้ต่อรอบ	จำนวนรอบ
Initial denaturation	94	3 นาที	1
Denaturation	94	1 นาที	35
Annealing	53	1 นาที	
Extension	72	2 นาที	
Final extension	72	10 นาที	1

ตารางที่ 4 ขั้นตอนของการดำเนินปฏิกิริยาพีซีอาร์ยีน beta tubulin

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลาที่ใช้ต่อรอบ	จำนวนรอบ
Initial denaturation	96	2 นาที	1
Denaturation	96	1 นาที	35
Annealing	53	1 นาที	
Extension	72	1.5 นาที	
Final extension	72	10 นาที	1

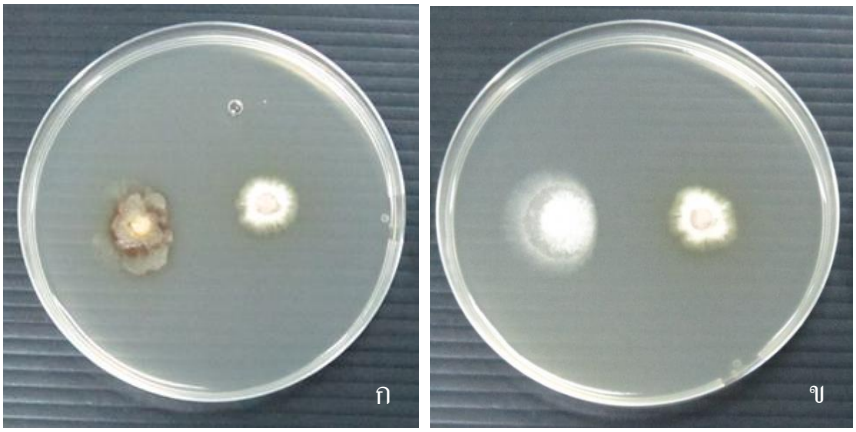
บทที่ 4

ผลการทดลอง

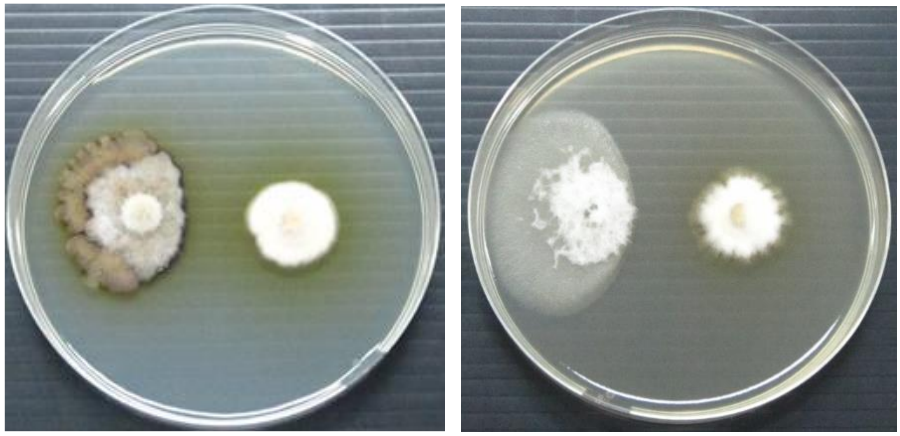
1. การคัดกรองราที่สามารถยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืช โดยวิธี dual culture

การคัดกรองราที่สามารถยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืช 2 ชนิด คือ *C. capsici* DOAC 1511 และ *C. gloeosporioides* DOAC 0782 โดยวิธี dual culture บนอาหาร PDA/dw และ PDA/$SW_{30\ ppt}$ ที่บ่มเป็นเวลา 3 วัน และ 5 วัน พบรานาเกลือจำนวน 64 สายพันธุ์ (42.7%) จากจำนวนทั้งหมด 150 สายพันธุ์ สามารถยับยั้งราก่อโรคพืชโดยเกิดปฏิสัมพันธ์แบบ antibiosis มีระยะทางที่ราก่อโรคพืชถูกยับยั้งการเจริญ (Inhibition distance, ID) มากกว่า 2 มิลลิเมตร ระยะเวลาที่เลี้ยงราร่วมกัน 3 วัน มีค่า ID มากกว่าเมื่อเลี้ยงราร่วมกัน 5 วัน และรานาเกลือสามารถสร้างสารยับยั้งราก่อโรคพืชได้ดีทั้งบนอาหาร PDA/dw และ PDA/$SW_{30\ ppt}$ แต่ความสามารถในการยับยั้งราก่อโรคพืชแตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ (ตารางที่ 5)

เมื่อนำรานาเกลือ ที่มีค่า ID มากกว่า 2 มิลลิเมตรจำนวน 62 สายพันธุ์ ไปศึกษาการยับยั้งการเจริญราก่อโรคพืชซ้ำโดยวิธี dual culture อีกครั้ง แต่เปลี่ยนจากการหาค่า ID เป็นการวิเคราะห์ประสิทธิภาพในหน่วยร้อยละของการยับยั้ง (Percentage inhibition efficiency; %IE) พบว่ารานาเกลือมีประสิทธิภาพ ในการยับยั้งราก่อโรคพืชแตกต่างกันขึ้นกับชนิดราทดสอบ ระยะเวลาที่เลี้ยงร่วมกัน และความเค็มของอาหารที่ใช้ทดสอบ รานาเกลือจำนวน 50 สายพันธุ์ (80.6%) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคพืชอย่างน้อย 1 ชนิด ทั้งในสภาวะการเลี้ยงที่มีความเค็มหรือไม่มีความเค็มด้วย %IE มากกว่าหรือเท่ากับ 35 (ตารางที่ 6) ในจำนวนนี้ รานาเกลือ 44 สายพันธุ์ (71.0%) ยับยั้งได้ดีทั้ง *C. capsici* DOAC 1511 และ *C. gloeosporioides* DOAC 0782 รานาเกลือ 9 สายพันธุ์คือ SSCS069 SSPB1218 SSPB4107 SSPB4215 SSPB4225 SSPB4235 SSPB4307 SSPB4309 และ SSPB4325 ยับยั้งได้ดีทั้ง *C. capsici* DOAC1511 และ *C. gloeosporioides* DOAC 0782 ไม่ว่าจะเลี้ยงร่วมกับราก่อโรคพืช 3 วันหรือ 5 วัน ในสภาวะความเค็มทั้ง 2 แบบ รา SSPB4207 SSPB4225 และ SSPB4235 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งทั้งราก่อโรคพืช *C. capsici* DOAC 1511 และ *C. gloeosporioides* DOAC 0782 ด้วย %IE >70 เมื่อเลี้ยงราร่วมกันในสภาวะใดสภาวะหนึ่ง รานาเกลือที่แสดงประสิทธิภาพดีที่สุด คือ SSPB4225 มีค่า %IE เท่ากับ 75.0 และ 76.0 ในการยับยั้งราก่อโรคพืช *C. capsici* DOAC 1511 และ *C. gloeosporioides* DOAC 0782 เมื่อเลี้ยงร่วมกันบนอาหาร PDA/$SW_{30\ ppt}$ เป็นเวลา 5 วัน ราที่ยับยั้งได้ดีรองลงคือ SSPB4207 มี %IE ต่อราก่อโรคพืชทั้ง 2 ชนิด เท่ากับ 75.0 และ73.0 ตามลำดับ (ภาพที่ 6 และ7) %IE จำนวนรานาเกลือที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *C. capsici* DOAC 1511 และ *C. gloeosporioides* DOAC 0782 ได้ ไม่แตกต่างกัน และเมื่อเลี้ยงราร่วมกันเป็นเวลา 3 วัน ราส่วนใหญ่ แสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคพืชในระดับต่ำถึงปานกลาง แต่เมื่อเลี้ยงร่วมกัน 5 วัน รานาเกลือส่วนใหญ่แสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งดีขึ้นกว่าระดับเดิม (ตารางที่ 7)



ภาพที่ 6 ฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคแอนแทรกโนสของราจากนาเกลือ SSPB4207 (ด้านขวาของจานอาหาร) ในการยับยั้งราก่อโรคพืช (ด้านซ้ายของจานอาหาร) (ก) *C. capsici* DOAC 1511 และ (ข) *C. gloeosporioides* DOAC 0782 บนอาหาร PDA/$SW_{30\ ppt}$



ภาพที่ 7 ฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคแอนแทรกโนสของราจากนาเกลือ SSPB4225 (ด้านขวาของจานอาหาร) ในการยับยั้งราก่อโรคพืช (ด้านซ้ายของจานอาหาร) (ก) *C. capsici* DOAC 1511 และ (ข) *C. gloeosporioides* DOAC 0782 บนอาหาร PDA/$SW_{30\ ppt}$

ตารางที่ 7 จำนวนสารรานาเกลือที่แสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคพืชที่ระดับ %IE ต่าง ๆ กัน เมื่อเลี้ยงร่วมกัน เป็นเวลา 3 และ 5 วัน

ราก่อโรคพืช	อาหารที่ใช้เลี้ยง	ระยะเวลาเลี้ยงร่วมกัน	จำนวนรานาเกลือที่แสดงกิจกรรมชอบเค็มที่ระดับต่างๆ*				
			Not shown	Low	Moderate	High	Strong
C. capsici DOAC 1511	PDA/dw	3 วัน	22	27	10	3	0
		5 วัน	19	13	13	17	0
	$PDA/SW_{30\ ppt}$	3 วัน	20	14	17	11	0
		5 วัน	17	4	8	26	7
C. gloeosporioides DOAC 0782	PDA/dw	3 วัน	9	30	12	11	0
		5 วัน	9	14	15	24	0
	$PDA/SW_{30\ ppt}$	3 วัน	13	20	11	16	2
		5 วัน	15	5	6	28	8

*รานาเกลือที่ใช้ทดสอบมีทั้งหมด 62 สายพันธุ์, Strong activity (%IE ≥70): มีประสิทธิภาพในการยับยั้งดีมาก, High activity (%IE 50 - <70): มีประสิทธิภาพในการยับยั้งดี, Moderate activity (%IE 35 - <50) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลาง, Low activity (%IE <35) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งน้อย

2. การศึกษาคุณสมบัติการชอบเค็มของราที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชด้วย %IE มากกว่าหรือเท่ากับ 35

เมื่อนำราที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชด้วย %IE ≥ 35 มาศึกษาความสามารถในการเจริญและขนาดโคโลนี เพื่อประเมินความชอบเค็ม พบว่าราทั้งหมดเป็น facultative halophile คือเจริญได้ทั้งในน้ำจืดและน้ำเค็มและเจริญได้ที่ความเค็มสูงสุดแตกต่างกันไปตามแต่สายพันธุ์ (ตารางที่ 8 และตารางที่ 9)

ตารางที่ 5 ระยะทางที่รานาเกลือยับยั้งการเจริญราก่อโรคพืช (ID) เมื่อเลี้ยงร่วมกันบนอาหารที่มีความเค็มต่างกันเป็นระยะเวลา 3 วัน และ 5 วัน

ลำดับ	รานาเกลือ	ระยะทางที่ราสาเหตุโรคพืชถูกยับยั้งการเจริญ (มิลลิเมตร)							
		C. capsici DOAC 1511				*C. gloeosporioides* DOAC 0782			
		PDA/dw		PDA/SW $_{30\ ppt}$		PDA/dw		PDA/SW $_{30\ ppt}$	
		3 วัน	5 วัน	3 วัน	5 วัน	3 วัน	5 วัน	3 วัน	5 วัน
1	SSCH001	-	-	-	-	-	-	-	-
2	SSCH003	-	-	-	-	-	1.00±0.00	-	-
3	SSCH006	3.50±0.71	-	2.50±0.71	-	1.50±0.71	-	1.00±0.00	-
4	SSCH011	-	-	-	-	-	-	-	-
5	SSCH014	-	-	-	-	-	-	-	-
6	SSCH015	-	-	-	-	-	-	-	-
7	SSCH017	-	-	-	-	-	-	-	-
8	SSCH019	-	-	-	-	11.00±0.00	6.00±0.00	10.00±0.00	4.00±0.00
9	SSCH022	-	-	-	-	-	-	-	-
10	SSCH024	-	-	-	-	-	-	-	-
11	SSCH026	-	-	-	-	-	-	-	-
12	SSCH031	-	-	-	-	8.00±0.00	1.00±0.00	11.00±0.00	2.00±0.00
13	SSCH032	-	-	-	-	-	-	-	-
14	SSCH033	-	-	-	-	-	-	-	-
15	SSCS034	-	-	-	-	2.00±0.00	-	-	-

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่เกิดปฏิสัมพันธ์แบบ antibiosis

ตารางที่ 5 ระยะทางที่รานาเกลือยับยั้งการเจริญราก่อโรคพืช (ID) เมื่อเลี้ยงร่วมกันบนอาหารที่มีความเค็มต่างกันเป็นระยะเวลา 3 วัน และ 5 วัน (ต่อ)

ลำดับ	รานาเกลือ	ระยะทางที่ราสาเหตุโรคพืชถูกยับยั้งการเจริญ (มิลลิเมตร)							
		C. capsici DOAC 1511				*C. gloeosporioides* DOAC 0782			
		PDA/dw		PDA/SW $_{30\ ppt}$		PDA/dw		PDA/SW $_{30\ ppt}$	
		3 วัน	5 วัน	3 วัน	5 วัน	3 วัน	5 วัน	3 วัน	5 วัน
16	SSCH035	-	-	-	-	-	-	-	-
17	SSCS044	-	-	-	-	-	-	15.00±0.00	2.00±0.00
18	SSCS045	-	-	-	-	-	1.00±0.00	-	-
19	SSCH047	-	-	-	-	-	-	-	-
20	SSCS048	-	-	-	-	-	-	-	-
21	SSCS050	-	-	-	-	-	-	-	-
22	SSCS051	-	-	-	-	-	-	-	-
23	SSCS054	-	-	-	-	-	-	-	-
24	SSCS055	-	-	-	-	-	-	-	-
25	SSCS057	-	-	-	-	-	-	-	-
26	SSCS064	-	-	-	-	-	-	-	-
27	SSCS066	-	-	-	-	10.50±0.71	1.50±0.71	-	-
28	SSCS069	17.00±0.00	14.50±0.71	16.50±0.71	13.00±0.00	17.00±0.00	13.00±0.00	13.50±0.71	9.50±0.71
29	SSCH070	10.00±0.00	5.00±0.00	8.00±0.00	3.00±0.00	12.00±0.00	6.00±0.00	7.00±0.00	2.00±0.71
30	SSCH072	-	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่เกิดปฏิสัมพันธ์แบบ antibiosis

ตารางที่ 5 ระยะทางที่รานาเกลือยับยั้งการเจริญราก่อโรคพืช (ID) เมื่อเลี้ยงร่วมกันบนอาหารที่มีความเค็มต่างกันเป็นระยะเวลา 3 วัน และ 5 วัน (ต่อ)

ลำดับ	รานาเกลือ	ระยะทางที่ราสาเหตุโรคพืชถูกยับยั้งการเจริญ (มิลลิเมตร)							
		C. capsici DOAC 1511				*C. gloeosporioides* DOAC 0782			
		PDA/dw		PDA/SW $_{30\ ppt}$		PDA/dw		PDA/sw	
		3 วัน	5 วัน	3 วัน	5 วัน	3 วัน	5 วัน	3 วัน	5 วัน
31	SSCS074	-	1.00±0.00	-	-	-	1.00±0.00	-	-
32	SSCS076	10.50±2.12	8.00±1.41	10.00±0.00	7.00±0.00	13.00±0.00	12.00±0.00	4.00±0.00	3.00±0.00
33	SSCS078	-	-	-	-	-	-	-	-
34	SSCS079	-	-	-	-	-	-	-	-
35	SSCS080	-	-	-	-	-	-	-	-
36	SSCS082	-	-	-	-	-	-	-	-
37	SSCS085	-	-	-	-	-	-	-	-
38	SSCS088	-	-	-	-	1.00±0.00	-	3.50±0.71	1.50±0.71
39	SSCS089	-	-	-	-	-	-	-	-
40	SSCS091	-	-	-	-	-	-	-	-
41	SSCS097	-	-	-	-	-	-	-	-
42	SSCS099	-	-	12.00±0.00	7.00±0.00	15.50±0.71	7.50±0.71	10.00±0.00	4.00±0.00
43	SSCS101	-	-	-	-	1.00±0.00	-	3.50±0.71	-
44	SSCS102	-	-	-	-	-	-	-	-
45	SSCH104	-	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่เกิดปฏิสัมพันธ์แบบ antibiosis

ตารางที่ 5 ระยะทางที่รานาเกลือยับยั้งการเจริญราก่อโรคพืช (ID) เมื่อเลี้ยงร่วมกันบนอาหารที่มีความเค็มต่างกันเป็นระยะเวลา 3 วัน และ 5 วัน (ต่อ)

ลำดับ	รานาเกลือ	ระยะทางที่ราสาเหตุโรคพืชถูกยับยั้งการเจริญ (มิลลิเมตร)							
		C. capsici DOAC 1511				*C. gloeosporioides* DOAC 0782			
		PDA/dw		PDA/SW $_{30\ ppt}$		PDA/dw		PDA/SW $_{30\ ppt}$	
		3 วัน	5 วัน	3 วัน	5 วัน	3 วัน	5 วัน	3 วัน	5 วัน
46	SSCH105	-	-	-	-	-	-	-	-
47	SSCH106	6.00±0.00	2.00±0.00	4.00±0.00	-	1.00±0.00	2.50±0.71	2.00±0.00	-
48	SSCH109	-	-	-	-	-	-	-	-
49	SSCH110	-	-	-	-	-	-	-	-
50	SSCH115	1.00±0.00	3.50±0.00	-	-	1.00±0.00	1.00±0.00	-	-
51	SSPB1105	-	-	-	5.00±0.00	-	-	-	-
52	SSPB1109	-	-	-	-	-	-	-	-
53	SSPB1110	16.00±0.00	14.00±0.00	12.00±0.00	7.00±0.00	13.00±0.00	10.00±0.00	12.00±0.00	8.00±0.00
54	SSPB1111	-	-	-	-	-	-	-	-
55	SSPB1116	-	9.50±0.71	-	6.00±0.00	-	8.00±0.00	-	8.50±0.71
56	SSPB1117	12.00±4.41	8.00±0.00	5.00±0.00	1.00±0.00	13.00±0.00	6.00±0.00	5.50±0.71	-
57	SSPB1118	-	-	-	-	-	-	-	-
58	SSPB1119	-	-	-	-	-	-	-	-
59	SSPB1120	-	-	-	-	-	-	-	-
60	SSPB1122	10.5±0.71	4.5±0.71	4.5±0.71	1.50±0.71	9.50±2.12	4.00±1.41	8.5±0.71	-

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่เกิดปฏิสัมพันธ์แบบ antibiosis

ตารางที่ 5 ระยะทางที่รานาเกลือยับยั้งการเจริญราก่อโรคพืช (ID) เมื่อเลี้ยงร่วมกันบนอาหารที่มีความเค็มต่างกันเป็นระยะเวลา 3 วัน และ 5 วัน (ต่อ)

ลำดับ	รานาเกลือ	ระยะทางที่ราสาเหตุโรคพืชถูกยับยั้งการเจริญ (มิลลิเมตร)							
		C. capsici DOAC 1511				*C. gloeosporioides* DOAC 0782			
		PDA/dw		PDA/SW $_{30\ ppt}$		PDA/dw		PDA/SW $_{30\ ppt}$	
		3 วัน	5 วัน	3 วัน	5 วัน	3 วัน	5 วัน	3 วัน	5 วัน
61	SSPB1123	-	-	-	-	-	-	-	-
62	SSPB1126	-	-	-	-	-	-	-	-
63	SSPB1128	-	-	-	-	-	-	-	-
64	SSPB1130	10.00±0.00	7.50±0.71	8.50±0.71	5.50±2.12	11.00±0.00	5.50±0.71	1.00±0.00	-
65	SSPB1204	-	-	-	-	-	8.00±0.00	-	1.00±0.00
66	SSPB1206	-	-	-	-	-	-	-	-
67	SSPB1209	8.50±0.71	3.50±0.71	9.50±0.71	2.50±0.71	7.50±0.71	2.00±0.00	10.00±0.00	3.00±0.00
68	SSPB1210	5.00±0.71	-	6.00±0.71	-	7.50±0.71	-	6.50±0.71	-
69	SSPB1211	6.00±0.00	3.00±0.00	2.50±0.71	1.00±0.00	8.50±0.71	2.00±0.00	5.00±0.00	1.00±0.00
70	SSPB1212	-	-	6.00±0.00	4.50±2.15	-	-	8.50±0.71	2.00±0.00
71	SSPB1213	-	-	-	-	-	-	-	-
72	SSPB1214	-	-	-	-	-	-	-	-
73	SSPB1215	-	-	-	-	-	-	-	-
74	SSPB1218	17.00±0.00	16.00±0.00	17.00±0.00	16.00±1.41	19.00±0.00	15.00±0.00	14.00±0.00	12.00±0.00
75	SSPB1219	-	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่เกิดปฏิสัมพันธ์แบบ antibiosis

ตารางที่ 5 ระยะทางที่รานาเกลือยับยั้งการเจริญราก่อโรคพืช (ID) เมื่อเลี้ยงร่วมกันบนอาหารที่มีความเค็มต่างกันเป็นระยะเวลา 3 วัน และ 5 วัน (ต่อ)

ลำดับ	รานาเกลือ	ระยะทางที่ราสาเหตุโรคพืชถูกยับยั้งการเจริญ (มิลลิเมตร)							
		C. capsici DOAC 1511				*C. gloeosporioides* DOAC 0782			
		PDA/dw		PDA/SW $_{30\ ppt}$		PDA/dw		PDA/SW $_{30\ ppt}$	
		3 วัน	5 วัน	3 วัน	5 วัน	3 วัน	5 วัน	3 วัน	5 วัน
76	SSPB1301	-	-	-	-	10.50±0.71	4.00±0.00	2.50±0.71	-
77	SSPB1302	-	-	-	-	11.00±0.00	2.00±0.00	-	-
78	SSPB1303	-	-	-	-	-	-	-	-
79	SSPB1306	-	-	-	-	-	-	-	-
80	SSPB1307	-	-	-	-	-	-	-	-
81	SSPB1308	-	-	-	-	-	-	-	-
82	SSPB1309	-	-	-	1.50±0.71	-	-	1.00±0.00	1.00±0.00
83	SSPB1310	-	-	-	-	-	-	-	-
84	SSPB1311	-	-	-	-	-	-	-	-
85	SSPB1312	-	-	-	-	7.50±3.54	1.00±1.41	8.00±0.00	-
86	SSPB1314	-	-	-	-	-	-	-	-
87	SSPB1315	-	-	-	-	-	-	-	-
88	SSPB2101	-	-	-	-	-	-	-	-
89	SSPB2102	-	-	-	-	-	-	-	-
90	SSPB2103	-	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่เกิดปฏิสัมพันธ์แบบ antibiosis

ตารางที่ 5 ระยะทางที่รานาเกลือยับยั้งการเจริญราก่อโรคพืช (ID) เมื่อเลี้ยงร่วมกันบนอาหารที่มีความเค็มต่างกันเป็นระยะเวลา 3 วัน และ 5 วัน (ต่อ)

ลำดับ	รานาเกลือ	ระยะทางที่ราสาเหตุโรคพืชถูกยับยั้งการเจริญ (มิลลิเมตร)							
		C. capsici DOAC 1511				*C. gloeosporioides* DOAC 0782			
		PDA/dw		PDA/SW $_{30\ ppt}$		PDA/dw		PDA/SW $_{30\ ppt}$	
		3 วัน	5 วัน	3 วัน	5 วัน	3 วัน	5 วัน	3 วัน	5 วัน
91	SSPB2104	-	6.50±0.71	-	3.00±0.00	-	11.00±0.00	-	6.00±0.00
92	SSPB2107	-	-	-	6.00±0.00	-	-	-	-
93	SSPB2108	-	-	-	-	-	-	-	-
94	SSPB2202	-	-	8.00±1.41	1.50±0.71	11.00±1.41	1.50±0.71	-	-
95	SSPB2203	-	-	-	-	-	-	-	-
96	SSPB2209	-	-	-	-	-	-	-	-
97	SSPB2210	8.00±0.00	3.00±1.41	6.00±0.00	2.00±0.00	12.00±0.00	2.5±0.71	10.00±0.00	2.00±0.00
98	SSPB2212	-	-	-	-	-	-	-	-
99	SSPB2213	-	-	-	4.00±0.00	-	-	-	3.00±0.00
100	SSPB2302	-	-	-	-	-	-	-	-
101	SSPB2303	-	-	-	-	-	-	-	-
102	SSPB2304	-	-	-	-	-	-	-	-
103	SSPB2305	-	-	-	-	-	-	-	-
104	SSPB2308	-	-	-	-	-	-	-	-
105	SSPB2310	-	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่เกิดปฏิสัมพันธ์แบบ antibiosis

ตารางที่ 5 ระยะทางที่รานาเกลือยับยั้งการเจริญราก่อโรคพืช (ID) เมื่อเลี้ยงร่วมกันบนอาหารที่มีความเค็มต่างกันเป็นระยะเวลา 3 วัน และ 5 วัน (ต่อ)

ลำดับ	รานาเกลือ	ระยะทางที่ราสาเหตุโรคพืชถูกยับยั้งการเจริญ (มิลลิเมตร)							
		C. capsici DOAC 1511				*C. gloeosporioides* DOAC 0782			
		PDA/dw		PDA/SW $_{30\ ppt}$		PDA/dw		PDA/SW $_{30\ ppt}$	
		3 วัน	5 วัน	3 วัน	5 วัน	3 วัน	5 วัน	3 วัน	5 วัน
106	SSPB3101	-	-	9.50±0.71	3.00±0.00	15.00±0.00	11.50±0.71	11.50±0.71	5.50±0.71
107	SSPB3104	-	-	-	-	-	-	-	-
108	SSPB3108	-	-	-	-	-	-	-	-
109	SSPB3111	10.50±0.71	6.50±0.71	3.00±1.41	-	13.00±0.00	10.00±0.00	3.00±0.00	2.00±0.00
110	SSPB3112	-	-	-	-	-	-	-	-
111	SSPB3114	-	2.00±0.00	-	-	-	14.00±0.00	-	-
112	SSPB3117	-	-	-	-	11.00±0.00	4.50±0.71	6.00±0.00	-
113	SSPB3120	-	-	-	-	12.00±0.00	4.00±0.00	4.50±0.71	-
114	SSPB3124	11.50±0.71	7.00±0.00	9.00±1.41	5.00±1.41	12.50±0.71	8.00±0.00	6.50+0.71	2.00+0.00
115	SSPB3203	-	-	-	-	-	-	-	-
116	SSPB3204	-	-	-	-	-	-	-	-
117	SSPB3207	-	-	-	-	-	-	-	-
118	SSPB3208	13.00±1.41	8.00±0.00	14.00±0.00	7.50±0.71	11.00±1.41	7.50±0.71	9.00±0.00	4.00±0.00
119	SSPB3209	-	-	-	-	-	-	-	-
120	SSPB3301	8.00±0.00	6.00±0.00	6.50±0.71	-	5.50±0.71	1.00±0.00	14.00±0.00	10.00±0.00

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่เกิดปฏิสัมพันธ์แบบ antibiosis

ตารางที่ 5 ระยะทางที่รานาเกลือยับยั้งการเจริญราก่อโรคพืช (ID) เมื่อเลี้ยงร่วมกันบนอาหารที่มีความเค็มต่างกันเป็นระยะเวลา 3 วัน และ 5 วัน (ต่อ)

ลำดับ	รานาเกลือ	ระยะทางที่ราสาเหตุโรคพืชถูกยับยั้งการเจริญ (มิลลิเมตร)							
		C. capsici DOAC 1511				*C. gloeosporioides* DOAC 0782			
		PDA/dw		PDA/SW $_{30\ ppt}$		PDA/dw		PDA/SW $_{30\ ppt}$	
		3 วัน	5 วัน	3 วัน	5 วัน	3 วัน	5 วัน	3 วัน	5 วัน
121	SSPB3304	-	-	-	-	-	-	-	-
122	SSPB3305	-	-	-	-	-	-	-	-
123	SSPB3312	-	-	-	-	-	-	-	-
124	SSPB3314	-	-	-	-	-	-	-	-
125	SSPB4107	16.50±0.71	12.00±0.00	17.50±0.71	12.50±0.71	17.50±0.71	11.50±0.71	14.00±0.00	8.50±0.71
126	SSPB4108	1.50±0.71	-	6.50±0.71	2.50±0.71	8.00±1.41	4.50±0.71	1.00±0.00	-
127	SSPB4206	-	-	-	-	-	-	-	-
128	SSPB4207	19.00±0.00	16.00±0.00	16.00±0.00	11.00±0.0	16.00±0.00	12.00±0.00	16.00±0.0	10.00±0.0
129	SSPB4208	13.50±0.71	9.50±0.71	14.00±0.00	9.50±0.71	16.00±0.00	11.00±0.00	9.00±0.71	4.50±0.71
130	SSPB4215	16.50±0.71	12.50±0.71	15.00±0.00	10.00±0.0	17.00±1.41	12.00±1.41	15.00±1.4	10.00+0.0
131	SSPB4217	16.00±0.00	13.00±0.0	13.00±0.00	9.00±0.00	17.00±0.00	12.00±0.00	12.00±0.0	7.00±0.00
132	SSPB4225	16.50±0.71	14.00±1.4	16.00±0.00	12.50±0.7	15.50±0.71	10.50±0.71	16.00±0.0	12.00±0.0
133	SSPB4234	-	-	-	-	-	-	-	-
134	SSPB4235	18.50±0.71	18.50±0.7	18.50±0.71	16.50±0.7	16.50±0.71	12.50±0.71	17.50±0.7	12.00±0.0
135	SSPB4301	-	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่เกิดปฏิสัมพันธ์แบบ antibiosis

ตารางที่ 5 ระยะทางที่รานาเกลือยับยั้งการเจริญราก่อโรคพืช (ID) เมื่อเลี้ยงร่วมกันบนอาหารที่มีความเค็มต่างกันเป็นระยะเวลา 3 วัน และ 5 วัน (ต่อ)

ลำดับ	รานาเกลือ	ระยะทางที่ราสาเหตุโรคพืชถูกยับยั้งการเจริญ (มิลลิเมตร)							
		C. capsici DOAC 1511				*C. gloeosporioides* DOAC 0782			
		PDA/dw		PDA/SW $_{30\ ppt}$		PDA/dw		PDA/SW $_{30\ ppt}$	
		3 วัน	5 วัน	3วัน	5 วัน	3 วัน	5 วัน	3 วัน	5 วัน
136	SSPB4304	-	-	-	-	-	-	-	-
137	SSPB4307	13.00±0.00	10.50±0.71	12.50±0.71	10.00±0.00	15.00±0.00	10.50±0.71	15.00±0.00	10.00±0.00
138	SSPB4308	14.50±0.71	11.00±1.41	10.00±0.00	5.00±0.00	15.50±0.71	9.00±1.41	15.50±0.71	9.50±0.71
139	SSPB4309	13.00±0.00	9.50±0.71	8.00±0.00	4.00±0.00	13.50±0.71	9.00±0.00	11.00±0.00	5.50±0.71
140	SSPB4313	18.50±0.71	12.00±1.41	10.50±0.71	6.50±0.71	18.50±0.71	13.00±1.41	13.00±1.41	8.00±1.41
141	SSPB4319	13.00±0.00	7.50±0.71	10.00±0.00	5.50±0.71	15.00±0.00	8.00±0.00	9.50±0.71	3.50±0.71
142	SSPB4320	16.50±0.71	8.00±0.00	13.50±0.71	13.50±0.71	13.50±0.71	9.50±0.71	15.00±0.00	10.00±0.00
143	SSPB4321	10.50±0.71	5.00±0.00	8.00±0.00	4.00±0.00	9.00±0.00	8.00±0.00	7.00±0.00	4.50±0.00
144	SSPB4323	15.00±0.00	11.00±0.00	12.00±0.00	7.00±0.00	16.00±0.00	10.00±0.00	16.50±0.71	11.00±1.41
145	SSPB4324	15.00±0.00	10.50±0.71	16.00±0.00	13.00±0.00	15.00±0.00	11.50±0.00	11.00±0.00	6.00±0.00
146	SSPB4325	16.50±0.71	13.00±0.00	13.50±0.71	9.00±1.41	16.00±0.00	11.00±0.00	13.00±0.00	18.00±0.00
147	SSPB4327	15.50±0.71	11.00±1.41	13.50±0.71	9.50±0.71	11.50±0.71	6.00±0.00	13.00±0.00	7.00±0.00
148	SSPB4328	12.00±0.00	7.00±0.00	10.00±0.00	6.00±0.00	13.50±0.71	8.00±0.00	7.50±0.71	3.00±0.00
149	SSPB4329	11.50±0.71	8.50±0.71	10.00±0.00	5.50±0.71	13.00±0.00	10.00±0.00	8.50±0.71	4.50±0.71
150	SSPB4332	13.50±0.71	10.00±0.00	11.00±1.41	7.50±0.71	15.50±0.71	8.50±0.71	4.50±0.71	4.50±0.71

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่เกิดปฏิสัมพันธ์แบบ antibiosis

ตารางที่ 6 ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญ (%IE) รา่ก่อโรคพืชของรานาเกลือ เมื่อเลี้ยงร่วมกันบนอาหารที่มีความเค็มต่างกันเป็นระยะเวลา 3 วัน และ 5 วัน

ลำดับ	รานาเกลือ	ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเป็นร้อยละ (%IE)							
		C. capsici DOAC 1511				*C. gloeosporioides* DOAC 0782			
		PDA/dw		$PDA/SW_{30\ ppt}$		PDA/dw		$PDA/SW_{30\ ppt}$	
		3 วัน	5 วัน	3 วัน	5 วัน	3 วัน	5 วัน	3 วัน	5 วัน
1	SSCH006	20.00±0.00	-	22.22±3.85	-	27.27±0.00	-	16.16±3.5	-
2	SSCH019	-	-	-	-	30.23±0.00	0.52±0.00	30.00±10.	63.22±3.9
3	SSCH031	-	-	-	-	30.00±0.00	44.44±0.00	23.08±0.0	60.00±0.0
4	SSCS 034	-	-	-	-	6.98±0.00	-	-	-
5	SSCS044	-	-	8.00±0.00	39.29±0.0	-	-	20.00±0.0	47.12±1.9
6	SSCS066	-	-	-	-	15.15±5.25	29.15±2.79	-	-
7	SSCH069	40.00±0.00	60.00±0.00	60.00±0.00	76.00±0.0	45.45±0.00	60.00±0.00	55.01±3.5	68.89±1.9
8	SSCH070	23.33±5.77	22.22±3.85	31.11±3.85	42.67±6.1	27.27±0.00	40.00±0.00	20.25±0.0	43.33±0.0
9	SSCS076	30.0± 0.00	48.89±3.85	23.08±0.00	42.11±0.0	33.3±0.00	61.54±0.00	42.86+0.0	71.42±0.0
10	SSCS088	-	-	-	-	27.27±0.00	-	28.57±0.0	50.67±2.3
11	SSCS 099	-	-	18.70±0.00	49.61±2.7	23.33±5.77	21.40±9.38	38.87±5.5	49.35±2.0
12	SSCH106	13.33±5.77	13.33±7.64	31.11±3.85	-	27.30±9.14	40.00±0.00	-	-
13	SSCH115	10.00±0.00	15.56±10.1	-	-	33.33±5.25	40.00±0.00	-	-

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่เกิดปฏิสัมพันธ์แบบ antibiosis

ตารางที่ 6 ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญ (%IE) ราก่อโรคพืชของรานาเกลือ เมื่อเลี้ยงร่วมกันบนอาหารที่มีความเค็มต่างกันเป็นระยะเวลา 3 วัน และ 5 วัน (ต่อ)

ลำดับ	รานาเกลือ	ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเป็นร้อยละ (%IE)							
		C. capsici DOAC 1511				*C. gloeosporioides* DOAC 0782			
		PDA/dw		PDA/$SW_{30\ ppt}$		PDA/dw		PDA/$SW_{30\ ppt}$	
		3 วัน	5 วัน	3 วัน	5 วัน	3 วัน	5 วัน	3 วัน	5 วัน
14	SSPB1105	-	-	-	39.27±0.0	-	-	-	-
15	SSPB1110	23.33±5.77	37.50±0.00	10.25±4.44	39.27±4.0	23.08±0.00	29.41±0.00	4.45±3.85	28.57±0.00
16	SSPB1116	-	20.83±3.61	-	23.08±4.0	-	23.53±0.00	-	20.64±2.75
17	SSPB1117	40.00±0.00	41.02±4.44	37.78±3.85	58.67±2.3	30.00±0.00	44.44±0.00	28.21±4.44	-
18	SSPB1122	33.33±5.77	25.64±4.44	33.33±0.00	52.00±0.0	50.00±0.00	61.11±5.56	42.42±3.50	64.59±1.81
19	SSPB1130	16.67±5.77	35.55±3.85	48.89±7.70	65.33±4.6	30.00±0.00	44.44±0.00	23.08±0.00	60.00±0.00
20	SSPB1204	-	-	-	-	-	15.58±0.00	-	-
21	SSPB1209	30.00±0.00	42.31±0.00	27.44±3.93	50.62±0.0	2.77±4.81	29.39±2.84	27.45±6.79	50.58±1.98
22	SSPB1210	20.00±0.00	46.29+3.21	22.22±3.85	49.33±2.3	13.33±5.77	50.00±0.00	28.21±4.44	65.56±1.93
23	SSPB1211	10.00±0.00	20.51±4.45	42.22±3.85	58.67±2.3	16.66±5.78	36.70±2.92	27.78±0.00	53.13±0.00
24	SSPB1212	50.00±10.0	44.45±3.70	38.78±6.80	57.48±2.3	13.89±4.81	44.17±2.84	29.41±0.71	58.62±0.00
25	SSPB1218	40.00±0.00	56.25±0.00	48.72±11.7	70.31±8.4	58.97±4.45	56.86±3.39	60.00±0.00	66.67±0.00
26	SSPB 1301	-	-	-	-	12.12±2.25	35.72±2.59	-	-

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่เกิดปฏิสัมพันธ์แบบ antibiosis

ตารางที่ 6 ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญ (%IE) ราก่อโรคพืชของรานาเกลือ เมื่อเลี้ยงร่วมกันบนอาหารที่มีความเค็มต่างกันเป็นระยะเวลา 3 วัน และ 5 วัน (ต่อ)

ลำดับ	รานาเกลือ	ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเป็นร้อยละ (%IE)							
		C. capsici DOAC 1511				*C. gloeosporioides* DOAC 0782			
		PDA/dw		PDA/$SW_{30\ ppt}$		PDA/dw		PDA/$SW_{30\ ppt}$	
		3 วัน	5 วัน	3 วัน	5 วัน	3 วัน	5 วัน	3 วัน	5 วัน
27	SSPB1302	-	-	-	-	18.00±0.00	-	4.45±3.85	-
28	SSPB1312	-	-	-	-	0.37±0.64	11.11±3.85	33.33±4.12	41.33±2.30
29	SSPB2104	-	4.17±9.55	-	23.08±4.0	-	19.61±6.80	-	15.88±2.75
30	SSPB2202	6.67±5.77	27.08±7.22	-	43.32±0.0	10.25±4.44	15.68±6.80	8.89±10.18	-
31	SSPB2210	12.50±0.00	42.22±3.85	19.45±4.81	55.95±5.4	30.23±0.00	40.38±4.69	10.00±0.00	49.42±1.99
32	SSPB2213	-	-	-	20.00±0.0	-	-	-	33.33±0.00
33	SSPB 3101	-	-	-	-	-	-	-	-
34	SSPB 3111	-	-	-	-	-	-	-	-
35	SSPB3114	-	33.33±0.00	-	-	-	50.00±0.00	-	20.40±8.69
36	SSPB3117	-	-	-	-	1.11±0.00	8.89±3.85	21.43±0.00	-
37	SSPB3120	-	-	-	-	16.66±5.78	24.07±3.21	27.78±0.00	-
38	SSPB3124	26.67±5.77	41.02±4.44	33.33±0.00	58.67±2.3	50.00±0.00	55.55±0.00	51.28±4.45	66.67±2.31
39	SSPB3208	33.33±5.77	30.77±7.69	26.67±0.00	52.00±0.7	43.33±5.77	59.26±6.42	56.41±4.33	65.33±2.31

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่เกิดปฏิสัมพันธ์แบบ antibiosis

ตารางที่ 6 ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญ (%IE) รากอโรคพืชของรานาเกลือ เมื่อเลี้ยงร่วมกันบนอาหารที่มีความเค็มต่างกันเป็นระยะเวลา 3 วัน และ 5 วัน (ต่อ)

ลำดับ	รานาเกลือ	ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเป็นร้อยละ (%IE)							
		C. capsici DOAC 1511				*C. gloeosporioides* DOAC 0782			
		PDA/dw		$PDA/SW_{30\ ppt}$		PDA/dw		$PDA/SW_{30\ ppt}$	
		3 วัน	5 วัน	3 วัน	5 วัน	3 วัน	5 วัน	3 วัน	5 วัน
40	SSPB3301	-	-	34.96±8.31	35.00±0.0	1.11±0.00	26.67±0.00	16.67±4.12	41.33±2.30
41	SSPB4107	40.00±0.00	58.82±0.00	68.28±7.14	73.00±2.3	48.48±5.25	61.13±2.59	64.45±3.85	68.96±0.00
42	SSPB4108	-	5.99±3.70	45.58±00.0	53.36±6.2	0.00±0.83	27.75±2.84	49.02±3.39	58.62±0.00
43	SSPB4207	56.99±0.00	67.32±0.00	67.48±0.00	75.00±0.0	33.00±0.00	46.67±0.00	71.43±7.14	73.00±2.31
44	SSPB4208	16.67±5.77	47.06±0.00	42.86±0.00	64.00±0.0	36.36±0.00	58.15±2.59	40.00±6.67	56.32±5.27
45	SSPB4215	50.00±0.00	61.54±0.00	63.72±3.93	71.19±0.0	55.55±4.81	58.95±2.85	58.82±0.00	65.52±0.00
46	SSPB4217	33.33±1.11	55.71±4.04	49.88±4.34	62.50±0.0	43.33±0.58	46.15±0.00	52.38±4.12	69.05±2.06
47	SSPB4225	46.65±6.21	65.14±3.78	59.35±0.00	75.00±0.0	40.74±6.41	57.78±3.85	71.42±0.00	76.00±0.00
48	SSPB4235	46.65±6.21	65.14±3.78	53.93±4.69	71.66±2.8	40.74±6.41	53.33±0.00	61.91±4.13	72.00±0.00
49	SSPB4307	41.67±8.34	54.80±5.65	51.05±6.99	55.10±2.9	57.58±5.25	66.18±0.00	59.53±8.25	69.33±4.62
50	SSPB4308	26.67±5.77	30.77±0.00	40.00±6.67	60.00±0.0	50.00±0.00	55.55±0.00	61.53±0.00	70.67±2.31
51	SSPB4309	41.67±0.00	54.80±0.00	41.73±4.04	51.64±2.9	51.52±5.25	59.74±2.79	38.10±14.8	58.67±6.11
52	SSPB4313	33.33±5.77	33.33±4.44	44.45±3.85	62.67±2.3	30.00±10.00	38.89±5.56	51.28±4.45	66.67±2.31

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่เกิดปฏิสัมพันธ์แบบ antibiosis

ตารางที่ 6 ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญ (%IE) รากอ่อโรคพืชของรานาเกลือ เมื่อเลี้ยงร่วมกันบนอาหารที่มีความเค็มต่างกันเป็นระยะเวลา 3 วัน และ 5 วัน (ต่อ)

ลำดับ	รานาเกลือ	ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเป็นร้อยละ (%IE)							
		C. capsici DOAC 1511				*C. gloeosporioides* DOAC 0782			
		PDA/dw		$PDA/SW_{30\ ppt}$		PDA/dw		$PDA/SW_{30\ ppt}$	
		3 วัน	5 วัน	3 วัน	5 วัน	3 วัน	5 วัน	3 วัน	5 วัน
53	SSPB4319	23.33±5.57	55.56±0.00	46.67±0.00	68.00±0.0	43.33±5.77	51.85±3.21	48.72±4.45	72.22±1.9
54	SSPB4320	33.33±5.77	38.46±0.00	51.00±3.75	65.33±2.3	43.33±5.75	46.29±3.21	58.97±4.43	68.00±0.0
55	SSPB4321	30.00±0.00	55.56±0.00	40.00±0.00	60.00±0.0	36.67±5.77	57.41 ±3.20	35.90±4.44	61.11±1.9
56	SSPB4323	33.33±5.77	41.02±4.44	44.45±3.85	62.67±2.3	50.00±0.00	55.55±0.00	48.15±3.21	64.59±1.8
57	SSPB4324	33.33±5.77	54.17±3.61	51.54±0.00	79.76±0.0	56.41±4.45	62.75±3.40	51.11±3.85	61.90±0.0
58	SSPB4325	36.67±5.77	48.72±0.00	47.85±3.92	60.22±2.3	50.00±8.33	68.63±3.13	64.71±5.88	77.01±1.9
59	SSPB4327	30.00±0.00	58.86±3.70	52.38±6.80	67.08±4.1	27.78±4.81	47.45±2.85	58.82±0.00	67.82±1.9
60	SSPB4328	26.67±5.77	55.56±0.00	46.67±0.00	64.00±0.0	36.67±5.77	55.56±5.56	41.02±4.44	72.22±1.9
61	SSPB4329	30.00±0.00	55.56±0.00	53.00±0.00	68.00±0.7	40.00±0.00	55.56±0.00	38.46±0.00	67.67±0.0
62	SSPB4332	30.00±0.00	55.56±0.00	40.00±0.00	64.00±0.0	50.00±0.00	61.11±0.00	38.46±0.00	66.67±0.0

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่เกิดปฏิสัมพันธ์แบบ antibiosis

ตารางที่ 8 ระดับความชอบเค็มของรานาเกลือ

ลำดับ	รานาเกลือ	ความเค็มสูงสุดที่เจริญ	ลำดับ	รานาเกลือ	ความเค็มสูงสุดที่เจริญ
1	SSCS031	0-100	26	SSPB3124	0-150
2	SSCR034	0-100	27	SSPB3208	0-250
3	SSCR044	0-200	28	SSPB3301	0-250
4	SSCS069	0-250	29	SSPB4107	0-200
5	SSCS070	0-150	30	SSPB4108	0-200
6	SSCS076	0-100	31	SSPB4207	0-250
7	SSCS088	0-150	32	SSPB4208	0-250
8	SSCR097	0-100	33	SSPB4215	0-150
9	SSCS106	0-250	34	SSPB4217	0-200
10	SSCS115	0-250	35	SSPB4225	0-250
11	SSPB1105	0-100	36	SSPB4235	0-150
12	SSPB1110	0-100	37	SSPB4307	0-250
13	SSPB1117	0-250	38	SSPB4308	0-250
14	SSPB1122	0-250	39	SSPB4309	0-250
15	SSPB1130	0-250	40	SSPB4313	0-250
16	SSPB1209	0-100	41	SSPB4319	0-250
17	SSPB1210	0-150	42	SSPB4320	0-250
18	SSPB1211	0-50	43	SSPB4321	0-250
19	SSPB1212	0-150	44	SSPB4323	0-250
20	SSPB1218	0-150	45	SSPB4324	0-250
21	SSPB1301	0-150	46	SSPB4325	0-250
22	SSPB1312	0-200	47	SSPB4327	0-250
23	SSPB2202	0-250	48	SSPB4328	0-250
24	SSPB2210	0-100	49	SSPB4329	0-250
25	SSPB3114	0-100	50	SSPB4332	0-250

ตารางที่ 9 จำนวนรานาเกลือชอบเค็มที่ระดับต่างๆกัน

ระดับความเค็มสูงสุดที่เจริญ (ppt)	จำนวนสายพันธุ์	คุณสมบัติการชอบเค็ม
50	1	Mild halophile
100	9	Moderate halophile
150	9	Moderate halophile
200	5	Extreme halophile
250	26	Extreme halophile

3. การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากอาหารเลี้ยงรานาเกลือต่อการยับยั้งราก่อโรคพืช

เมื่อนำอาหารเหลวที่ผ่านการเลี้ยงรา 45 สายพันธุ์จากทั้งหมด 50 สายพันธุ์ที่ทดสอบเบื้องต้นแล้วว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งรา *C. gloeosporioides* DOAC 0782 และ *C. capsici* DOAC 1511 ชนิดใดชนิดหนึ่งมากกว่าร้อยละ 35 มาเลี้ยงในอาหาร PDB/dw และ PDB/$SW_{30\ ppt}$ นำ filtrate มาสกัด 2 ครั้ง ด้วย ethyl acetate จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาทดสอบกับราก่อโรคพืชทั้งสองสายพันธุ์นี้อีกครั้ง พบว่าสารสกัดจากราส่วนใหญ่ยับยั้งราก่อโรคพืชได้ (ตารางที่ 10) และยับยั้ง *C. gloeosporioides* DOAC 0782 ได้มากกว่า *C. capsici* DOAC 1511 สารสกัด 73 สาร (81.1%) จากรานาเกลือ 45 สายพันธุ์มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *C. capsici* DOAC 1511 และสารสกัด 78 สาร (86.7%) มีฤทธิ์ยับยั้ง *C. gloeosporioides* DOAC 0782) สารสกัดที่ยับยั้งราก่อโรคพืชชนิดใดชนิดหนึ่งหรือทั้งสองชนิดในระดับดีมาก มีประสิทธิภาพร้อยละ 70 ขึ้นไป (%IE $\geq$70) เมื่อเลี้ยงราด้วยอาหารเหลว PDB/dw หรือ PDB/$SW_{30\ ppt}$ สรุปไว้ในตารางที่ 11 และแสดงตัวอย่างดังภาพที่ 8-10 สารสกัดรหัส SSPB3208, SSPB3124, SSPB4207 และ SSPB4324 ยับยั้งราก่อโรคพืชได้ดีสุด รองลงมาคือ SSPB4107 และ SSPB4225 จำนวนสารสกัดที่เตรียมจากอาหารเลี้ยงราที่ความเค็มต่างกันมีประสิทธิภาพไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 12)

สารสกัดที่เตรียมจากอาหารที่ไม่เติมน้ำทะเลที่มาจากรา SSPB3208 ให้ผลยับยั้งสูงต่อ *C. capsici* DOAC 1511 และ *C. gloeosporioides* DOAC 0782 คือมีค่ายับยั้งที่ 60.0±10.00 และ 73.33±5.77 ตามลำดับ พบรานาเกลือเพียง 1 สายพันธุ์เท่านั้นคือ SSPB3124 ที่สามารถสร้างสารที่มีประสิทธิภาพดีมากในอาหารเหลวทั้งสองชนิด แต่ประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคพืชแต่ละชนิดแตกต่างกัน สารสกัด SSPB3124 จาก PDB/$SW_{30\ ppt}$ ยับยั้ง *C. capsici* DOAC 1511 ได้ดีกว่า *C. gloeosporioides* DOAC 0782 และสารสกัด SSPB3124 จาก PDB/dw ยับยั้ง *C. gloeosporioides* DOAC 0782 ได้ดีกว่า *C. capsici* DOAC 1511 มีค่า %IE สูงที่สุดเท่ากันคือ 80% สารสกัดจากรานาเกลือที่ผลิตสารที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *C. capsici* DOAC 1511 หรือ *C. gloeosporioides* DOAC 0782 ในระดับดีมาก เฉพาะในอาหารเหลว PDB/dw คือ SSCS106, SSCS115 SSPB3208 SSPB4107 และ

SSPB4329 สารสกัดที่มีประสิทธิภาพเฉพาะในอาหารเหลว PDB/$SW_{30\ ppt}$ คือ SSPB4207 SSPB4215 SSPB4225 และ SSPB4324

รานาเกลือที่สร้างสารที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งรา่อโรคพืชทั้งสองชนิดในระดับดีมาก เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเหลว PDB/$SW_{30\ ppt}$ คือ SSPB4207 และ SSPB4324 สารสกัด SSPB4207 จากอาหาร PDB/$SW_{30\ ppt}$ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช *C. capsici* DOAC 1511 มากกว่า *C. gloeosporioides* DOAC 0782 มีค่า %IE เท่ากับ 76.7 และ 70.0 ตามลำดับ ในทางกลับกันสารสกัด SSPB4324 จากอาหาร PDB/$SW_{30\ ppt}$ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช *C. gloeosporioides* DOAC 0782 มากกว่า *C. capsici* DOAC 1511 มีค่า %IE เท่ากับ 76.7 และ 70.0 ตามลำดับ (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 10 ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญ (%IE) ของสารสกัดจากรานาเกลือที่มีต่อราก่อโรคพืช

ลำดับ	สารสกัด/ รานาเกลือ	แหล่งที่มา ของสารสกัด	ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญ	
			***C. capsici* DOAC 1511**	***C. gloeosporioides* DOAC 0782**
1	SSCS031	PDB/dw	6.67±11.55	23.33±5.77
		PDB/$SW_{30\ ppt}$	13.33±11.55	36.67±5.77
2	SSCR044	PDB/dw	16.67±5.77	16.67±5.77
		PDB/$SW_{30\ ppt}$	-	-
3	SSCS069	PDB/dw	66.67±5.77	50.00±0.00
		PDB/$SW_{30\ ppt}$	53.33±5.77	66.67±5.77
4	SSCS070	PDB/dw	23.33±5.77	10.00±0.00
		PDB/$SW_{30\ ppt}$	30.00±0.00	26.67±5.77

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคพืช

ตารางที่ 10 ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญ (%IE) ของสารสกัดจากรานาเกลือที่มีต่อราก่อโรคพืช (ต่อ)

ลำดับ	สารสกัด/ รานาเกลือ	แหล่งที่มา ของสารสกัด	ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญ	
			C. capsici DOAC 1511	*C. gloeosporioides* DOAC 0782
5	SSCR088	PDB/dw	33.33±5.77	-
		$PDB/SW_{30\ ppt}$	13.33+11.55	10.00±0.00
6	SSCS106	PDB/dw	40.00±10.00	70.00±0.00
		$PDB/SW_{30\ ppt}$	-	-
7	SSCS115	PDB/dw	50.00±0.00	80.00±0.00
		$PDB/SW_{30\ ppt}$	40.00±0.00	56.67±5.77
8	SSPB1105	PDB/dw	36.67±5.77	33.33±5.77
		$PDB/SW_{30\ ppt}$	33.33±5.77	40.00±0.00
9	SSPB1110	PDB/dw	26.67±5.77	40.00±0.00
		$PDB/SW_{30\ ppt}$	30.00±17.32	36.67±5.77
10	SSPB1117	PDB/dw	56.67±5.77	40.00±0.00
		$PDB/SW_{30\ ppt}$	23.33±5.77	30.00±0.00
11	SSPB1122	PDB/dw	60.00+0.00	33.33+5.77
		$PDB/SW_{30\ ppt}$	23.33±11.55	40.00±0.00
12	SSPB1130	PDB/dw	-	3.33±5.77
		$PDB/SW_{30\ ppt}$	-	10.00±0.00
13	SSPB1209	PDB/dw	30.00±0.00	30.00±10.00
		$PDB/SW_{30\ ppt}$	-	10.00±0.00
14	SSPB1210	PDB/dw	6.67±5.77	30.00±0.00
		$PDB/SW_{30\ ppt}$	20.00±0.00	-
15	SSPB1211	PDB/dw	-	-
		$PDB/SW_{30\ ppt}$	-	33.33±5.77

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช

ตารางที่ 10 ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญ (%IE) ของสารสกัดจากรานาเกลือที่มีต่อราก่อโรคพืช (ต่อ)

ลำดับ	สารสกัด/ รานาเกลือ	แหล่งที่มาของสารสกัด	ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญ	
			C. capsici DOAC 1511	*C. gloeosporioides* DOAC 0782
16	SSPB1212	PDB/dw	-	10.00±0.00
		PDB/$SW_{30\ ppt}$	-	10.00±0.00
17	SSPB1218	PDB/dw	3.33±5.77	-
		PDB/$SW_{30\ ppt}$	50.00±10.00	20.00±0.00
18	SSPB1312	PDB/dw	13.33±5.77	6.67±15.55
		PDB/$SW_{30\ ppt}$	-	16.66±5.58
19	SSPB2202	PDB/dw	-	-
		PDB/$SW_{30\ ppt}$	-	20.00±0.00
20	SSPB2210	PDB/dw	-	13.33±5.58
		PDB/$SW_{30\ ppt}$	-	-
21	SSPB3114	PDB/dw	10.00±0.00	50.00±0.00
		PDB/$SW_{30\ ppt}$	6.67±5.77	-
22	SSPB3124	PDB/dw	46.67±5.77	80.00±0.00
		PDB/$SW_{30\ ppt}$	80.00±0.00	63.33±5.77
23	SSPB3208	PDB/dw	60.00±10.00	73.33±5.77
		PDB/$SW_{30\ ppt}$	56.67±5.77	63.33±5.77
24	SSPB3301	PDB/dw	-	-
		PDB/$SW_{30\ ppt}$	30.00±0.00	10.00±0.00
25	SSPB4107	PDB/dw	70.00±0.00	60.00±0.00
		PDB/$SW_{30\ ppt}$	63.33±5.77	46.67±5.77
26	SSPB4108	PDB/dw	10.00±17.31	-
		PDB/$SW_{30\ ppt}$	13.33±23.09	-

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช

ตารางที่ 10 ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญ (%IE) ของสารสกัดจากรานาเกลือที่มีต่อราก่อโรคพืช (ต่อ)

ลำดับ	สารสกัด/ รานาเกลือ	แหล่งที่มา ของสารสกัด	ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญ	
			C. capsici DOAC 1511	*C. gloeosporioides* DOAC 0782
27	SSPB4207	PDB/dw	50.00±0.00	50.00±0.00
		PDB/$SW_{30\ ppt}$	76.67±5.77	70.00±0.00
28	SSPB4208	PDB/dw	46.67±5.77	50.00±0.00
		PDB/$SW_{30\ ppt}$	63.33±5.77	63.33±5.77
29	SSPB4215	PDB/dw	63.33±5.77	53.33±5.77
		PDB/$SW_{30\ ppt}$	70.00±0.00	50.00±0.00
30	SSPB4217	PDB/dw	53.33±5.77	50.00±0.00
		PDB/$SW_{30\ ppt}$	63.33±5.77	60.00±0.00
31	SSPB4225	PDB/dw	26.67±5.77	30.00±10.00
		PDB/$SW_{30\ ppt}$	60.00±0.00	70.00±0.00
32	SSPB4307	PDB/dw	36.67±5.77	50.00±0.00
		PDB/$SW_{30\ ppt}$	23.33±11.55	50.00±0.00
33	SSPB4308	PDB/dw	66.67±5.77	56.67±5.77
		PDB/$SW_{30\ ppt}$	40.00±0.00	40.00±0.00
34	SSPB4309	PDB/dw	13.33±5.77	20.00±0.00
		PDB/$SW_{30\ ppt}$	46.67±11.55	56.67±5.77
35	SSPB4313	PDB/dw	-	40.00±0.00
		PDB/$SW_{30\ ppt}$	60.00±0.00	53.33±5.77
36	SSPB4319	PDB/dw	53.33±5.77	53.33+5.77
		PDB/$SW_{30\ ppt}$	30.00±0.00	40.00+0.00
37	SSPB4320	PDB/dw	30.00±10.00	36.67+0.57
		PDB/$SW_{30\ ppt}$	46.67±5.77	50.00+0.00

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช

ตารางที่ 10 ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญ (%IE) ของสารสกัดจากรานาเกลือที่มีต่อราก่อโรคพืช (ต่อ)

ลำดับ	สารสกัด/ รานาเกลือ	แหล่งที่มา ของสารสกัด	ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญ	
			C. capsici DOAC 1511	*C. gloeosporioides* DOAC 0782
38	SSPB4321	PDB/dw	20.00±0.00	43.33±0.57
		$PDB/SW_{30\ ppt}$	40.00±0.00	50.00±0.00
39	SSPB4323	PDB/dw	-	13.33±0.57
		$PDB/SW_{30\ ppt}$	50.00±0.00	50.00±0.00
40	SSPB4324	PDB/dw	16.67±5.77	30.00±0.00
		$PDB/SW_{30\ ppt}$	70.00±0.00	76.67±5.77
41	SSPB4325	PDB/dw	40.00±0.00	40.00±0.00
		$PDB/SW_{30\ ppt}$	26.70±5.77	50.00±10.00
42	SSPB4327	PDB/dw	36.67±5.77	56.67±5.77
		$PDB/SW_{30\ ppt}$	60.00±0.00	56.67±5.77
43	SSPB4328	PDB/dw	3.33±5.77	23.33±5.77
		$PDB/SW_{30\ ppt}$	36.67±5.77	40.00±0.00
44	SSPB4329	PDB/dw	70.00±0.00	53.33±5.77
		$PDB/SW_{30\ ppt}$	36.67±5.77	40.00±0.00
45	SSPB4332	PDB/dw	66.67±5.77	56.66±5.77
		$PDB/SW_{30\ ppt}$	50.00±0.00	50.00±0.00

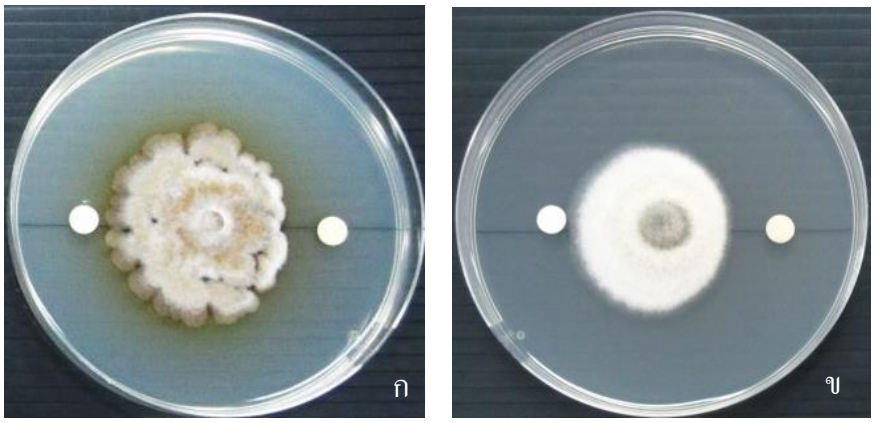
หมายเหตุ - หมายถึง ไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช

ตารางที่ 11 สารสกัดที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญราก่อโรคพืชในระดับดีมากขึ้นไป

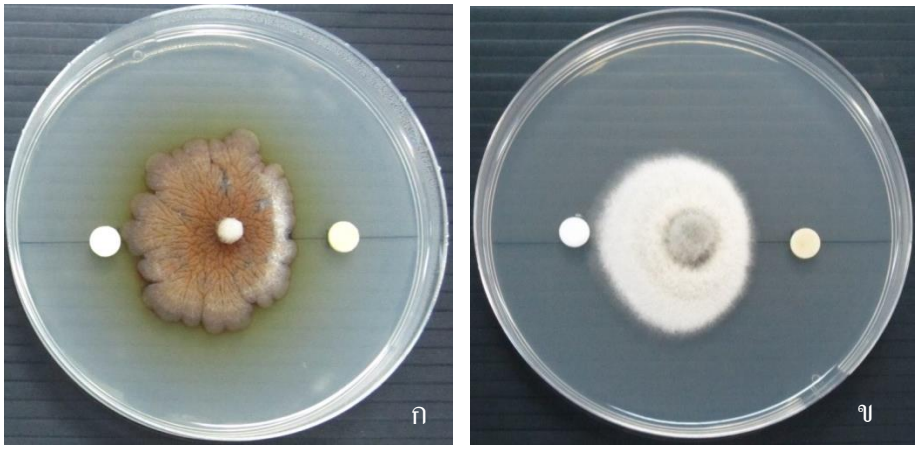
ลำดับ	สารสกัด/ รานาเกลือ	แหล่งที่มา ของสารสกัด	ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญ (%)	
			C. capsici DOAC 1511	*C. gloeosporioides* DOAC 0782
1	SSCS106	PDB/dw	40.00±10.00	70.00±0.00
2	SSCS115	PDB/dw	50.00±0.00	80.00±0.00
3	**SSPB3124**	PDB/dw	46.67±5.77	**80.00±0.00**
		PDB/$SW_{30\ ppt}$	**80.00±0.00**	**63.33±5.77**
4	**SSPB3208**	**PDB/dw**	**60.00±10.00**	**73.33±5.77**
5	SSPB4107	PDB/dw	70.00±0.00	60.00±0.00
6	SSPB4207	PDB/$SW_{30\ ppt}$	76.67±5.77	70.00±0.00
7	SSPB4215	PDB/$SW_{30\ ppt}$	70.00±0.00	50.00±0.00
8	SSPB4225	PDB/$SW_{30\ ppt}$	60.00±0.00	70.00±0.00
9	SSPB4324	PDB/$SW_{30\ ppt}$	70.00±0.00	76.67±5.77
10	SSPB4329	PDB/dw	70.00±0.00	53.33±5.77

ตารางที่ 12 จำนวนสารสกัดรานาเกลือที่แสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชที่ระดับ %IE ต่าง ๆ เมื่อเลี้ยง ร่วมกัน เป็นเวลา 3 และ 5 วัน

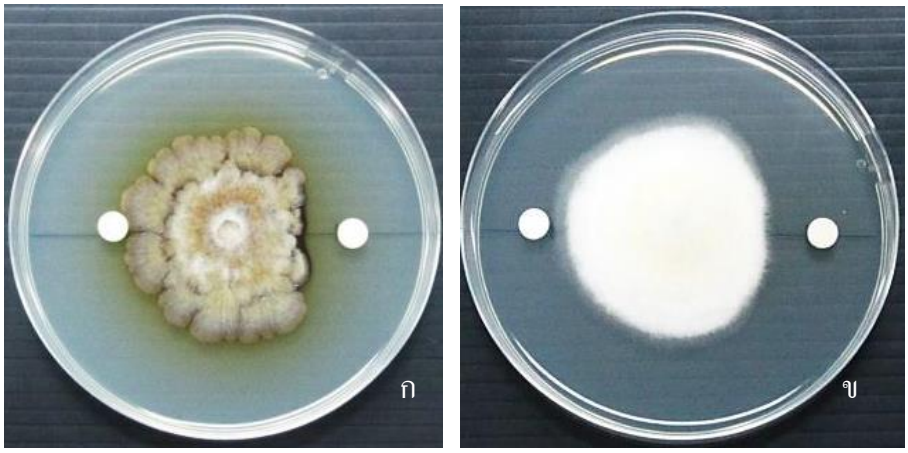
ระดับ	เกณฑ์ (%IE)	จำนวนสารสกัดจากรานาเกลือที่แสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งราสาเหตุโรค			
		*C. capsici*DOAC 1511		*C. gloeosporioides* DOAC 0782	
		PDB/dw	PDB/$SW_{30\ ppt}$	PDB/dw	PDB/$SW_{30\ ppt}$
Low	<35	17	14	15	11
Moderate	35 - <50	9	7	7	9
High	50 - <70	9	11	13	16
Very high	≥70	2	3	4	3
No activity	-	8	9	6	6



ภาพที่ 8 ฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคแอนแทรกโนสของสารสกัดราจากอาหารเลี้ยงรานาเกลือ SSPB3124 ที่เตรียมจาก PDB/dw (disc ทางขวาของจานอาหาร) ในการยับยั้งรา *C. capsici* DOAC 1511 (ก) และ *C. gloeosporioides* DOAC 0782 (ข) บนอาหาร PDB/dw; disc ทางซ้ายของจานอาหารเป็น disc ควบคุม



ภาพที่ 9 ฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคแอนแทรกโนสของสารสกัดราจากอาหารเลี้ยงรานาเกลือ SSPB3208 ที่เตรียมจาก PDB/dw (disc ทางขวาของจานอาหาร) ในการยับยั้งรา *C. capsici* DOAC 1511 (ก) และ *C. gloeosporioides* DOAC 0782 (ข) บนอาหาร PDB/dw; disc ทางซ้ายของจานอาหารเป็น disc ควบคุม



ภาพที่ 10 ฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคแอนแทรกโนสของสารสกัดราจากอาหารเลี้ยงรานาเกลือ SSPB4207 ที่เตรียมจาก PDB/SW_{30ppt} (disc ทางขวาของจานอาหาร) ในการยับยั้งรา *C. capsici* DOAC 1511 (ก) และ *C. gloeosporioides* DOAC 0782 (ข) บนอาหาร PDB/dw; disc ทางซ้ายของจานอาหารเป็น disc ควบคุม

4. การศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญ (MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดในการทำลาย (MLC) ราก่อโรคพืช

นำสารสกัดจากอาหารเหลวที่ไม่มีและมีความเค็มจากรานาเกลือที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคพืช ในระดับดี (%IE 50 - <70) จำนวน 4 สาร และดีมาก (%IE >70) จำนวน 10 สาร มาหาค่า MIC และ MLC ผลแสดงดังตารางที่ 13-14 พบว่าค่า MIC และ MLC ของสารสกัดในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชมีฤทธิ์แตกต่างกันขึ้นกับความเข้มข้นของสารสกัด ชนิดราทดสอบและชนิดรานาเกลือที่ผลิต เมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มมากขึ้นจาก 256 ถึง 2,048 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (µg/ml) สามารถยับยั้งราก่อโรคพืชทำให้มีขนาดโคโลนีที่เล็กลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุม จนถึงไม่พบการเจริญของรา (ภาพที่ 11) สารสกัดจำนวนเกือบทั้งหมด มีค่า MIC ในการยับยั้ง *C. capsici* DOAC 1511 ต่ำกว่า *C. gloeosporioides* DOAC 0782 ค่า MIC ของสารสกัดยังขึ้นกับความเค็มของอาหารเลี้ยงรานาเกลือที่นำมาสกัด ส่วนใหญ่สารสกัดจากอาหารที่มีความเค็มมีความสามารถยับยั้งราก่อโรคพืชได้ดีกว่าสารสกัดจากอาหารที่ไม่มีความเค็ม สารสกัด SSPB3208 PDB/dw และ SSPB3208 PDB/$SW_{30\ ppt}$ มีค่า MIC ต่ำสุดในการยับยั้ง *C. capsici* DOAC 1511 และ *C. gloeosporioides* DOAC เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน คือมีค่า MIC เท่ากับ 256-512 µg/ml (ตารางที่ 13) นอกจากนี้สารสกัดจากรานาเกลือ SSPB3124 SSPB4207 และ SSPB4215 ที่เลี้ยงด้วยอาหาร PDB/$SW_{30\ ppt}$ สามารถยับยั้งราก่อโรคพืช *C. capsici* DOAC 1511 มีค่า MIC ต่ำสุด เท่ากับ 512 µg/ml

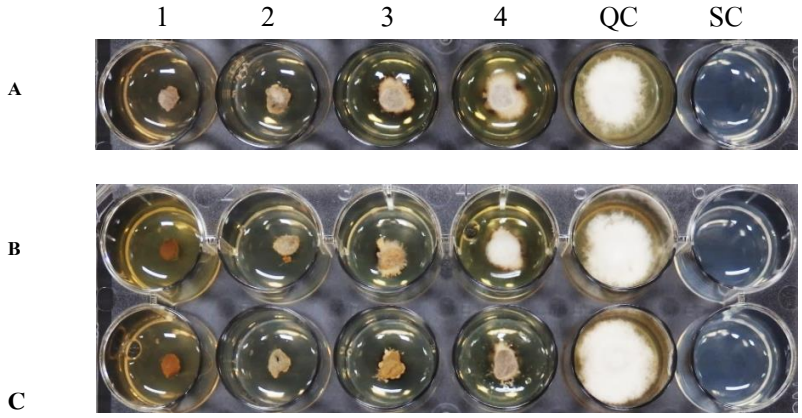
เมื่อนำสารสกัดจากหลุมทดสอบ MIC ที่ไม่พบราเจริญหลังจากบ่มไว้ 5 วัน มาเพาะเลี้ยงซ้ำบนอาหาร PDA/dw เป็นเวลา 5 วัน เพื่อศึกษาค่า MLC พบราส่วนหนึ่งเจริญได้ เกือบทั้งหมดมาจากหลุมสารสกัดที่มีความเข้มข้นระหว่าง 1024 ถึง > 2048 µg/ml มีเพียงสารสกัด SSPB3208 PDB/dw ที่พบว่าราจากหลุมที่มีความเข้มข้นสารสกัด 512-1,024 µg/ml ไม่สามารถเจริญได้ (MLC 512-1,024 µg/ml) (ตารางที่ 14)

ตารางที่ 13 ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่ในการยับยั้งการเจริญ (MIC) ราก่อโรคพืช เมื่อเลี้ยงราบนอาหาร PDB/dw เป็นเวลา 3 และ 5 วัน

รานาเกลือ	**แหล่งที่มาของสารสกัด**	**MIC (µg/ml)**			
		C. capsici DOAC 1511		*C. gloeosporioides* DOAC 0782	
		3 วัน	**5 วัน**	**3 วัน**	**5 วัน**
SSCS069	PDB/dw	**512**	1,024	1,024	>2,048
	PDB/$SW_{30\ ppt}$	2,048	>2,048	>2,048	>2,048
SSPB1122	PDB/dw	1,024	2,048	2,048	>2,048
	PDB/$SW_{30\ ppt}$	512	1,024	2,048	>2,048
SSPB3124	PDB/dw	1,024	2,048	1,024	2,048
	PDB/$SW_{30\ ppt}$	**512**	**1,024**	**512**	**1,024-2,048**
SSPB3208	**PDB/dw**	**512**	**1,024**	**512**	**512**
	PDB/$SW_{30\ ppt}$	**256-512**	**256-512**	**512**	**512**
SSPB4207	PDB/dw	512-1,024	2,048	1,024	>2,048
	PDB/$SW_{30\ ppt}$	512-1,024	2,048	1,024	>2,048
SSPB4215	PDB/dw	2,048	>2,048	2,048	>2,048
	PDB/$SW_{30\ ppt}$	512	1,024	1,024	1,024
SSPB4225	PDB/dw	>2,048	>2,048	>2,048	>2,048
	PDB/$SW_{30\ ppt}$	2,048	2,048	2,048->2,048	>2,048

ตารางที่ 14 ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่ในการฆ่ารา (MLC) รากอโรคพืช เมื่อเลี้ยงราบนอาหาร PDB/dw เป็นเวลา 5 วัน (ต่อ)

รานาเกลือ	**แหล่งที่มาของสารสกัด**	**MLC (µg/ml)**	
		C. capsici DOAC	*C. gloeosporioides* DOAC 0782
SSCS069	PDB/dw	>2,048	>2,048
	PDB/$SW_{30\ ppt}$	>2,048	>2,048
SSPB1122	PDB/dw	>2,048	>2,048
	PDB/$SW_{30\ ppt}$	>2,048	>2,048
SSPB3124	PDB/dw	>2,048	>2,048
	PDB/$SW_{30\ ppt}$	>2,048	1,024-2,048
SSPB3208	**PDB/dw**	2,048->2,048*	**512-1,024**
	PDB/$SW_{30\ ppt}$	>2,048	1,024-2,048
SSPB4207	PDB/dw	>2,048	>2,048
	PDB/$SW_{30\ ppt}$	>2,048	>2,048
SSPB4215	PDB/dw	>2,048	>2,048
	PDB/$SW_{30\ ppt}$	>2,048	1,024
SSPB4225	PDB/dw	>2,048	>2,048
	PDB/$SW_{30\ ppt}$	>2,048	>2,048



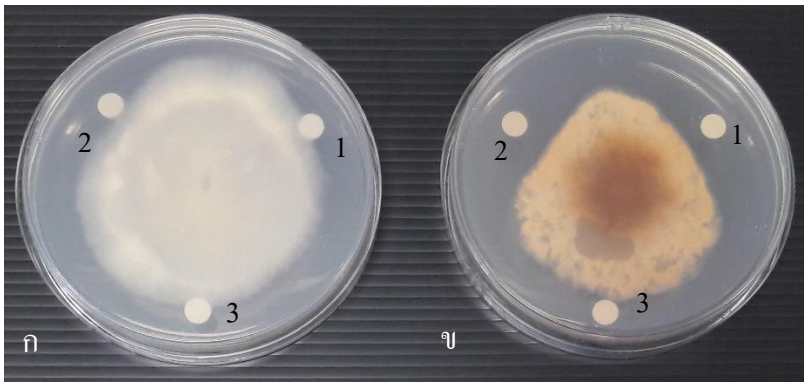
ภาพที่ 11 ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญ (MIC) ของราก่อโรคพืช *C. capsici* DOAC 1511 ที่ความเข้มข้น 2,048-256 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (หลุมที่ 1-4 ตามลำดับ) โดยวิธี agar dulution เมื่อบ่ม 5 วัน; A1-4: สารสกัด SSPB3124 (PDB/$SW_{30\ ppt}$), B1-4: SSPB3208 (PDB/dw), C1-4: SSPB3208 (PDB/$SW_{30\ ppt}$), QC: quality control SC: sterility control

5. ความสามารถในการยับยั้งราโรคพืชอื่นๆ

เมื่อพิจารณาค่า MIC ของสารสกัดราที่ใช้ยับยั้งราก่อโรคแอนแทรกโนส *C. capsici* DOAC 1511 และ *C. gloeosporioides* DOAC 0782 พบว่าสารสกัด SSPB3124 ที่สกัดจากน้ำทะเล และ SSPB3208 ทั้งที่สกัดจากน้ำทะเลและน้ำจืด มีค่า MIC ต่ำสุด จึงคัดเลือกสารสกัด SSPB3124 และ SSPB3208 ที่สกัดจากน้ำทะเล มาทำการทดสอบกับราก่อโรคพืชอื่นๆ อีก พบว่าทั้ง SSPB3124 และ SSPB3208 ที่สกัดจากน้ำทะเล ยับยั้ง *Fusarium oxysporum* DOAC 1808, *F. subglutinans* DOAC 0761 และ *Pestalotiopsis* sp. DOAC 1098 ได้ดี แต่ไม่ยับยั้ง *Helminthosporium oryzae* DOAC 2293 และ *Alternaria brassicicola* DOAC 0436, หรือยับยั้งได้น้อยมาก (ตารางที่ 15 และภาพที่ 12)

ตารางที่ 15 ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญราก่อโรคพืชนอกเหนือจากแอนแทรกโนส

สารสกัด	ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญ (%)				
	A. brassicicola DOAC 0436	*F. oxysporum* DOAC 1808	*F. subglutinans* DOAC 0761	*H. oryzae* DOAC 2293	*Pestalotiopsis sp.* DOAC 1098
SSPB3124 PDB/$SW_{30\ ppt}$	10.00±5.00	43.33±9.43	53.33±4.71	3.33±4.71	53.33±4.71
SSPB3208 PDB/$SW_{30\ ppt}$	6.67±4.71	35.00±14.72	33.33±12.47	10.00±0.00	63.33±4.08



ภาพที่ 12 ฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคแอนแทรกโนสของสารสกัดจากอาหารเลี้ยงรานาเกลือที่เตรียมจาก PDB/ $SW_{30\ ppt}$ ในการยับยั้งรา *F. oxysporum* DOAC 1808 (ก) และ *Pestalotiopsis sp.* DOAC 1098 (ข); 1: SSPB3124, 2: SSPB3208, 3: ดิสก์ควบคุมผลลบ DMSO

6. การจัดจำแนกราที่ใช้ในการศึกษา

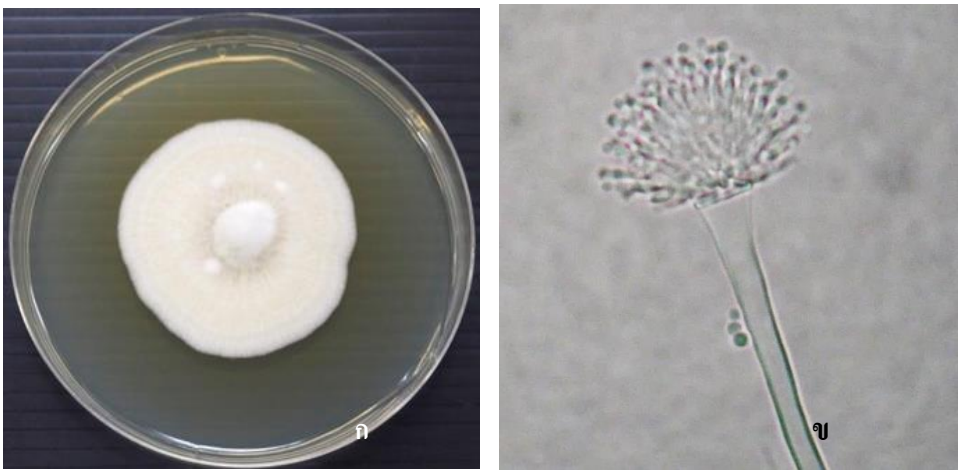
ทำการจัดจำแนกราทางสัณฐานวิทยา 6 สายพันธุ์ พบว่าราสามารถจัดจำแนกได้เป็น *Aspergillus* ทั้งหมด 2 สปีชีส์ (ตารางที่ 16) แต่เมื่อนำไปจัดจำแนกทางอณพันธุศาสตร์โดยใช้ความเหมือนกันของลำดับเบส บริเวณ ITS หรือ beta globulin gene พบว่า *Aspergillus* ที่แยกได้มีความแตกต่างกันในระดับสปีชีส์ สามารถแยกออกเป็นสปีชีส์ต่างๆ ทั้งที่เป็นชนิดที่มีผู้รายงานไว้แล้วและสายพันธุ์ที่ยังไม่มีผู้ใดรายงานไว้ และมีแนวโน้มว่าจะเป็นสปีชีส์ใหม่ รายละเอียดของแต่ละสายพันธุ์มีดังนี้

ตารางที่ 16 การจัดจำแนกรานาเกลือทางสัณฐานวิทยา

รานาเกลือ	แหล่งที่เก็บตัวอย่าง	เดือน/ปี	การจำแนก
SSPB3124	ดินนาแผ่ของนาเกลือ จังหวัดเพชรบุรี	ธ.ค. 2556	*Aspergillus* sp.2
SSPB3208	ดินนาวางของนาเกลือ จังหวัดเพชรบุรี	ธ.ค. 2556	*Aspergillus* sp.2
SSPB4107	ดินนาวางของนาเกลือ จังหวัดเพชรบุรี	มี.ค. 2557	*Aspergillus* sp.1
SSPB4207	ดินนาวางของนาเกลือ จังหวัดเพชรบุรี	มี.ค. 2557	*Aspergillus* sp.1
SSPB4215	ดินนาวางของนาเกลือ จังหวัดเพชรบุรี	มี.ค. 2557	*Aspergillus* sp.1
SSPB4225	ดินนาวางของ นาเกลือ จังหวัดเพชรบุรี	มี.ค. 2557	*Aspergillus* sp.1

การจัดจำแนกรา *Aspergillus* sp.2 **SSPB3124**

โคโลนีราเมื่อเลี้ยงบนอาหาร PDA/$SW_{30\ ppt}$ เป็นเวลา 14 วัน ที่อุณหภูมิ 28°C มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี ประมาณ 6 เซนติเมตร เส้นใยสีขาว ฟูเล็กน้อย ขอบเรียบ สร้างสปอร์บริเวณกลางโคโลนี สร้างสารที่มีสีเหลืองในอาหารแข็งจนเปลี่ยนสีอาหารเป็นสีเหลืองรอบโคโลนี โครงสร้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40X เส้นใยมีผนังกั้น พบ foot cell โคนีเดียรูปกลม ผิวเรียบ ไม่มีสี ขนาดประมาณ 2.5 ไมโครเมตร ต่อกันเป็นสาย 2-4 สปอร์ บน sterigma แบบ phialide biiseriate บนหัว vesicle ขนาดประมาณ 10 ไมโครเมตร sterigma คลุมรอบ vescicle โคนิดิโอฟอร์ตรง ไม่มีสี ผิวเรียบ (ภาพที่ 13) การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน beta tubulin ด้วยโปรแกรม BLASTn เพื่อเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ปรากฏอยู่ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน beta tubulin ของ SSPB3124 (91-95%) แสดงความคล้ายคลึงสูงสุดประมาณ 99 % กับ *Aspergillus candidus* CY104 และ *Aspergillus niveus* สายพันธุ์ต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 17 ในเบื้องต้นจึงจำแนก SSPB 3124 เป็น *Aspergillus* sp.



ภาพที่ 13 ลักษณะรา *Aspergillus* sp.2 SSPB3124 เมื่อบ่มบนอาหาร PDA/$SW_{30\ ppt}$ เป็นเวลา 14 วัน; ก: ลักษณะด้านหน้าโคโลนี ข: โคนิเดียและโคนิดิโอฟอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40X

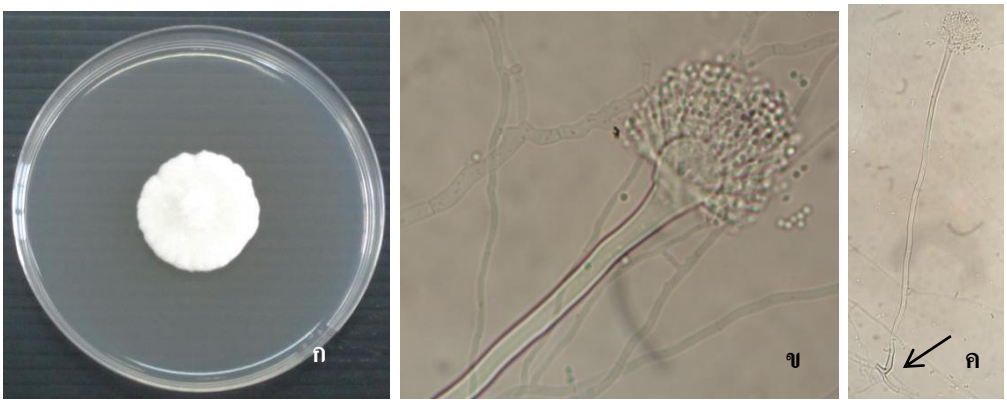
ตารางที่ 17 ผลการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน beta-tubulin ของรา SSPB3124 เปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank วิเคราะห์โดยโปรแกรม BLASTn

Accession No.	Fungus	Query cover (%)	MAX identity (%)
HQ607958.1	*Aspergillus candidus* isolate CY104	95	99
FJ155814.1	*Fennellia nivea* strain CH-Y-1043	95	99
JQ724470.1	*Aspergillus niveus* isolate DBOF109	94	99
KP131610.1	*Aspergillus niveus* strain IHEM 5804	94	99
JQ776544.1	*Aspergillus niveus* strain SGE55	91	99

การจัดจำแนกรา *Aspergillus* sp.2 **SSPB3208**

โคโลนีราเมื่อเลี้ยงบนอาหาร PDA/$SW_{30\ ppt}$ เป็นเวลา 14 วัน ที่อุณหภูมิ 28°C มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี 4.7 เซนติเมตร สีขาว เส้นใยฟูเล็กน้อย สร้างสารที่มีสีเหลืองในอาหารแข็งจนเปลี่ยนสีอาหารเป็นสีเหลืองรอบโคโลนี โครงสร้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40X เส้นใยมีผนังกั้น พบ foot cell โคนีเดียรูปกลม ผิวเรียบ ไม่มีสี ขนาดประมาณ 2.5 ไมโครเมตร ต่อกันเป็นสายบน sterigma แบบ phialide biiseriate บนหัว vesicle ขนาดประมาณ 10-15 ไมโครเมตร sterigma คลุมรอบ vescicle โคนิดิโอฟอร์ตรง ไม่มีสี ผิวเรียบ (ภาพที่ 14) การ

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ด้วยโปรแกรม BLASTn เพื่อเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ปรากฏอยู่ในฐานข้อมูล GenBank ซึ่งพบว่าข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของ SSPB3208 แสดงความคล้ายคลึงสูงสุดประมาณ 99% กับ *Aspergillus candidus* CY104 และ *Aspergillus niveus* สายพันธุ์ต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 18 จากข้อมูลดังกล่าว ในเบื้องต้นจึงจำแนกราไอโซเลท SSPB3208 เป็น *Aspergillus* sp.



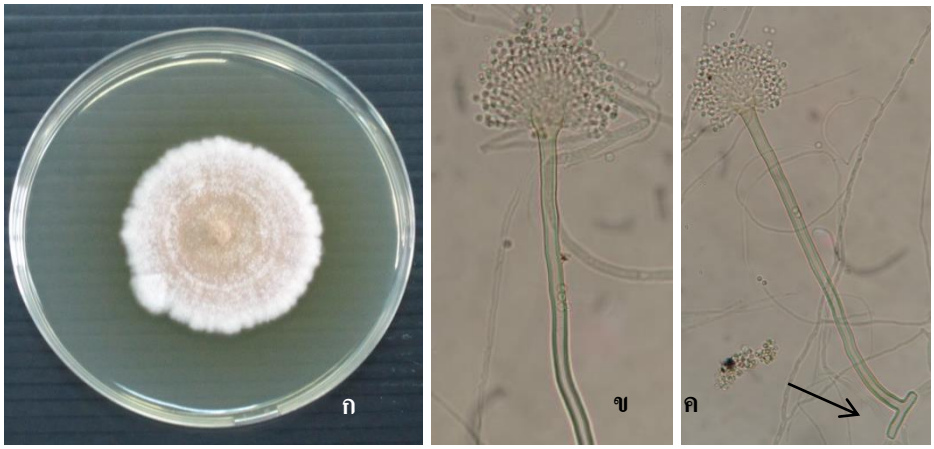
ภาพที่ 14 ลักษณะรา *Aspergillus* sp.2 SSPB3208 บนอาหาร PDA/$SW_{30\ ppt}$ เมื่อบ่มเป็นเวลา 5 วัน; ก: ลักษณะด้านหน้าโคโลนี ข:โคนิเดียและโคนิดิโอฟอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40X ค: foot cell

ตารางที่ 18 ผลการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของรา SSPB3208 เปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank โดยโปรแกรม BLASTn

Accession No.	Fungus	Query cover (%)	MAX identity (%)
HQ607958.1	*Aspergillus candidus* CY104	98	99
KP131610.1	*Aspergillus niveus* strain IHEM 5804	98	99
FJ155814.1	*Fennellia nivea* strain CH-Y-1043	98	99
JQ724470.1	*Aspergillus niveus* isolate DBOF109	98	99
JQ776544.1	*Aspergillus niveus* strain SGE55	96	99

การจัดจำแนกรา *Aspergillus* sp.1 **SSPB4107**

โคโลนีราเมื่อเลี้ยงบนอาหาร PDA/$SW_{30\ ppt}$ เป็นเวลา 14 วัน ที่อุณหภูมิ 28°C มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี 6.0 เซนติเมตร สีน้ำตาลขาว เส้นใยฟูเล็กน้อย ขอบโคโลนีไม่เรียบ สร้างสารที่มีสีเหลืองในอาหารแข็งจนเปลี่ยนสีอาหารเป็นสีเหลืองรอบโคโลนี โครงสร้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40X เส้นใยมีผนังกั้น พบ foot cell โคนีเดียรูปกลม ผิวเรียบ สีน้ำตาล ขนาดประมาณ 2.5 ไมโครเมตร ต่อกันเป็นสาย บน sterigma แบบ phialide uniseriate? บนหัว vesicle ขนาดประมาณ 10-15 ไมโครเมตร sterigma คลุมรอบ vescicle โคนิดิโอฟอร์ตรง ไม่มีสี ผิวเรียบ (ภาพที่ 15) การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ ITS ด้วยโปรแกรม BLASTn เพื่อเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ปรากฏอยู่ในฐานข้อมูล ซึ่งพบว่าข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบริเวณ ITS จาก SSPB4107 แสดงความคล้ายคลึงสูงสุด 97 % กับ *Aspergillus flavipes* YNCA0241 รวมทั้งสายพันธุ์ต่าง ๆ ของ *Aspergillus spelaeus* และ *Aspergillus* ซึ่งไม่ระบุสปีชีส์ ดังแสดงในตารางที่ 19 จากข้อมูลดังกล่าว ในเบื้องต้นจึงจำแนกราไอโซเลท SSPB4107 เป็น *Aspergillus* sp.



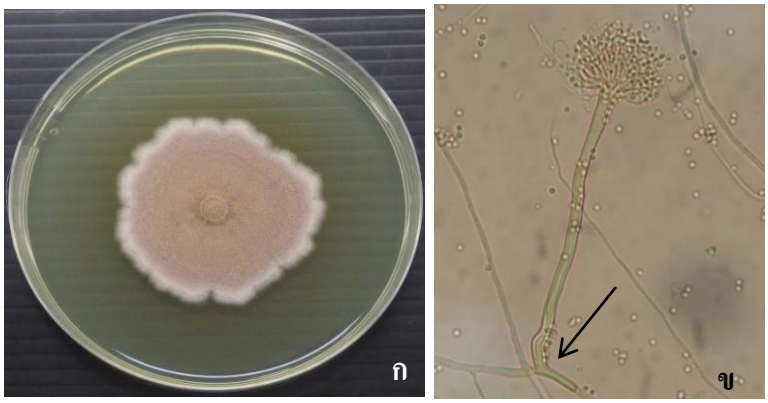
ภาพที่ 15 ลักษณะรา *Aspergillus* sp.1 SSPB4107 บนอาหาร PDA/$SW_{30\ ppt}$ เมื่อบ่มเป็นเวลา 14 วัน;
ก: ลักษณะด้านหน้าโคโลนี ข: โคนิเดียและโคนิดิโอฟอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40X ค: foot cell (ลูกศรชี้)

ตารางที่ 19 ผลการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของรา SSPB4107 เปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank โดยโปรแกรม BLASTn

Accession No.	Fungus	Query cover (%)	MAX identity (%)
KP068687.1	*Aspergillus flavipes* isolate YNCA0241	100	97
LM999908.2	*Aspergillus spelaeus* isolate S716	100	97
KP216953.1	*Aspergillus* sp. G1-P-3-21	100	97
KP216952.1	*Aspergillus* sp. G1-P-2-7	100	97
HQ832962.1	*Aspergillus* sp. BMP3043	100	97
HQ288052.1	*Aspergillus* sp. NRRL 58570	100	97
EF669595.1	*Aspergillus* sp. NRRL 32683	100	97
HG915907.1	*Aspergillus spelaeus* strain CCF 4699	100	97

การจัดจำแนกรา *Aspergillus* sp.1 **SSPB4207**

เมื่อเลี้ยงราบนอาหาร PDA/$SW_{30\ ppt}$ เป็นเวลา 14 วัน ที่อุณหภูมิ 28°C โคโลนีมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 4.8 เซนติเมตร ลักษณะโคโลนีเป็นผงสีน้ำตาล ขอบโคโลนีสีขาว ไม่เรียบ เป็นรอยหยัก ลักษณะใต้กล้อง สร้าง conidia รูปกลม ผิวเรียบ ไม่มีสี ขนาดประมาณ 2.5 ไมโครเมตร ต่อกันเป็นสาย 2-5 สปอร์ บน sterigma แบบ phialide biseriate? บนหัว vesicle ขนาดประมาณ 10 ไมโครเมตร sterigma คลุมรอบ vescicle โคนิดิโอฟอร์ตรง ไม่มีสี ผิวเรียบ (ภาพที่ 16) การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน beta tubulin ด้วยโปรแกรม BLASTn เพื่อเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ปรากฏอยู่ในฐานข้อมูล GenBank แสดงในตารางที่ 20 โดยพบว่าข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน beta tubulin ของ SSPB4207 แสดงความคล้ายคลึงสูงสุด 98 % กับ *Aspergillus* sp. BMP3043 และแสดงความคล้ายคลึงประมาณ 96-97 % กับสายพันธุ์ต่าง ๆ ของ *Aspergillus* สปีชีส์ต่าง ๆ



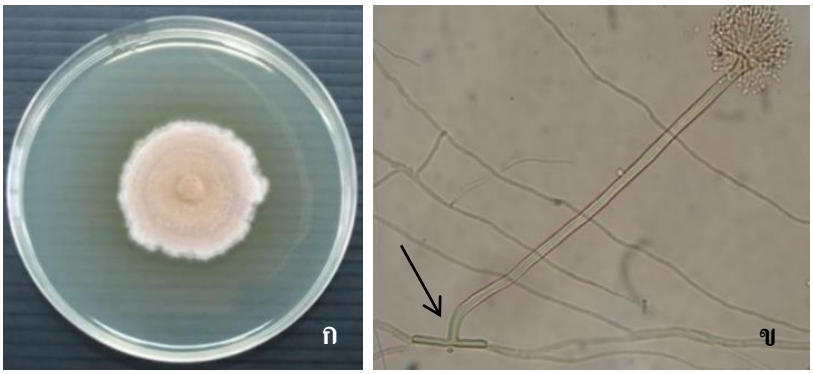
ภาพที่ 16 ลักษณะรา *Aspergillus* sp.1 SSPB4207 บนอาหาร PDA/$SW_{30\ ppt}$ เมื่อบ่มเป็นเวลา 14 วัน; ก: ลักษณะด้านหน้าโคโลนี ข: ลักษณะ foot cell (ลูกศรชี้) โคนิเดียและโคนิดิโอฟอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40X

ตารางที่ 20 ผลการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน beta tubulin ของรา SSPB4207 เปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank โดยโปรแกรม BLASTn

Accession No.	Fungus	Query cover (%)	MAX identity (%)
HQ832962.1	*Aspergillus* sp. BMP3043	100	98
KC007332.1	*Aspergillus* sp. O_3_BESC_246e	100	97
GU566209.1	*Cochliobolus heterostrophus*	100	97
KF624764.1	*Aspergillus flavipes* voucher RIFA	99	97
KC143754.1	Uncultured *Aspergillus* clone CEobese399	99	97
GU566238.1	*Aspergillus flavipes* strain E14	100	96
KM215631.1	*Aspergillus iizukae* isolate G82	100	96
AB859956.1	*Aspergillus lizukae*	100	96
KJ704842.1	*Aspergillus flavipes*	98	96
KC478518.1	*Aspergillus* sp. RSPG_185	95	97

การจัดจำแนกรา SSPB4215

เมื่อเลี้ยงราบนอาหาร PDA/sw เป็นเวลา 14 วัน ที่อุณหภูมิ 28°C โคโลนีมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 5.5 เซนติเมตร ลักษณะโคโลนีเป็นผงสีน้ำตาล ขอบโคโลนีสีขาว ไม่เรียบ เป็นรอยหยัก ลักษณะใต้กล้อง สร้าง conidia รูปกลม ไม่มีสี ผิวเรียบ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2.5 ไมโครเมตร ต่อกันเป็นสาย 2-5 สปอร์บน sterigma ที่เกิดบนหัว vesicle ที่เป็นแบบ phialide biseriate? ขนาดประมาณ 7.5-12.5 ไมโครเมตร sterigma คลุมรอบ vescicle โคนิดิโอฟอร์ ตรง ไม่มีสี ผิวเรียบ (ภาพที่ 17) การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ด้วยโปรแกรม BLASTn เพื่อเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ปรากฏอยู่ในฐานข้อมูล GenBank แสดงในตารางที่ 21 โดยพบว่าข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของ SSPB4215 แสดงความคล้ายคลึงสูงสุด 98 % กับ *Aspergillus* sp. BMP3043



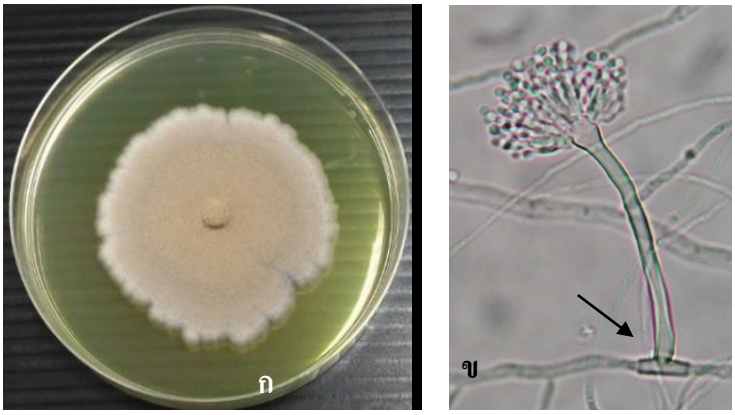
ภาพที่ 17 ลักษณะรา *Aspergillus* sp.1 SSPB4215 บนอาหาร PDA/$SW_{30\ ppt}$ เมื่อบ่มเป็นเวลา 14 วัน; ก: ลักษณะด้านหน้าโคโลนี ข: ลักษณะ foot cell (ลูกศรชี้) โคนิเดียและโคนิดิโอฟอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40X

ตารางที่ 21 ผลการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของรา SSPB4215 เปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank โดยโปรแกรม BLASTn

Accession No.	Fungus	Query cover (%)	MAX identity (%)
HQ832962.1	*Aspergillus* sp. BMP3043	100	98
KC478518.1	*Aspergillus* sp. RSPG_185	99	97
KF624764.1	*Aspergillus flavipes* voucher RIFA 7A	100	97
KC007332.1	*Aspergillus* sp. O_3_BESC_246e 1	100	97
GU566209.1	*Aspergillus flavipes* strain BH	100	97
KJ704842.1	*Aspergillus flavipes*	99	97
KC143754.1	Uncultured *Aspergillus* clone CEobese399	100	96
GU187875.1	Uncultured fungus clone RFLP54	100	96
KM215631.1	*Aspergillus lizukae* isolate G82	100	96

การจัดจำแนกรา *Aspergillus* sp.1 **SSPB4225**

เมื่อเลี้ยงราบนอาหาร PDA/$SW_{30\ ppt}$ เป็นเวลา 14 วันที่อุณหภูมิ 28°C โคโลนีมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 6.0 เซนติเมตร ลักษณะโคโลนีเป็นผงสีน้ำตาล ขอบโคโลนีสีขาว ไม่เรียบ ลักษณะใต้กล้องสร้าง conidia รูปกลม ไม่มีสี ผิวเรียบ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.5 ไมโครเมตร ต่อกันเป็นสาย 2-5 สปอร์บน sterigma ที่เกิดบนหัว vesicle แบบ phialide biseriate? ขนาดประมาณ 7.5-10 ไมโครเมตร sterigma คลุม รอบ vescicle โคนิดิโอฟอร์ตรง ไม่มีสี ผิวเรียบ (ภาพที่ 18) การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS ด้วยโปรแกรม BLASTn เพื่อเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ปรากฏอยู่ในฐานข้อมูล GenBank แสดงในตารางที่ 22 พบว่าข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของ SSPB4225 แสดงความคล้ายคลึงสูงสุด 98 % กับ *Aspergillus* sp. BMP3043



ภาพที่ 18 ลักษณะรา *Aspergillus* sp.1 SSPB4225 บนอาหาร PDA/$SW_{30\ ppt}$ เมื่อบ่มเป็นเวลา 14 วัน; ก: ลักษณะด้านหน้าโคโลนี ข: ลักษณะ foot cell (ลูกศรชี้) โคนิเดียและโคนิดิโอฟอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40X

ตารางที่ 22 ผลการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของรา SSPB4225 เปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank โดยโปรแกรม BLASTn

Accession No.	Fungus	Query cover (%)	MAX identity (%)
HQ832962.1	*Aspergillus* sp. BMP3043	99	98
KP890482.1	Fungal sp. 54835	96	98
KC007332.1	*Aspergillus* sp. O_3_BESC_246e	100	97
GU566209.1	*Aspergillus flavipes* strain BH	99	97
GU566238.1	*Aspergillus flavipes* strain E14	99	96
KM215631.1	*Aspergillus iizukae* isolate G82	99	96
KF624764.1	*Aspergillus flavipes* voucher RIFA 7A 1	97	97
KJ704842.1	*Aspergillus flavipes*	99	96
KC143754.1	Uncultured *Aspergillus* clone CEobese399	97	97
AB859956.1	*Aspergillus iizukae*	99	96

การระบุแทกซอนของราที่คัดเลือกเพื่อการจัดจำแนก

เมื่อพิจารณาข้อมูลลักษณะสัณฐานร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน beta-tubulin หรือดีเอ็นเอบริเวณ ITS ซึ่งอยู่ระหว่างยีน rRNA สามารถจำแนกราที่คัดเลือกมาศึกษาทั้ง 6 ไอโซเลท ได้ในระดับจีนัสเท่านั้น โดยทั้งหมดถูกจัดอยู่ในจีนัส Aspergillus (ตารางที่ 23) โดยพบว่าเป็นสปีชีส์ที่แตกต่างกัน 3 สปีชีส์ (สปีชีส์ 1-3)

ตารางที่ 23 การระบุแทกซอนของรานาเกลือ 6 สายพันธุ์

Isolate	Identification marker	Identification	Closest taxon (Accession no.)	Similarity (%)
SSPB3124	beta tubulin gene	*Aspergillus* sp.1	*Aspergillus candidus* CY104 (HQ607958.1)	99
SSPB4207	beta tubulin gene	*Aspergillus* sp.2	*Aspergillus* sp. BMP3043 (HQ832962.1)	98
SSPB3208	ITS	*Aspergillus* sp.1	*Aspergillus candidus* CY104 (HQ607958.1)	99
SSPB4107	ITS	*Aspergillus* sp.3	*Aspergillus flavipes* YNCA0241 (KP068687.1)	97
SSPB4215	ITS	*Aspergillus* sp.2	*Aspergillus* sp. BMP3043 (HQ832962.1)	98
SSPB4225	ITS	*Aspergillus* sp.2	*Aspergillus* sp. BMP3043 (HQ832962.1)	98

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผล

5.1. สรุปผลการทดลอง

ราแอคทิโนมัยซีทจำนวน 64 สายพันธุ์ (42.7%) จากจำนวน 150 สายพันธุ์ที่ศึกษา สามารถยับยั้งราก่อโรคพืช *Colletotrichum* spp. ด้วยปฏิสัมพันธ์แบบ antibiosis ได้ดี บนอาหาร PDA/dw และ/หรือ PDA/$SW_{30\ ppt}$ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *C. gloeosporioides* DOAC 0782 ในจำนวนนี้รา 50 สายพันธุ์ จากจำนวน 62 สายพันธุ์ที่นำมาทดสอบ (80.6%) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคพืชอย่างน้อย 1 ชนิด มากกว่าร้อยละ 35 (%IE≥35) ทั้งในสภาวะที่เลี้ยงที่มีความเค็มหรือไม่มีความเค็ม รา 44 สายพันธุ์ (71.0%) ยับยั้งได้ทั้ง *C. capsici* DOAC 1511 และ *C. gloeosporioides* DOAC 0782 พบว่า แอคทิโนมัยซีทรหัส SSPB4225 ให้ผลยับยั้ง *C. capsici* DOAC 1511 และ *C. gloeosporioides* DOAC 0782 ด้วยค่า %IE สูงสุดเท่ากับ 75.0 และ 76.0 ตามลำดับ เมื่อเลี้ยงร่วมกัน 5 วัน บนอาหาร PDA/$SW_{30\ ppt}$ รองลงมาคือ แอคทิโนมัยซีท SSPB4207 ให้ผลการยับยั้ง *C. capsici* DOAC 1511 และ *C. gloeosporioides* DOAC 0782 ด้วยค่า %IE สูงสุดเท่ากับ 75.0 และ 73.0 ตามลำดับ

เมื่อทดสอบด้วยวิธี disc diffusion สารสกัดหยาบเอธิลอะซิเตทส่วนใหญ่ที่สกัดจากอาหารที่ผ่านการเลี้ยงรา PDA/dw และ PDA/$SW_{30\ ppt}$ จำนวน 45 สายพันธุ์ (90 สาร) ที่ซึ่งผลการทดสอบบน dual culture แสดง %IE≥35 คือยับยั้งราก่อโรคพืชได้ สารสกัด 86.7% และ 81.1% ยับยั้ง *C. gloeosporioides* DOAC 0782 และ *C. capsici* DOAC 1511 ได้ตามลำดับ จำนวนสารสกัดที่เตรียมจากอาหารเลี้ยงราที่ความเค็มต่างกันในทุกระดับมีประสิทธิภาพ ไม่แตกต่างกัน สารสกัด 10 สาร จากรา 10 สายพันธุ์ มีค่า %IE ≥70 ต่อ *Colettotrichum* spp. อย่างน้อย 1 ชนิด โดยที่สารสกัด SSPB3208 ทั้งที่สกัดจาก PDB/$SW_{30\ ppt}$ และ PDB/dw มีฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคพืชสูงสุด สารสกัด SSPB3208 สกัดจาก PDB/SW_{30ppt} แสดงค่า MIC ต่ำสุดเมื่อทดสอบกับราก่อโรคพืช *C. gloeosporioides* DOAC 0782 และ *C. capsici* DOAC 1511 เป็นเวลา 3 วัน คือมีค่าเท่ากับ 256-512 µg/ml ขณะที่สารสกัด SSPB3124 สกัดจาก PDB/$SW_{30\ ppt}$ แสดงค่า MIC ต่ำสุดต่อ *Colettotrichum* ทั้ง 2 ชนิด เมื่ออ่านผลหลังบ่ม 3 วัน คือเท่ากับ 512 µg/ml จากการศึกษาเพิ่มเติมยังพบว่าสารสกัด SSPB3124 และ SSPB3208 จากอาหารที่ผ่านการเลี้ยงรา PDB/$SW_{30\ ppt}$ ยังสามารถยับยั้งราก่อโรคพืช *F. oxysporum* DOAC 1808, *F. subglutinans* DOAC 0761 และ *Pestaotiopsis* sp. DOAC 1098 ได้ดี

การจัดจำแนกราทางสัณฐานวิทยาและการเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน beta tubulin และดีเอ็นเอบริเวณ ITS แสดงให้เห็นว่าทั้งรา SSPB3208 และ SSPB3124 น่าจะเป็น *Aspergillus* ชนิดเดียวกัน แต่ยังไม่สามารถระบุสปีชีส์ได้ แม้ว่าจะมีแนวโน้มสูงว่าจะเป็น *Aspergillus niveus* (99% similarity)

5.2. อภิปรายผลการทดลอง

มีรายงานว่าเมื่อเลี้ยงราร่วมกันจะเกิดปฏิสัมพันธ์ 3 ลักษณะ คือ ปฏิปักษ์ทางตรง (Direct antagonism) ปฏิปักษ์ทางอ้อม (Indirect antagonism) และปฏิปักษ์แบบผสม (Mixed-path antagonism) การเกิดปฏิสัมพันธ์แบบ antibiosis ในการยับยั้งราก่อโรคพืชของรานาเกลือเป็นแบบผสม คืออาจเกิดจากรานาเกลือสร้าง ผลิต และหลั่งสารปฏิชีวนะ (Antibiotics) หรือ สารพิษ (Toxin) ออกมายับยั้งหรือทำลายราก่อโรคพืช หรือรานาเกลืออาจสร้างของเสีย หรือสารออกมารบกวนทางกายภาพและทางเคมี ทำให้ไม่เหมาะกับการเจริญราก่อโรคพืช (Pal & Gardener, 2006) แต่ในการศึกษานี้เลือกศึกษาลักษณะ antibiosis มาใช้เป็นการคัดกรองราเบื้องต้น เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่ายและสะดวกโดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อใช้ ค่า ID มากกว่า 2 มิลลิเมตร เป็นเกณฑ์ร่วมกับวิธี dual culture ค่า ID มากกว่า 2 มิลลิเมตร แสดงให้เห็นว่าเป็นปฏิสัมพันธ์ที่ไม่ได้เกิดจาก Mutual inhibition at a distance ซึ่ง Porter (1924) และ Dickinson and Boardman (1971) เคยรายงานไว้

การพบว่ารานาเกลือ 42.7% จากจำนวน 150 สายพันธุ์ที่ศึกษา สามารถยับยั้งราก่อโรคพืช *Colletotrichum* spp. ด้วยปฏิสัมพันธ์แบบ antibiosis ได้ดี สูงกว่ารายงานจากราเอนโดไฟท์จากป่าชายเลน ที่ รา 30.8 และ 37.5% จากรา 150 สายพันธุ์ที่ศึกษา แสดงปฏิสัมพันธ์แบบ antibiosis กับ *C. capsici* DOAC 1511 และ *C. gloeosporioides* DOAC 0782 ตามลำดับ (Khrueayu & Pilantanapak, 2012) ยิ่งกว่านั้น ในการศึกษานี้สามารถพบราหลายสายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญรา *Colletotrichum* spp. ได้ด้วยประสิทธิภาพสูงมากกว่า 70% และส่วนใหญ่เป็นราชอบเค็มแบบ facultative คือเจริญได้ดีทั้งในอาหารที่ไม่มีความเค็มจนถึงในระดับที่ความเค็มสูงมากได้ (Nayak, 2012) ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่เอื้อต่อการนำมาพัฒนาใช้เป็นเชื้อปฏิปักษ์กับราก่อโรคพืชได้หลากหลาย ทั้งกับพืชที่เจริญในน้ำจืด น้ำกร่อยหรือน้ำเค็ม

การศึกษาความสามารถของรานาเกลือในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชแอนแทรกโนส โดยวิธี dual culture พบว่า รานาเกลือสามารถยับยั้งราสาเหตุโรคพืชด้วย %IE ดีที่สุด เมื่อเลี้ยงร่วมกัน 5 วัน บนอาหาร PDA/$SW_{30\ ppt}$ ดังที่มีรายงานว่าระยะการเจริญของรามีผลต่อการสร้างสารก่อฤทธิ์ชีวภาพและสะสมสารในปริมาณที่แตกต่างกัน ในช่วงเวลา 1-3 วัน รานาเกลือส่วนใหญ่อยู่ในช่วง lag phase ซึ่งเป็นช่วงที่ราปรับตัวเข้ากับอาหารและสิ่งแวดล้อมใหม่ ในช่วงนี้รามีการสร้างเอนไซม์และสารอื่นก่อฤทธิ์ชีวภาพ ที่เป็นสารปฐมภูมิ (Primary metabolite) ที่เหมาะสมสำหรับการเจริญ (Griffith, 1994) จึงไม่พร้อมที่จะสร้างสารก่อฤทธิ์ชีวภาพ ที่มีฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคพืช ซึ่งเป็นสารประกอบทุติยภูมิ (Secondary metabolite) สอดคล้องกับผล antibiosis ที่มีประสิทธิภาพดีหลังการบ่ม 3 วันแต่เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 5 วันรานาเกลือซึ่งทั้งหมดเป็น *Aspergillus* ที่เจริญเร็ว น่าจะเจริญอยู่ในช่วงปลาย log phase ถึง stationary phase สามารถสร้างและสะสมสารประกอบทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคปริมาณมากขึ้น อย่างไรก็ตามการเลี้ยงรานาเกลือในอาหารเหลวก่อนนำอาหารไปสกัดสาร ได้เลือกราเลี้ยงรานาเกลือเป็นเวลา 10 วัน เพื่อให้ราส่วนใหญ่เจริญอยู่ในช่วง stationary phase และสร้างสารทุติยภูมิมากเพียงพอที่จะนำสารสกัดไปใช้ทดสอบในขั้นต่อไป

จากการศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชโดยเทคนิค disc diffusion ของสารสกัดจากอาหารเหลว PBD/dw และ PDB/$SW_{30\ ppt}$ จำนวน 90 สาร จากรานาเกลือ 45 สายพันธุ์ ที่คัดเลือกไว้ พบว่าบางครั้งประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคพืชของสารสกัด ไม่สอดคล้องกับผลการศึกษาปฏิสัมพันธ์ของรานาเกลือในการยับยั้งโดยวิธี dual culture ทั้งนี้เนื่องจากการคัดกรองจากผลยับยั้งด้วยวิธี dual culture ไม่สามารถแยกได้แน่ชัดว่าค่า ID ที่วัดได้ เกิดจากการยับยั้งของสารก่อฤทธิ์ชีวภาพปฐมภูมิหรือทุติยภูมิ เนื่องจากราในสิ่งแวดล้อมทางทะเลรวมทั้งราอื่นๆ สามารถสร้างสารพิษ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเอนไซม์ไคติเนส ออกมาย่อยผนังเซลราก่อโรคที่ทดสอบได้ (Suresh & Chandrasekaran, 1998) ในขณะที่การทดสอบสารสกัด ด้วยวิธี disc diffusion ผลการยับยั้งเกิดจากสารทุติยภูมิเป็นหลัก ดังนั้นการที่บางครั้งสารสกัดไม่สามารถยับยั้งราโรคพืชหรือมีผลการยับยั้งลดลงเมื่อเทียบกับการทดสอบโดยวิธี dual culture อาจเนื่องจากราสายพันธุ์นั้น สร้างเพียงสารก่อฤทธิ์ปฐมภูมิยังไม่สร้างสารก่อฤทธิ์ที่เป็นสารทุติยภูมิหรือสร้างเพียงปริมาณน้อย (Walker & White, 2005) หรืออาจเป็นเพราะไม่สามารถสกัดสารออกมาได้แม้ว่ารานั้นจะสามารถสร้างสารและส่งออกนอกเซลได้ มีรายงานว่าราหลายชนิดที่แยกจากสิ่งแวดล้อมสามารถผลิตสารก่อฤทธิ์ชีวภาพทุติยภูมิที่มีคุณสมบัติหลากหลาย เช่น polyketide, terpene, terpenoid, quinone, indole และ alkaloid (Hasan *et al.,* 2015; Keller *et al.,* 2005; Swathi *et al.,* 2013; Vaske & Crews, 2014) สารเหล่านี้มีความแรงของขั้วแตกต่างกัน ethyl acetate เป็นทำละลายที่มีขั้วปานกลาง จึงสามารถดึงสารเฉพาะที่มีขั้วปานกลาง (Medium polarity compound) ออกจากอาหารที่นำมาสกัดแต่ไม่สามารถดึงสารที่มีขั้วสูง (High polarity compound) หรือสารที่มีขั้วต่ำ (Low polarity compound) ที่ออกฤทธิ์ในอาหารออกมาได้ ดังนั้น ethyl acetate ที่เลือกนำมาเป็นตัวทำละลาย อาจไม่สามารถสกัดสารออกฤทธิ์ที่มีขั้วปานกลางบางชนิด เช่น peptide และสารขั้วต่ำ เช่น terpene, hydrocarbon ที่อยู่ในอาหารเหลวออกมาได้ (Justino *et al.,* 2014) ดังนั้นหากสารที่ก่อฤทธิ์ยับยั้งที่รานาเกลือสร้างขึ้นเป็นสารประเภทต่างๆ เหล่านี้ ผลการยับยั้งของสารสกัดก็จะไม่ดีเท่าที่ควร ในครั้งต่อไปจึงอาจทดลองเปลี่ยนตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสาร แต่การที่เลือกสกัดสารยับยั้งด้วย ethyl acetate เนื่องจาก ethyl acetate เป็นตัวทำละลายที่มีการใช้กันอย่างกว้างขวางในการสกัดสารออกฤทธิ์ชีวภาพทุติยภูมิจากราหลายกลุ่ม เพื่อยับยั้งจุลินทรีย์ต่างๆ รวมทั้งราด้วยกันเอง มีรายงานว่าการใช้ ethyl acetate สกัดสารจากอาหารเหลวเลี้ยงราทะเล *Aspergillus terreus* MP1 และ *A. ochraceus* MP2 ที่แยกได้จากฟองน้ำทะเล ประเทศอินเดีย สามารถสกัดสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับตัวทำละลายอื่นๆ (Meenupriya, *et al.,* 2011; Meenupriya & Thangaraj, 2011) อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานถึงประเภทของสารออกฤทธิ์ที่รานาเกลือผลิตขึ้น รวมถึงชนิดตัวทำละลายที่สามารถสกัดสารได้ดีที่สุด

ในการทดสอบผลของความเค็มอาหารที่เลี้ยงราก่อนนำมาสกัดสารพบว่า ส่วนใหญ่สารสกัดยับยั้ง *C. gloeosporioides* DOAC 0782 และ *C. capsici* DOAC 1511 ได้บนอาหาร PDA/$SW_{30\ ppt}$ ได้ดีกว่า PDA/dw แต่แม้ว่าจะมีการนำอาหารเหลวที่ไม่มีความเค็ม (PDB/dw) และมีความเค็ม (PDB/$SW_{30\ ppt}$) จากการเลี้ยงรา

สายพันธุ์เดียวกันในปริมาณเท่ากันทุกฟลาสก์ นำไปสกัดสารจนแห้ง ละลายในตัวทำละลายเดียวกันปริมาตรเท่ากัน และนำสารสกัดที่ละลายแล้วปริมาตรเท่ากันมาทดสอบ บางครั้งก็ยังพบประสิทธิภาพการยับยั้งที่แตกต่างกันของสารสกัด ซึ่งอาจเกิดจากชนิดของสารออกฤทธิ์ที่สร้างขึ้นไม่เหมือนกัน หรือออกฤทธิ์ได้ไม่เท่ากัน

การที่สารสกัดยับยั้งราทดสอบ *Colletotrichum* spp. ได้บนอาหาร PDA/$SW_{30\ ppt}$ ได้ดีกว่า PDA/dw รวมถึงที่พบว่ารานาเกลือชนิดเดียวกันสร้างสารที่มีฤทธิ์แตกต่างกันในอาหารเหลวที่มีความเค็มต่างกัน ให้ผลเช่นเดียวกับฤทธิ์ของสารสกัดจากราหลายชนิดที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมทางทะเล ประเทศอินโดนีเซีย (Tarman *et al.,* 2011) แต่ขัดแย้งกับที่มีรายงานในราทะเลกลุ่ม lignicolous marine fungi และราทะเลอีกหลายกลุ่ม มีรายงานว่าราทะเลกลุ่มนี้สร้างสารก่อฤทธิ์ชีวภาพบนอาหารที่เตรียมจากน้ำกลั่นได้ดีกว่าน้ำทะเล เนื่องจากไม่ต้องสิ้นเปลืองพลังงานไปกับการผลิตสารรักษาแรงดันออสโมซีสในเซล (Bugni & Ireland, 2003)

การศึกษา MIC และ MLC ต่อ *C. capsici* DOAC 1511 และ *C. gloeosporioides* DOAC 0782 ของสารสกัดอาหารเหลว PDB เลี้ยงรานาเกลือที่คัดเลือกมาจำนวน 7 สายพันธุ์ ทั้งที่เตรียมจากน้ำกลั่นและน้ำทะเล จำนวน 14 สาร พบว่า ส่วนใหญ่มีค่าแตกต่างกัน ชี้ให้เห็นถึงฤทธิ์ในการยับยั้งราก่อโรคมากกว่าการทำลาย ยกเว้นสารสกัด SSPB3208 ที่สกัดจากน้ำกลั่นที่ ค่า MIC และ MLC ต่ำสุด ต่อ *C. gloeosporioides* DOAC 0782 มีค่า 512 µg/ml เท่ากัน

การจำแนกรานาเกลือที่มีความสามารถด้านต่างๆ โดยอาศัยลักษณะสัณฐานร่วมกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบริเวณ Internal transcribed spacer (ITS) หรือยีน beta-tubulin สามารถจำแนกราส่วนใหญ่ได้ในระดับจีนัส โดยพบว่ารานาเกลือทั้งหมดเป็นสมาชิกในจีนัส *Aspergillus* เนื่องจากแต่ละสปีชีส์ของราในจีนัส *Aspergillus* มีความแปรผันของลักษณะฟีโนไทป์ของค่อนข้างสูง โดยเฉพาะกรณีที่มีสถานะของ anamorph และ teleomorph เข้ามาเกี่ยวข้อง การใช้ข้อมูลระดับโมเลกุลเข้ามาช่วยในการจำแนกจึงมีความสำคัญ อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้ได้ศึกษาข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS หรือยีน beta-tubulin เพื่อนำมาใช้ในการจำแนกราจากนาเกลือ แต่ข้อมูลดังกล่าวยังไม่เพียงพอสำหรับบ่งชี้ความแตกต่างหรือระบุเชื้อได้ในระดับสปีชีส์ โดยในการจำแนกสปีชีส์ของราในจีนัส *Aspergillus* มีความจำเป็นต้องใช้หลายวิธีร่วมกัน โดยในวิธีระดับโมเลกุล อาจจำเป็นต้องศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนหลายยีนร่วมกัน หรือวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนม รวมทั้งการทำ DNA array

ราในจีนัส *Aspergillus* พบได้มากในสิ่งแวดล้อมนาเกลือ (Cantrell *et al.,* 2006; 2011) มีรายงานการพบ *Aspergillus* หลายชนิดที่แยกได้จากแหล่งมีความเค็มสูงที่มีคุณสมบัติชอบเค็ม เช่น *A. penicillioides, A. flavus, A. fumigatus, A. nidulans, A. penicillioides*, *A. sydowii*, *A. versicolor* (Gonsalves *et al.,* 2012) และมีรายงานการศึกษา *Aspergillus* ที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะโดยส่วนใหญ่แยก *Aspergillus* sp. ได้จากดิน (Dix & Webster, 1995; Klich, 2002; Thompson *et al.,*1994) *Aspergillus* หลายชนิดสามารถผลิตยาปฏิชีวนะและผลิตสารพิษ mycotoxin ซึ่งเป็น toxin ทุติยภูมิที่สร้างขึ้นในอากาศ และสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม

การที่รานาเกลือที่มีคุณสมบัติยับยั้งและสร้างสารยับยั้ง *Colletotrichum* spp. ที่ดี โดยเฉพาะอย่างยิ่ง SSPB3208 และ SSPB3124 เป็น *Aspergillus* ซึ่งเป็นราที่หลายสปีชีส์สร้างสารพิษและก่อโรคได้ ทำให้อาจมีข้อจำกัดในการนำไปใช้งานพอสมควร สิ่งที่ต้องศึกษาต่อไปคือการระบุสปีชีส์ให้แน่ชัด การศึกษาการสร้างสารพิษของรา ตลอดจนการศึกษาคุณสมบัติและความเป็นพิษของสารยับยั้งที่ผลิต เพื่อที่สามารถนำข้อดีของรานี้ไปใช้ประโยชน์ในการควบคุม *Colletotrichum* รวมทั้งราก่อโรคพืชอื่นๆ ได้อย่างปลอดภัย

5.3. ข้อเสนอแนะ

โดยสรุปจากการศึกษาพบว่ารานาเกลือโดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Aspergillus* spp. เป็นราที่มีคุณสมบัติเด่นในการยับยั้งราก่อโรคแอนแทรกโนส ทั้งในแง่ที่รานี้สามารถมีปฏิสัมพันธ์แบบ antibiosis ยับยั้ง *Colettotrichum* ที่อาศัยอยู่ร่วมกัน และสามารถสร้างสารก่อฤทธิ์ชีวภาพ ที่สามารถสกัดออกมาใช้ประโยชน์ในการยับยั้ง *Colletotrichum* ในสิ่งแวดล้อมได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้น *Aspergillus* อย่างน้อย 1 สายพันธุ์ ซึ่งเลี้ยงได้ง่ายในน้ำจืด เจริญเร็ว คือ SSPB3208 หากผ่านการศึกษาความปลอดภัยแล้ว น่าจะสามารถนำมาใช้ทั้งในแง่ที่เป็นเชื้อปฏิปักษ์ในการควบคุมทางชีวภาพของ *Colettotrichum* spp. โดยตรงหรือนำมาเลี้ยงในทางการค้าเพื่อสกัดสารยับยั้งรา *Colettotrichum* ส่วนรา SSPB3124 ซึ่งสร้างสารยับยั้งราก่อโรคพืชได้ดีกว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีเกลือ อาจนำมาเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีความเค็มเหมาะสม เพื่อสกัดสารยับยั้งราก่อโรคพืช อย่างไรก็ตามราทั้งสองสายพันธุ์นี้ สามารถนำสารสกัดหยาบจากอาหารที่เตรียมจากน้ำจืดมาใช้ยับยั้งราก่อโรคแอนแทรกโนสได้ทั้ง *C.capsici* และ *C. gloeosporioides* นอกจากนี้การที่ราทั้ง 2 สายพันธุ์นี้มีแนวโน้มเป็นราชนิดใหม่และเป็นราชอบเค็ม จึงเป็นไปได้ว่าสารที่ผลิตได้นอกจากมีประโยชน์ในการยับยั้งราก่อโรคแอนแทรกโนสแล้ว ยังอาจสามารถสารที่มีคุณสมบัติใหม่อื่นๆ อีก รวมถึงสามารถนำไปใช้กับพืชที่ปลูกในดินเค็มหรือป่าชายเลนได้

5.4. ผลผลิต

งานวิจัยนี้ได้นักศึกษาด้านอนุกรมวิธานของราและการนำไปใช้ประโยชน์เพิ่มขึ้น 1 คน

บรรณานุกรม

คลังปัญญาไทย (2556). *การทำนาเกลือ*. เข้าถึงได้จาก http://www.punyathai.or.th/wiki/index.php/

ฐานข้อมูลความรู้ทางทะล. (2553). *การทำนาเกลือ.* เข้าถึงได้จาก http://www.mkh.in.th/index.php/2010-03-22-18-05-14/2010-03-26-05-53-43.

Adams, D. J. (1997). Drug and pesticide resistance in fungi. In J. D. Hayes, & C. R. Wolf (Eds.), *Molecular genetics of drug resistance* (pp. 31-80). Amsterdam: Harwood Academic Publishers.

Ali, I., Kanhayuwa, L., Rachdawong, S. and Rakshit, S.K. (2012). Identification, phylogenetic analysis and characterization of obligate halophilic fungi isolated from a man-made solar saltern in Phetchaburi province, Thailand. *Annals of Microbiology*, *63,* 887-895.

Ali, I., Siwarungson, N., Punnapayak, H., Lotrakul, P., Prasongsuk, S., Bankeeree, W. and Rakshit, S.K. (2014). Screening of potential biotechnological applications from obligate halophilic fungi, isolated from a man-made solar saltern located in Phetchaburi province, Thailand. *Pakistan Journal of Botany*, *46,* 983-988.

Arcury, T. A., Quandt, S. A. and Russell, G. B. (2002). Pesticide safety among farmworkers: perceived risk and perceived control as factors reflecting. *Environmental Health Perspectives, 110 (Suppl. 2),* 233-240.

Atkins, S.D., and Clark, I.M. (2004). Fungal molecular diagnostics: a mini review. *Journal of Applied Genetics*, *45*, 3–15.

Barnett, H. L. and Hunter, B. B. (2006). *Illustrated genera of imperfect fungi* (4thed.). St. Paul Minnesota**:** The American Phytopathological Society Press.

Behal, V. (2003). Alternative sources of biologically active substances. *Folia Microbiologica*, *48,* 563-571.

Bernan, V.S., Greenstein, M. and Maise, W.M. (1997). Marine microorganisms as a source of new natural products. *Advance in Applied Microbiology*, *43,* 57-90.

Bosland, P. W. and Votava, E. J. (2003). *Peppers: vegetable and spice capsicums*. New York: CAB International.

Brock, T.D. (1979). Ecology of saline lake. In M. Shilo (Eds.), *Strategies of microbial life in extreme environment.* (pp. 29-49). Berlin, Dahlem Knferenzen.

Buchalo, A. S., Nevo, E., Wasser, S. P., Oren, A. and Molitoris, H. P. (1998). Fungal life in the extremely hypersaline water of the Dead Sea first records. *The Royal Society*, *265,* 1461-1465.

Bugni, T.S. and Ireland, C.M. (2004). Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse Group of microorganisms. *Natural Product Reports, 21*, 143-163.

Cabrito, T.R., Teixeira, M.C., Duarte, A.A., Duque, P. and Sá-Correia, I. (2009). Heterologous expression of Tpo1 homolog from *Arabidopsis thaliana* confers resistance to the herbicide 2, 4-D and other chemical stress in yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology, 84,* 927-936.

Cantrell, S. A., Dianese, J. C., Fell, J., Gunde-Cimerman, N. and Zalar, P. (2011). Unusual fungal niches. *Mycologia*, *103,* 1161-1174.

Cantrell, S. A., Martinez, L. C. and Molina, M. (2006). Characterization of fungi from hypersaline environments of solar salterns using morphological and molecular techniques. *Mycological Research*, *110,* 962–970.

Chatchawan, T., Peerapornpisal, Y. and Komarek, J. (2011). Diversity of cyanobacteria in man-made solar saltern, Petchaburi Province, Thailand. *Fottea*, *11,* 203–214.

DasSarma, S. and Arora, P. (2001). Halophiles. *Encyclopedia of Life Sciences*. 1-9. DOI: 10.1038/npg.els.0000394

Dickinson, C. H. and Boardman, F. (1971). Physiological studies of some fungi isolated from peat. *Transactions of the British Mycological Society*, *55,* 293-305.

Dix, N. J. and Webster, J. (1995). *Fungal Ecology*. London: Chapman & Hall.

Frisvad, J. C., and Samson, R. A. (2004). Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate penicillia and their mycotoxins. *Studies in Mycology*, *49,* 1-173.

Gautam, A. K. (2014). The genera *Colletotrichum*: an incitant of numerous new plant diseases in India Gautam. *Journal on New Biological Reports*, *3*, 9-21.

Gonsalves, V., Nayak, S. and Nazareth, S. (2012). Halophilic fungi in a polyhaline estuarine habitat. *Journal of Yeast and Fungal Research*, *3,* 30-36.

Greetchen, M.D. (2006). Fungal diversity present at a hypersaline environment in Cabo Rojo, Puerto Rico determine by characterization of isolates and analysis of environmental rRNA genes clones libraries. Thesis Master of Science in Biology. University of Puerto Rico Mayaguez Campus.Puerto Rico.

Griffith, R. W. (1994). The life of the first vertebrates. *Bioscience*, *44,* 408-409.

Gunde-Cimerman, N. and Zalar. P. (2014). Extremely halotolerant and halophilic fungi inhabit brine in solar salterns around the Globe. *Food Technology and Biotechnology*, *52*, 170-179.

Gunde-Cimerman, N., Ramos, J. and Plemenitas, A. (2009). Halotolerant and halophilic fungi. *Mycological Research*, *113,* 1231-1241.

Gunde-Cimerman, N., Zalar, P., de Hoog, G. S. and Plemenitas, A. (2000). Hypersaline waters in salterns: natural ecological niches for halophilic black yeasts. *FEMS Microbiology Ecology*, *32*, 235-240.

Hadden, J. F. and Black, L. L. (1989). Anthracnose of pepper caused by *Colletotrichum* spp. In *Proceeding of the international symposium on integrated management practices: tomato and pepper production in the tropics* (pp.189-199)*,* Taiwan: Asian Vegetable Research and Development Centre.

Han, K. H. and Prade, R. A. (2002). Osmotic stress-coupled maintenance of polar growth in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology*, *43,* 1065-1078.

Hasan, S., Ansari, M. I., Ahmad, A. and Mishra, M. (2015). Major bioactive metabolites from marine fungi: A Review. *Bioinformation*, *11,* 176-181.

Horbach, R., Navarro-Quesadac, A. R., Knoggec, W. and Deising, H. B. (2011). When and how to kill a plant cell: Infection strategies of plant pathogenic fungi, *Journal of Plant Physiology*, *168*, 51-62.

Hyde, K. D. (2001). Increasing the likelihood of novel compound discovery from filamentous fungi. In S. B. Pointing & K. D. Hyde (Eds.), *Fungal Diversity Research Series 6*, (pp.77-91). Hong Kong, Fungal Diversity Press.

Ireland, C. M., Roll, D. M., Molinski, T. F., McKee, T. C., Zabriskie, T. M. and Swersey, J. C. (1988). Uniqueness of the marine chemical environment, categories of marine natural products from invertebrates. *Biomedical Important of Marine Organism*s, *13,* 1-43.

Ireland, C. M., Copp, B. R., Foster, M. P., McDonald, L. A., Radisky, D. C. and Swersey, J. C. (1993). Biomedical importance of marine natural products, In D. H. Attaway and O. R. Zaborsky (Eds.), *Marine Biotechnology.* (pp. 1-43). New York, Plenum Press.

Justino, C. I. L., Duarte, K., Freitas, A. C., Duarte, A. C. and Rocha-Santos, T. (2014). Classical Methodologies for preparation of extracts functions. In D. Barcelo (Ed.), *Analysis of Marine Samples in Search of Bioactive Compounds* (pp 35-57). Netherlands: Elsevier.

Kaewchai, S., Soytong, K., and Hyde, K.D. (2009). Mycofungicides and fungal biofertilizers. *Fungal Diversity*, *38*, 25-50.

Keller, N. P., Turner, G. and Bennett, J. W. (2005). Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics. *Nature Reviews Microbiology*, *3*, 937-947.

Kim, J. H., Chang, P. K., Chan, K. L. Faria, N. C. G., Mahoney, N., Kim, Y. K., Martins M. L. and Campbell, B. C. (2012). Enhancement of commercial antifungal agents by kojic acid. *International Journal of Molecular Sciences, 13,* 13867-13880.

Klich, M. A. (2002). Identification of common *Aspergillus* species. Centraal bureau voor schimmel cultures, P.O.Box 85167, www.cbs.knaw.nl/publications/index.html

Kobayashi, J. and Ishibashi, M. (1993). Bioactive metabolites of symbiotic marine microorganisms. *Cheminform*, *93,* 1753-1769.

Khrueayu and Pilantanapak (2012). Antifungal activity of bioactivity compound from endophytic fungi isolated from mangrove leaves. In Proceeding of 1st Mae Fah Luang University International Conference. Chieng Rai, Thailand.

Kumar, P. and John, S. A. (2013). Invitro anti-fungal activity of *Excoecaria agllocha.* L. from Pichavarum mangrove forest. *International Journal of Plant, Animal and Environmental sciences*, 3, 32-34.

Kurtboke, I. and Swings, J. (2004). Microbial genetic resources and biodiscovery. Australia, Queensland, Complete Printing Services.

Kushner, D. J. (1993). Growth and nutrition of halophilic bacteria. *In* R. H. Vreeland, & L. Hochstein, (Eds.), *The Biology of halophilic bacteria* (pp 87-103). Florida: CRC Press.

Mani, K., Salgaonkar, B. B., Das, D. and Bragança, J. M. (2012). Community solar salt production in Goa, India. *Aquatic Biosystems, 8,* 1-8.

Margesin, R. and Schinner, F. (2001). Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles*. 5, 73-83.

Meenupriya, J., Majumdar, A., Jenifer, A., Britto, U. and Thangaraj, M. (2011). Biochemical analysis and structure elucidation of α- Campholene aldehyde from marine sponge-derived Aspergillus terreus MP1, *Der Pharma Chemica*, *3,* 466-473.

Meenupriya, J. and Thangaraj, M. (2011). Analytical characterization and structure elucidation of metabolites from *Aspergillus ochraceus* MP2 fungi. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 1,* 376-380.

Moubasher, A. H., Abdel-Hafez, S. I. I., Bagy, M. M. K. and Abdel-Satar, M. A. (1990). Halophilic and halotolerant fungi in cultivated desert and salt marsh soils from Egypt. *Acta Mycologica*, *26,* 65-81.

Nayak, S. S., Gonsalves, V. and Nazareth, S. W. (2012). Isolation and salt tolerance of halophilic fungi from mangroves and solar salterns in Goa-India. *Indian Journal of Marine Science, 42,* 164-172.

Oren, A. (2002). Hypersaline environment and their biota. In A. Oren (Ed.), Halophilic microorganism and their environment, Life in extreme habitats and astrobiology (pp. 575). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.

Pal, K. K. and Gardener, B.M.S. (2006). Biological control of plant pathogens. *The Plant Health Instructor,* p1-25. Doi; 10.1094 (PHI-A-20006-1117-02)

Phongpaichit, S., Nikom, J., Rungjindamai, N., Sakayaroj, J., Hutadilok-Towatana, N., Rukachaisirikul, V. and Kirtikara, K. (2007). Biological activities of extracts from endophytic fungi isolated from *Garcinia* plants. *Federation of European Microbiological Societies Immunology Medical Microbiol*ogy, *51,* 517-525.

Phongpaichit, S., Rungjindamai, N., Rukachaisirikul, V. and Sakayaroj J. (2006). Antimicrobial activity in cultures of endophytic fungi isolated from *Garcinia* species. *Federation of European Microbiological Societies Immunology and Medical Microbiology*, *48,* 367-372.

Platas G., Pelaez, F., Collado, J., Villuendas, G., and Diez, M.T. (1998) Screening of antimicrobial activities by aquatic hyphomycetes cultivated on various nutrient sources. *Cryptogam Mycol*ogy, *19,* 33–43.

Poonpolgul, S. and Kumphai, S. (2007). Chilli pepper anthracnose in Thailand. country report. In D. G. Oh, & K. T. Kim, (Eds.), *Abstracts of the first international symposium on chilli* anthracnose (p 23). Korea: National Horticultural Research Institute.

Porter, C. L. (1924). Concerning the characters of certain fungi as exhibited by their growth in the presence of other fungi. *American Journal of Botany*, *11,* 168-188.

Sati, S.C. and Arya, P. (2010). Antagonism of some aquatic hyphomycetes against plant pathogenic fungi. *The Scientific World Journal*, *10,* 760–765.

Suresh, P.V. and Chandrasekaran, M. 1998. Utilization of prawn waste for chitinase production by the marine fungus Bea*uveria bassiana* by solid state fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *14*, 655-660.

Swathi, J., Sowjanya, K. M., Narendra, K., Reddy, K. V. N. R. and Satya, A. K. (2013). Isolation, identification & production of bioactive metabolites from marine fungi collected from coastal area of Andhra Pradesh, India. *Journal of Pharmacy Research*, *6,* 663-666.

Tarman, K., Lindequist, U., Wende, K., Porzel A., Arnold, N. and Wessjohann, L. A. (2011). Isolation of a new natural product and cytotoxic and antimicrobial activities of extracts from fungi of Indonesian marine habitats. *Marine Drugs*, *9,* 294-306.

Than, P. P., Prihastuti, H., Phoulivong, S., Taylor, P. W. J. and Hyde, K. D. (2008). Chilli anthracnose disease caused by *Colletotrichum* species. *Journal of Zhejiang University Science B*, *9,* 764-778.

Thompson, L., Castrillon, M. A., Delgado, M. and García, M. (1994). Isolation of several species of the genus *Aspergillus* from soil of intrahospital ornamental plants. *Revista medica de Chile*, *122,* 1367-71.

Tuomela, M., Vikman, M., Hatakka, A. and Itavaara, M. 2000. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. *Bioresoure and Technology*, *72,* 169-183.

Vaske, Y. M. and Crews, P. (2014). An update on the biomedical prospects of marine-derived small molecules with fascinating stom and stereochemical diversity. *In* B. Hernandez-Ledesma, & M. Herrero, (Eds.). *Bioactive Compounds from Marine Foods: Plant and Animal Sources* (pp.1-26). United States: Wiley-Blackwell.

Walker, G. M. and White, N. W. (2005). Introduction to fungal physiology. I*n* K. Kavanagh (Ed.), *Fungi Biology and Applications* (pp.1-36). United Kingdom: John Wiley & Sons.

Whipps, J. M. (1987). Effect of media on growth and interactions between a range of soil-borne glasshouse pathogens and antagonistic fungi. *New Phytologist*, *107,* 127-142.

Zajc, J., Zalar, P., Plemenitaš, A. and Gunde-Cimerman, N. (2012). The mycobiota of the salterns. *In* C. Raghukumar (Ed.), Biology of Marine Fungi (pp. 133-158). Berlin: Springer.

ภาคผนวก

ขั้นตอนการเจือจางสารสกัด

ขั้น	ความเข้มข้น* (µg/ml)	แหล่ง	ปริมาตร (ml)	+	ตัวทำละลาย (ml) (DMSO)	=	ความเข้มข้น* (µg/ml)	(µ =	ความเข้มข้นสุดท้าย** ที่ 1:100 (µg/ml)	Log 2
1	12800	Stock					12,800		128	7
2	12800	Stock	0.5		0.5		6,400		64	6
3	12800	Stock	0.5		1.5		3,200		32	5
4	12800	Stock	0.5		3.5		1,600		16	4
5	1600	ขั้นตอนที่ 4	0.5		0.5		800		8.0	3
6	1600	ขั้นตอนที่ 4	0.5		1.5		400		4.0	2
7	1600	ขั้นตอนที่ 4	0.5		3.5		200		2.0	1
8	200	ขั้นตอนที่ 7	0.5		0.5		100		1.0	0
9	200	ขั้นตอนที่ 7	0.5		1.5		50		0.5	-1
10	200	ขั้นตอนที่ 7	0.5		3.5		25		0.25	-2
11	25	ขั้นตอนที่	0.5		0.5		12.5		0.125	-3
12	25	ขั้นตอนที่	0.5		1.5		6.25		0.0625	-4
13	25	ขั้นตอนที่	0.5		3.5		3.1		0.03	-5
14	3.1	ขั้นตอนที่	0.5		0.5		1.6		0.016	-6
15	3.1	ขั้นตอนที่	0.5		1.5		0.8		0.008	-7
16	3.1	ขั้นตอนที่	0.5		3.5		0.4		0.004	-8
17	0.4	ขั้นตอนที่	0.5		0.5		0.2		0.002	-9

* ละลายอยู่ใน DMSO

**ละลายด้วยอาหารทดสอบ