

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตโดย *Xylaria* spp. ซึ่งเก็บจากสถานีวิจัยและฝึกอบรมวนเกษตร
ตราด

นางสาวศิริประภา ประพานศรี

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของปีการศึกษา 2556 ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR) are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

BIOLOGICAL ACTIVE COMPOUNDS PRODUCED BY *Xylaria* spp. COLLECTED FROM
TRAT AGROFORESTRY RESEARCH AND TRAINING STATION

Miss Siraprapa Prapansri

The logo of Chulalongkorn University, featuring a central emblem with a sunburst and a tiered structure, set against a light background.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2013

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตโดย <i>Xylaria</i> spp. ซึ่งเก็บจากสถานีวิจัยและฝักอบรมวนเกษตรตราด
โดย	นางสาวศิริประภา ประพานศรี
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร. ประกิตต์สิน สีहनนท์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	อาจารย์ ดร. ณิชฎีกา สุวรรณาศรัย

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ ทารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร. ประกิตต์สิน สีहनนท์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(อาจารย์ ดร. ณิชฎีกา สุวรรณาศรัย)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุรัชย์ พรภคกุล)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(อาจารย์ ดร. เชิดชัย โพธิ์ศรี)

ศิริประภา ประพานศรี : สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตโดย *Xylaria* spp. ซึ่งเก็บจาก
 สถานีวิจัยและฝึกอบรมวนเกษตรตราด. (BIOLOGICAL ACTIVE COMPOUNDS
 PRODUCED BY *Xylaria* spp. COLLECTED FROM TRAT AGROFORESTRY
 RESEARCH AND TRAINING STATION) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. ดร. ประภิต
 ตีสิน สีหนนทน์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: อ. ดร. ณัฐริกา สุวรรณาศรัย, 121 หน้า.

Xylariaceae มีบทบาทสำคัญในระบบนิเวศ เนื่องจากทำหน้าที่เป็นผู้ย่อยสลายใน
 ธรรมชาติและบางชนิดสามารถผลิตสารประกอบทางชีวภาพซึ่งนำไปใช้ประโยชน์ในทางด้าน
 การแพทย์ การเกษตรและอุตสาหกรรมได้ นอกจากนี้ Xylariaceae ยังเป็นที่สนใจในแง่ของการ
 เป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพอีกด้วย ในการศึกษาครั้งนี้ได้แยก
Xylaria spp. ที่เก็บจากสถานีวิจัยและฝึกอบรมวนเกษตรตราดทั้งหมด 27 ไอโซเลต นำมาเลี้ยง
 ในอาหารเหลว malt extract broth แยกส่วนเส้นใยไปสกัดด้วยเมทานอลและน้ำเลี้ยงรากัด
 ด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ นำส่วนสกัดหยาบที่ได้จากเส้นใยและน้ำเลี้ยงรามาทดสอบความสามารถในการ
 ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ 5 ชนิดซึ่งได้แก่ *Bacillus subtilis* ATCC6633, *Staphylococcus*
aureus ATCC6538-P, *Escherichia coli* ATCC8739, *Pseudomonas aeruginosa*
 ATCC9027 และ *Candida albicans* ATCC 10231 พบว่า ส่วนสกัดหยาบที่สกัดจากน้ำเลี้ยงรา
 สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีกว่าส่วนสกัดหยาบที่สกัดจากเส้นใยและยับยั้งแบคทีเรียได้ดีกว่ายีสต์
 นอกจากนี้เมื่อนำส่วนสกัดหยาบที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ไปทดสอบความสามารถในการยับยั้ง
 เซลล์มะเร็ง 4 ชนิดด้วยวิธี MTT assay พบว่าส่วนสกัดหยาบที่สกัดจาก *Xylaria* sp. ไอโซเลต
 TR30 สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งปากมดลูก CaSki ได้อย่างจำเพาะเจาะจงโดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ
 10.01 ± 1.57 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อนำรา *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR30 ไปวิเคราะห์ทาง
 สัณฐานวิทยาและทางอนุชีววิทยาพบว่า เป็น *Xylaria badia* จากนั้นนำส่วนสกัดหยาบที่สกัดจาก
 น้ำเลี้ยงราของ TR30 ไปวิเคราะห์ทางเคมีโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีได้แก่ ทินเลเยอร์โครมาโท
 กราฟี (Thin-layer chromatography, TLC) โครมาโทกราฟีชนิดคอลัมน์และใช้เทคนิคสเปกโทรส
 โคปี (Spectroscopy) ได้แก่ Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR) และ
 Mass Spectroscopy (MS) พบว่า *Xylaria badia* สามารถสร้างสาร 4-carboxy-7-hydroxy-
 3-(1-hydroxyethyl)-3H-isobenzofuran-1-one ซึ่งเป็นสารที่ยังไม่เคยมีการรายงานมาก่อน

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2556

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

5372472023 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORDS: XYLARIA SP. / ANTIMICROBIAL / ANTICANCER / BIOLOGICAL ACTIVE COMPOUNDS

SIRAPRAPA PRAPANSRI: BIOLOGICAL ACTIVE COMPOUNDS PRODUCED BY *Xylaria* spp. COLLECTED FROM TRAT AGROFORESTRY RESEARCH AND TRAINING STATION. ADVISOR: ASSOC. PROF. PRAKITSIN SIHANONTH, Ph.D., CO-ADVISOR: NUTTIKA SUWANNASAI, Ph.D., 121 pp.

Fungi in the family Xylariaceae are common wood decay fungi. *Xylaria* has been shown to be potential source of natural products for exploitation in medicine, agriculture, and industry. They produce many secondary metabolites with very useful biological activities. In this study, metabolites of *Xylaria* spp. from Trad Agroforestry Research and Training Station were isolated from EtOAc extracts of the culture broths, methanol extract of mycelium grown in malt extract broth. The crude extracts were tested for antimicrobial activity against tested microorganisms such as *Staphylococcus aureus* ATCC6538-P, *Bacillus subtilis* ATCC6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027, *Escherichia coli* ATCC8739 and *Candida albicans* ATCC 10231. The results showed that the extracted crude extracts from culture broths against microorganisms better than crude extracts from mycelium. Moreover, nine crude extracts with strong antimicrobial activity were tested for cytotoxicity against 4 cancer cell lines such as CaSki (Human papilloma virus positive cervical cancer cell line), SiHa (Human papillomavirus type 16 (HPV16) positive cervical cancer cells), A375 (Human malignant melanoma) and Jurkat (Human acute T-cell leukemia). Only crude extract from isolate TR 30 showed the specific efficiency of cytotoxicity against CaSki cell line with IC₅₀ value of 10.01±1.57 µg/ml. In addition, morphology, cultural characteristics and ITS (internal transcribe spacer) sequencing analysis of isolate TR30 confirmed that it is belongs to *Xylaria badia*. Purification of bioactive compounds from this extract was carried out by chromatography and one pure compound was obtained that was identified as 4-carboxy-7-hydroxy-3-(1-hydroxyethyl)-3H-isobenzofuran-1-one.

Field of Study: Biotechnology

Student's Signature

Academic Year: 2013

Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ประกิตต์สิน สีहनนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่เมตตาเอาใจใส่ตลอดระยะเวลาที่ข้าพเจ้ากำลังศึกษารวมถึงการให้คำปรึกษาแนะนำในการเรียนและการวิจัยในครั้งนี้ตลอดจนตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร.ณัฐกานา สุวรรณาศรัย อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์ ที่ให้ความเมตตาช่วยประสิทธิ์ประสาทวิชาให้คำปรึกษาแนะนำในการเรียนและการวิจัยในครั้งนี้ตลอดจนตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ Professor Antony J S Whalley ที่เมตตาช่วยให้คำปรึกษาคำแนะนำด้วยดีเสมอมา

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ธนาภัทร ปาลกะ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือด้านการทดสอบปฏิบัติการต่อต้านเซลล์มะเร็ง

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.สุรัชย์ พรภคกุล ที่ให้คำปรึกษาและให้ความช่วยเหลือทางด้านเคมี

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน ประธานกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ และอาจารย์ ดร.เชิดชัย โพธิ์ศรี กรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้ข้อคิดเห็น ข้อเสนอแนะ และปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณเจ้าหน้าที่สถานีวิจัยและฝึกอบรมวนเกษตรตราดทุกท่านที่ให้ข้อมูลและความรู้ต่างๆ เกี่ยวกับสถานีวิจัยและฝึกอบรมวนเกษตรตราด

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ ที่ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้อบรมสั่งสอน และให้ความเมตตาเสมอมา

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกในการเรียนและการทำวิจัยด้วยดีมาโดยตลอด

ขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ในหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ และภาควิชาจุลชีววิทยา ที่ร่วมเรียน ร่วมทำกิจกรรมด้วยกันมา ทั้งยังให้ความช่วยเหลือ และให้คำปรึกษาในเรื่องต่างๆ ด้วยดีเสมอมา

ท้ายสุดนี้ ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัวของข้าพเจ้า ที่คอยให้ความรัก ความห่วงใย เป็นกำลังใจ และให้ความช่วยเหลือด้านต่างๆ ตลอดการทำวิทยานิพนธ์ และตลอดชีวิตของข้าพเจ้า

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณทุกท่านเป็นอย่างสูง

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญรูปภาพ.....	ฎ
คำย่อ.....	ณ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 เอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 รา Xylariaceae.....	4
2.2 รา Xylariaceae ในประเทศไทย	10
2.3 ราสกุล <i>Xylaria</i>	10
2.4 ลักษณะโครงสร้างทางด้านสัณฐานวิทยาของ <i>Xylaria</i>	10
2.4.1 การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (Teleomorph).....	11
2.4.2 การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (Anamorph).....	16
2.5 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สร้างโดยรา <i>Xylaria</i>	16
2.6 การจำแนกกลุ่มราโดยเทคนิคทางอณูชีววิทยา.....	19
2.7 สถานีวิจัยและฝึกอบรมวนเกษตรตราด.....	20
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	22
3.1 อุปกรณ์.....	22
3.2 สารเคมี.....	25
3.3 เก็บตัวอย่าง แยกเชื้อ และเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์	27
3.4 การเลี้ยง <i>Xylaria</i> spp. ในอาหารเหลวและการสกัด.....	27
3.4.1 การเตรียมหัวเชื้อ <i>Xylaria</i> spp. เพื่อเลี้ยงในอาหารเหลว.....	27
3.4.2 การเลี้ยง <i>Xylaria</i> spp. ในอาหารเหลว.....	27
3.4.3 สกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากน้ำเลี้ยง <i>Xylaria</i> spp.	28
3.5 การทดสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของ <i>Xylaria</i> spp.....	28
3.5.1 ทดสอบความสามารถของส่วนสกัดหยาบในการยับยั้งจุลินทรีย์	28

3.5.1.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ.....	28
3.5.1.2 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ	28
3.5.1.3 การเตรียมส่วนสกัดหยาบเพื่อใช้ในการทดสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์	29
3.5.1.4 โดยวิธี paper disc diffusion methods (Boyanova.....	29
3.5.1.5 โดยวิธี Minimal inhibitory concentration (MIC).....	30
3.5.2 ทดสอบความสามารถของส่วนสกัดหยาบในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง	31
3.5.2.1 เซลล์มะเร็งที่ใช้ในการทดสอบ	31
3.5.2.2 การเตรียมเซลล์มะเร็งทดสอบ	31
3.5.2.3 การเตรียมส่วนสกัดหยาบเพื่อใช้ในการทดสอบการยับยั้งเซลล์มะเร็ง	33
3.5.2.4 ทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งโดยวิธี 3 - (4, 5 - dimethyl-thiazol - 2 - yl) -2, 5 - diphenyltetrazolium bromide colorimetric assay (MTT).....	33
3.6 พิสูจน์เอกลักษณ์โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางพันธุกรรมด้วยวิธีทางอนุ ชีววิทยาของเชื้อ <i>Xylaria</i> sp. TR30.	35
3.6.1 การตรวจสอบการจัดจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา.....	35
3.6.2 การตรวจสอบการจัดจำแนกชนิดด้วยวิธีทางอนุชีววิทยา.....	35
3.6.2.1 การเตรียมเส้นใยราเพื่อใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ	35
3.6.2.2 การสกัดดีเอ็นเอ	36
3.6.2.3 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ internal transcribed spacer (ITS1-5.8S- ITS2 region) ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส (polymerase chain reaction, PCR)	36
3.6.2.4 ติดตามผลปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส โดย agarose gel electrophoresis	38
3.6.2.5 การทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์	38
3.6.2.6 วิเคราะห์หาลำดับเบสของดีเอ็นเอ	38
3.7 พิสูจน์เอกลักษณ์โครงสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของ <i>Xylaria</i> sp. TR30. ที่คัดเลือกได้... 39	
3.7.1 วิธี Agar well Diffusion Methods	40
3.7.2 วิธีโครมาโตกราฟีชนิดคอลัมน์ (Column Chromatography)	40
3.7.3 วิธี Thin Layer Chromatography (TLC)	40

3.7.4 วิธี Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR).....	40
3.7.5 วิธี Mass Spectroscopy (MS).....	40
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	41
4.1 เก็บตัวอย่าง แยกเชื้อ และเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์	41
4.2 การเลี้ยง <i>Xylaria</i> spp. ในอาหารเหลวและการสกัด	75
4.3 การทดสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อ <i>Xylaria</i> spp.	76
4.3.1 ทดสอบประสิทธิภาพของส่วนสกัดหยาบในการยับยั้งจุลินทรีย์.....	76
4.3.1.1 การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบด้วยวิธี paper disc diffusion methods	76
4.3.1.2 การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบด้วยวิธี minimal inhibitory concentration (MIC)	80
4.3.2 ทดสอบประสิทธิภาพของส่วนสกัดหยาบของ <i>Xylaria</i> ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง	81
4.4 พิสูจน์เอกลักษณ์โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางพันธุกรรมด้วยวิธีทางอนุ ชีววิทยาของ <i>Xylaria</i> sp. ไอโซเลต TR30	83
4.4.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา	83
4.4.2 การศึกษาลักษณะทางอนุชีววิทยา	85
4.5 พิสูจน์เอกลักษณ์โครงสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของ <i>Xylaria</i> sp. ไอโซเลต TR 30	86
บทที่ 5 สรุป และอภิปรายผลการทดลอง	93
รายการอ้างอิง	97
ภาคผนวก ก ข้อมูลด้านเคมี.....	104
ภาคผนวก ข สูตรอาหาร และวิธีการเตรียมสารเคมี	114
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	121

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 2.1 แสดงลักษณะของสโตรมาแบบต่างๆ ของ <i>Xylaria</i>	11
รูปที่ 2.2 แสดงลักษณะเพอริทีเซียของ <i>Xylaria polymorpha</i>	12
รูปที่ 2.3 แสดงลักษณะ papillate ostiole ของ <i>Xylaria melanura</i> (Lév.) Sacc.	13
รูปที่ 2.4 แสดงลักษณะแอสคัสและแอฟพิคัล แอปพาราตัส ของ <i>Xylaria aristata</i>	14
รูปที่ 2.5 แสดงลักษณะแอสโคสปอร์และเจอร์มสลิทของ <i>Xylaria longipes</i>	15
รูปที่ 2.6 แสดงโครงสร้างสาร Xanthones และ xylactam	16
รูปที่ 2.7 แสดงโครงสร้างของ Multiplolides A และ B	17
รูปที่ 2.8 แสดงโครงสร้างของ mellisol และ 1,8-dihydroxynaphthol1-O-a-glucopyranoside	17
รูปที่ 2.9 แสดงโครงสร้างของ 7-amino-4-methylcoumarin	18
รูปที่ 2.10 แสดงโครงสร้าง sordaricin	18
รูปที่ 2.11 แสดงโครงสร้าง 1 Xylariol A และ 2 Xylariol B.....	19
รูปที่ 2.12 แสดงโครงสร้าง 16-a-D-mannopyranosyloxyisopimar-7-en-19-oic acid	19
รูปที่ 2.13 แสดงตำแหน่ง primer มาจับที่บริเวณ Internal transcribed spacer (ITS) region ...	20
รูปที่ 4.1 แสดงลักษณะของสโตรมา แอสโคสปอร์ เจิร์มสลิท แอฟพิคัล แอปพาราตัส ของ <i>Xylaria</i> sp. ไอโซเลต TR01.....	41
รูปที่ 4.2 แสดงลักษณะของสโตรมา แอสโคสปอร์ เจิร์มสลิท ของ <i>Xylaria</i> sp. ไอโซเลต TR02/1 .	42
รูปที่ 4.3 แสดงลักษณะของสโตรมา แอสโคสปอร์ เจิร์มสลิท แอฟพิคัล แอปพาราตัส ของ <i>Xylaria</i> sp. ไอโซเลต TR02/3	43
รูปที่ 4.4 แสดงลักษณะของสโตรมา แอสโคสปอร์ เจิร์มสลิท แอฟพิคัล แอปพาราตัส ของ <i>Xylaria</i> sp. ไอโซเลต TR03/1	44

รูปที่ 4.5 แสดงลักษณะของสโตรมา แอสโคสปอร์ เจริ้มสลิท แอฟพิคัล แอปพาราตัสของ <i>Xylaria</i> sp. ไอโซเลต TR04	45
รูปที่ 4.6 แสดงลักษณะของสโตรมา แอสโคสปอร์ เจริ้มสลิท แอฟพิคัล แอปพาราตัส ของ <i>Xylaria</i> sp. ไอโซเลต TR05	46
รูปที่ 4.7 แสดงลักษณะของสโตรมา แอสโคสปอร์ เจริ้มสลิท ของ <i>Xylaria</i> sp. ไอโซเลต TR08	47
รูปที่ 4.8 แสดงลักษณะของสโตรมาของ <i>Xylaria</i> sp. ไอโซเลต TR09X.....	48
รูปที่ 4.9 แสดงลักษณะของสโตรมาของ <i>Xylaria</i> sp. ไอโซเลต TR15	48
รูปที่ 4.10 แสดงลักษณะของสโตรมา แอสโคสปอร์ เจริ้มสลิท ของ <i>Xylaria</i> sp. ไอโซเลต TR17... ..	49
รูปที่ 4.11 แสดงลักษณะของสโตรมา แอสโคสปอร์ เจริ้มสลิท แอฟพิคัล แอปพาราตัสของ <i>Xylaria</i> sp. ไอโซเลต TR20	50
รูปที่ 4.12 แสดงลักษณะของสโตรมา แอสโคสปอร์ เจริ้มสลิท แอฟพิคัล แอปพาราตัส ของ <i>Xylaria</i> sp. ไอโซเลต TR23	51
รูปที่ 4.13 แสดงลักษณะของสโตรมา แอสโคสปอร์ เจริ้มสลิท แอฟพิคัล แอปพาราตัส ของ <i>Xylaria</i> sp. ไอโซเลต TR28	52
รูปที่ 4.14 แสดงลักษณะของสโตรมา แอสโคสปอร์ เจริ้มสลิทของ <i>Xylaria</i> sp. ไอโซเลต TR30	53
รูปที่ 4.15 แสดงลักษณะของสโตรมา แอสโคสปอร์ของ <i>Xylaria</i> sp. ไอโซเลต TR31.....	54
รูปที่ 4.16 แสดงลักษณะของสโตรมาของ <i>Xylaria</i> sp. ไอโซเลต TR32.....	55
รูปที่ 4.17 แสดงลักษณะของสโตรมา แอสโคสปอร์ เจริ้มสลิท แอฟพิคัล แอปพาราตัส ของ <i>Xylaria</i> sp. ไอโซเลต TR34	55
รูปที่ 4.18 แสดงลักษณะของสโตรมา แอสโคสปอร์ เจริ้มสลิท แอฟพิคัล แอปพาราตัสของ <i>Xylaria</i> sp. ไอโซเลต TR36	56
รูปที่ 4.19 แสดงลักษณะของสโตรมา แอสโคสปอร์ เจริ้มสลิท แอฟพิคัล แอปพาราตัสของ <i>Xylaria</i> sp. ไอโซเลต TR42	57

รูปที่ 4.20 แสดงลักษณะของสโตรมา แอสโคสปอร์ เจริญสลิท แอฟพิคัล แอปพาราตัสของ <i>Xylaria sp.</i> ไอโซเลต TR45	58
รูปที่ 4.21 แสดงลักษณะของสโตรมา แอสโคสปอร์ เจริญสลิท แอฟพิคัล แอปพาราตัส ของ <i>Xylaria sp.</i> ไอโซเลต TR47	59
รูปที่ 4.22 แสดงลักษณะของสโตรมา แอสโคสปอร์ เจริญสลิท แอฟพิคัล แอปพาราตัสของ <i>Xylaria sp.</i> ไอโซเลต TR48	60
รูปที่ 4.23 แสดงลักษณะของสโตรมา แอสโคสปอร์ เจริญสลิท ของ <i>Xylaria sp.</i> ไอโซเลต TR49A	61
รูปที่ 4.24 แสดงลักษณะของสโตรมา แอสโคสปอร์ เจริญสลิท แอฟพิคัล แอปพาราตัส ของ <i>Xylaria sp.</i> ไอโซเลต TR51	62
รูปที่ 4 25 แสดงลักษณะของสโตรมา แอสโคสปอร์ เจริญสลิท แอฟพิคัล แอปพาราตัส ของ <i>Xylaria sp.</i> ไอโซเลต TR54H.....	63
รูปที่ 4.26 แสดงลักษณะของสโตรมา แอสโคสปอร์ เจริญสลิท แอฟพิคัล แอปพาราตัส ของ <i>Xylaria sp.</i> ไอโซเลต TR55	64
รูปที่ 4.27 แสดงลักษณะของ <i>Xylaria sp.</i> ไอโซเลต TR30 ในอาหารแข็งและอาหารเหลว MEB.....	74
รูปที่ 4.28 แสดงลักษณะสโตรมาและแอสโคสปอร์ของ <i>Xylaria sp.</i> ไอโซเลต TR30.....	83
รูปที่ 4.29 แสดงลักษณะเส้นใยของ <i>Xylaria sp.</i> ไอโซเลต TR30 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เมื่อเวลา ผ่านไป 30 วัน	84
รูปที่ 4.30 แสดงลักษณะเส้นใยของ <i>Xylaria sp.</i> ไอโซเลต TR30 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MEB เมื่ออายุ 30 วัน	84
รูปที่ 4.31 แสดงลักษณะของ <i>Xylaria sp.</i> ไอโซเลต TR30 เส้นใยที่อัดกันแน่นเพื่อเตรียมตัวเข้าสู่ ระยะ telomorph ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอไมโครสโคป	85
รูปที่ 4.32 แสดงลักษณะสาร TR30N2 และลักษณะโครงสร้างของ TR30N2.....	86

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 แสดงการจัดจำแนกสกุลของ Xylariaceae	5
ตารางที่ 3.1 แสดงลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส.....	36
ตารางที่ 3.2 แสดงส่วนประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส	37
ตารางที่ 3.3 แสดงเวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส.....	37
ตารางที่ 4.1 แสดงข้อมูลต่างๆของตัวอย่างสไตรมาที่เก็บจากสถานีวิจัยและฝึกอบรมวนเกษตร ตราด.....	65
ตารางที่ 4.2 แสดงน้ำหนักแห้งของส่วนสกัดหยาบที่สกัดจากน้ำหมักซึ่งสกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์และ สกัดจากเส้นใยด้วยเมทานอลของ <i>Xylaria</i> spp.....	75
ตารางที่ 4.3 แสดงประสิทธิภาพของส่วนสกัดหยาบที่สกัดจากน้ำเลี้ยง <i>Xylaria</i> spp. ในการยับยั้ง จุลินทรีย์ทดสอบ	77
ตารางที่ 4.4 แสดงประสิทธิภาพของส่วนสกัดหยาบที่สกัดจากเส้นใย <i>Xylaria</i> spp. ในการยับยั้ง จุลินทรีย์ทดสอบ	79
ตารางที่ 4.5 แสดงค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ (MIC) ของ ส่วนสกัดหยาบของ <i>Xylaria</i> จำนวน 9 ไอโซเลต.....	81
ตารางที่ 4.6 แสดงประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบของ <i>Xylaria</i> spp. จำนวน 10 ตัวอย่างในการ ยับยั้งเซลล์มะเร็งทดสอบ 4 ชนิดด้วยวิธี MTT.....	82
ตารางที่ 4.7 แสดงข้อมูลของสาร TR 30N2.....	87
ตารางที่ 4 8 แสดงอัตราส่วน ปริมาตรของตัวชะ การรวมลำดับส่วน และน้ำหนักแห้งของลำดับส่วน Xy1-Xy11 ที่แยกจากส่วนสกัดหยาบของ <i>Xylaria</i> sp. ไอโซเลต TR30.....	88
ตารางที่ 4.9 แสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ 5 ชนิดด้วยวิธี paper disc diffusion methods ของลำดับส่วน Xy1-Xy11 ที่แยกจากส่วนสกัดหยาบของ <i>Xylaria</i> sp. ไอโซเลต TR30.....	90

ตารางที่ 4.10 แสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ 5 ชนิดด้วยวิธี agar well diffusion methods ของลำดับส่วน Xy1-Xy11 เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่แยกจากส่วนสกัดหยาบของ <i>Xylaria</i> sp. ไอโซเลต TR30	91
ตารางที่ 4.11 แสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งปากมดลูก CaSki ของลำดับส่วน Xy1-Xy11 ที่แยกจากส่วนสกัดหยาบของ <i>Xylaria</i> sp. ไอโซเลต TR30	92



คำย่อ

%	=	Percentage
ATCC	=	American type culture collection, Maryland USA
DMSO	=	Dimethylsulfoxide
EDTA	=	Ethylenediamine tetraacetic acid
HEPES	=	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
¹ H NMR	=	Proton Nuclear Magnetic Resonance
ITS	=	Internal transcribed spacer
MEB	=	Malt extract broth
MHB	=	Mueller – Hinton broth
MTT	=	(3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenylterazolium bromide)
NA	=	Nutrient agar
NB	=	Nutrient broth
PBS	=	Phosphate buffer saline
PCR	=	Polymerase chain reaction
PDA	=	Potato dextrose agar
TLC	=	Thin layer chromatography

บทที่ 1

บทนำ

การศึกษาหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแหล่งธรรมชาตินับเป็นทางเลือกหนึ่งในการศึกษานอกเหนือไปจากการสังเคราะห์สารหรือการดัดแปลงโครงสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ในปัจจุบันการศึกษาเกี่ยวกับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมุ่งเน้นการศึกษาไปยังพืชสมุนไพรและจุลินทรีย์โดยเฉพาะจุลินทรีย์ที่เป็นรา ทั้งนี้เนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศในเขตร้อนชื้นทำให้มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง เราจัดเป็นจุลินทรีย์ประเภทหนึ่งที่น่าสนใจเนื่องจากมีรายงานว่าเราสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่น ทางด้านการแพทย์ อุตสาหกรรม และเกษตรกรรม (เลขา มาโนช, ออนไลน์) โดยรากลุ่มหนึ่งที่มีรายงานว่าสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและได้รับความนิยมนในการศึกษาคือราในวงศ์ Xylariaceae

Xylariaceae จัดอยู่ในไฟลัม Ascomycota เป็นรากลุ่มใหญ่ที่รู้จักอย่างกว้างขวางในประเทศเขตร้อนรวมทั้งประเทศไทย รากลุ่มนี้บางชนิดพบว่าเป็นราเอนโดไฟท์ (endophytes) ซึ่งไม่ก่อโรคให้กับพืชแต่มีรายงานส่วนน้อยที่พบว่าบางชนิดสามารถก่อให้เกิดโรคพืชได้ (Rogers, 2000; Whalley, 1996) Xylariaceae มีบทบาทสำคัญในระบบนิเวศ เนื่องจากทำหน้าที่เป็นผู้ย่อยสลาย โดยราดังกล่าวสามารถสร้างเอนไซม์ย่อยสลายเนื้อไม้ได้ นอกจากนี้ Xylariaceae ยังเป็นที่สนใจในแง่ของการเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพอีกด้วย (Mühlbauer และคณะ, 2002; Quang และคณะ, 2002; Stadler และคณะ, 2001; Stadler และคณะ, 2004; Whalley และ Edwards, 1995)

Hawksworth และ Rossman (1997) ได้ประเมินว่าในโลกนี้มีราประมาณ 1.5 ล้านชนิด แต่มีรายงานการค้นพบเพียง 150,000 ชนิดเท่านั้น ทั้งนี้มีราที่ยังไม่ถูกค้นพบอีกเป็นจำนวนมาก อีกทั้งประเทศไทยเป็นประเทศที่มีความอุดมสมบูรณ์ มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง และยังมีการค้นพบราชนิดใหม่ๆ อย่างต่อเนื่องรวมทั้งราในวงศ์ Xylariaceae โดยเฉพาะราในสกุล *Xylaria* ซึ่งเป็นกลุ่มที่

ใหญ่ที่สุดในวงศ์ Xylariaceae (สุรางค์ เขียรหิรัญ, 2545) และมีรายงานการศึกษาถึงสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมากที่สุด

ประเทศไทยตั้งอยู่ในพื้นที่เขตร้อนจึงมีความหลากหลายทางชีวภาพเป็นอย่างมาก สำหรับป่าในบริเวณภาคตะวันออกเฉียงของไทย เป็นอีกพื้นที่หนึ่งที่น่าสนใจในการเข้าไปศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของ *Xylaria* เนื่องจากมีการรายงานความหลากหลายของราในวงศ์นี้อยู่น้อย (Suwannasai, 2005; Thienhirun, 1997; Thienhirun และ Whalley, 2004) เช่น ป่าบริเวณสถานีวิจัยและฝักรอบรมวนเกษตรตราด ป่าบริเวณนี้เป็นป่าดิบแล้ง มีสภาพภูมิอากาศแบบร้อนชื้น มีปริมาณน้ำฝนค่อนข้างสูง คือมากกว่า 4,000 มิลลิเมตรต่อปี (อนุชา และ สคาร, 2554) ดังนั้นแนวโน้มในการค้นพบรา *Xylaria* ชนิดใหม่และ/หรือราที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ได้จึงมีความเป็นไปได้สูง

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อคัดเลือกรา *Xylaria* ที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค และ/หรือยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง
2. เพื่อจำแนกชนิดของรา *Xylaria* สายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ
3. เพื่อศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารที่รา *Xylaria* สายพันธุ์ที่สนใจผลิตได้

ขั้นตอนงานวิจัย

1. สืบค้นเก็บตัวอย่างรา *Xylaria* จากพื้นที่สถานีวิจัยและฝักรอบรมวนเกษตรตราด จังหวัดตราด
2. คัดแยก เพาะเลี้ยงและเก็บรักษาบริสุทธิ์ของ *Xylaria* spp.
3. คัดเลือก *Xylaria* spp. ที่มีความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ
4. จำแนกชนิดของ *Xylaria* sp. ที่คัดเลือกได้โดยวิธีทางอนุชีววิทยา

5. แยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *Xylaria* sp. ที่คัดเลือกได้ให้บริสุทธิ์และทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพรวมทั้งพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีของสารที่ผลิตได้
6. สรุปวิจารณ์ผลการทดลองและเรียบเรียงวิทยานิพนธ์

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัยนี้

พบ *Xylaria* sp. สายพันธุ์ใหม่ หรือ *Xylaria* sp. ที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคและ/หรือเซลล์มะเร็ง



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทที่ 2

เอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 รา Xylariaceae

ราในวงศ์ Xylariaceae จัดอยู่ในไฟลัม Ascomycota พบได้ทั่วไปในเขตอบอุ่นและเขตร้อนของโลก (Rogers, 2000; Whalley, 1996) โดยในปัจจุบันสามารถจำแนกได้เป็น 75 สกุลตาม Outline of the Ascomycota เล่มล่าสุด (Lumbsch และ Huhndorf, 2010) Xylariaceae มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายซากพืชเนื่องจากมีเอนไซม์ย่อยเซลลูโลสและลิกนิน ดังนั้นจึงพบได้บนต้นไม้หักโค่นหรือยืนต้นตาย ท่อนไม้ กิ่งไม้ ใบไม้ เมล็ด ผล มูลสัตว์และดิน (Whalley, 1996; สุรางค์เจียรนีย์, 2545) บางชนิดอาศัยอยู่กับจอมปลวก บางชนิดสามารถเจริญเป็นราเอนโดไฟท์อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชโดยไม่ก่อโรคให้กับพืชแต่มีรายงานส่วนน้อยพบว่าบางชนิดสามารถก่อให้เกิดโรคพืชได้เช่นกัน (Quang และคณะ, 2002; Stadler และคณะ, 2001; Stadler และคณะ, 2004; Whalley และ Edwards, 1995) สมาชิกส่วนใหญ่ของรากลุ่มนี้ถูกพบว่ามีโครงสร้าง สโตรมา (stroma) เพอริทีเซีย (perithecium) แอปพิคัล แอปพาราตัส (Apical apparatus) ซึ่งติดสีฟ้าเมื่อย้อมด้วย Melzers Iodine Reagent และมีแอสโคสปอร์ (ascospores) ชนิดเซลล์เดี่ยวสี่เหลี่ยมที่มีเจอร์มสลิต (germination slit) ด้วย (Ju และคณะ, 2012; Whalley, 1996) นักเห็ดราวิทยาได้เปรียบเทียบการจัดสกุลราในวงศ์ Xylariaceae ได้แสดงไว้ในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 แสดงการจัดจำแนกสกุลของ Xylariaceae



ตารางที่ 2.1 (ต่อ) แสดงการจัดจำแนกสกุลของ Xylariaceae

	Eriksson & Hawksworth (1993)	Laessde (1994)	Whalley (1996)	อื่นๆ
<i>Engleromyces</i> Henn.		<i>Engleromyces</i>	<i>Engleromyces</i>	<i>Emarcea</i> Duong, R. Jeewon & K.D. Hyde (2004)
<i>Entonaema</i> A. Moller		<i>Entonaema</i>	<i>Entonaema</i>	
<i>Fassia</i> Dennis		<i>Euepixylon</i> Füsting	? <i>Euepixylon</i>	
<i>Helicogermis</i> Lodha & D. Hawksw.		<i>Helicogermis</i> <i>lita</i>	<i>Helicogermis</i> <i>lita</i>	<i>Halorosellinia</i>
<i>Hypocopra</i> (Fr.) J. Kickx f.		<i>Holttumia</i> Lloyd	? <i>Holttumia</i>	
<i>Hyoxylon</i> Bull.		<i>Hypocopra</i>	<i>Hypocopra</i>	
<i>Induratia</i> Samuels, E. Miill. & Petrini (Suwannasai, 2005; Whalley, 1996)		<i>Hyoxylon</i>	<i>Hyoxylon</i>	
		<i>Induratia</i>	<i>Induratia</i>	

ตารางที่ 2.1 (ต่อ) แสดงการจัดจำแนกสกุลของ Xylariaceae



ตารางที่ 2.1 (ต่อ) แสดงการจัดจำแนกสกุลของ Xylariaceae



ตารางที่ 2.1 (ต่อ) แสดงการจัดจำแนกสกุลของ Xylariaceae

Eriksson and Hawksworth (1993)	Whalley (1996)	อื่นๆ
<i>Thamnomyces</i> Ehrenb.	<i>Thamnomyces</i>	
<i>Theissenia</i> Maubl.	<i>Theissenia</i>	
<i>Thuemenelia</i> Penz. & Sacc.	<i>Thuemenelia</i>	
<i>Ustulina</i> Tul. & C. Tul.		
<i>Versiomycetes</i> Whalley & Watling	<i>Versiomycetes</i>	
<i>Wawelia</i> Namysl.	<i>Wawelia</i>	<i>Whalleya</i> J.D. Rogers, Y.-M. Ju & San Martin (1997)
<i>Xylaria</i> Hill ex Schrank	<i>Xylaria</i>	

(Suwannasai, 2005; Whalley, 1996)

2.2 รา Xylariaceae ในประเทศไทย

ปัจจุบันพบ Xylariaceae ในประเทศไทย 26 สกุล ซึ่งรวมถึงจีนัส *Muscodor* Worapong, Strobel & W.H/ Hess (2001) ที่อยู่ในระยะสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดย 26 สกุลนี้คิดเป็น 1 ใน 3 ของจำนวนสกุลทั้งหมด (Whalley และคณะ, 2014) ดังนั้น Xylariaceae จึงควรได้รับการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อให้ทราบข้อมูลหรือพบราสกุลใหม่มากขึ้นในอนาคต

Xylariaceae จำนวน 26 สกุลที่ถูกรวบรวมในประเทศไทย ได้แก่ *Annulohypoxyton*, *Anthostomella*, *Astrocystis*, *Biscogniauxia*, *Camillea*, *Daldinia*, *Durotheca Emarcea*, *Entonaema*, *Fasciatispora*, *Halorosellinia*, *Hypoxyton*, *Jumillera*, *Kretzschmaria*, *Kretzschmariella*, *Muscodor*, *Nemania*, *Podosordaria*, *Poronia*, *Rhopalostroma*, *Rosellinia*, *Rostrohypoxyton*, *Sarcoxyton*, *Stilbohypoxyton*, *Whalleya* และ *Xylaria*.

2.3 ราสกุล *Xylaria*

ราสกุล *Xylaria* เป็นกลุ่มที่ใหญ่ที่สุดใน Xylariaceae มีความหลากหลายสูงซึ่งอาจมีมากถึง 600 สปีชีส์ ราสกุลนี้ยังพบมากในประเทศไทย บางชนิดพบได้ยากและยังไม่ถูกระบุชนิด (Ju และคณะ, 2012; Thienhirun และ Whalley, 2001; 2004)

2.4 ลักษณะโครงสร้างทางด้านสัณฐานวิทยาของ *Xylaria*

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Xylaria* ประกอบด้วย 2 ระยะ คือ ระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศเรียก teleomorph stage และระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศเรียก anamorph stage (Suwannasai, 2005; Thienhirun, 1997)

2.4.1 การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (Teleomorph)

ในระยะเวลาที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ *Xylaria* จะสร้างโครงสร้างต่างๆ เพื่อการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศดังนี้

สโตรมา (Stroma)

โครงสร้างของสโตรมาค่อนข้างแข็ง มีรูปร่างที่หลากหลายแตกต่างกันไป เช่น รูปร่างเป็นเส้น (filiform) รูปร่างกระบอง (clavate) หรือรูปทรงกลม (globoid) เป็นต้น ผิวของสโตรมามีทั้งผิวเรียบ (smooth) และผิวขรุขระ (roughened) สีของผิวสโตรมาเมื่อเจริญเต็มที่ส่วนใหญ่มีสีเข้มถึงสีดำ (Rogers, 1979; Suwannasai, 2005; Whalley, 1996)



รูปที่ 2.1 แสดงลักษณะของสโตรมาแบบต่างๆ ของ *Xylaria*

A. *Xylaria* sp. (PK 017) B. *X. cubensis* (PK 108) C. *X. magnoliae* var. *microspora* (PH 072) D. *X. allantoidea* (PK 088) Bars A–B, I–L = 1 cm; C, F–H = 5 mm; D–E = 2 mm. (Suwannasai และคณะ , 2012)

เพอริทีเซีย (Perithecia)

เพอริทีเซียอาจพบอยู่รวมกันหรือกระจัดกระจายใกล้กับบริเวณยอดจนไปถึงบริเวณก้าน อาจอยู่ในระดับเดียวกับผิวของสโตรมา อยู่บนสโตรมาหรือฝังอยู่ในสโตรมา ซึ่งเพอริทีเซียอาจมีการจัดเรียงตัวแบบชั้นเดียว (monostichous) หรือหลายชั้น (polystichous) (Rogers, 1979; Suwannasai, 2005) เพอริทีเซียอาจมีรูปร่างแตกต่างกันเช่น รูปร่างกลม (spherical) รี (ovoid) คล้ายรูปไข่ที่มีปลายที่ฐานแคบ (obovoid) หรือยาว (tubular) ลักษณะของเพอริทีเซียจะถูกนำมาพิจารณาร่วมกับลักษณะอื่นๆ เพื่อใช้ในการจัดจำแนกได้



รูปที่ 2.2 แสดงลักษณะเพอริทีเซียของ *Xylaria polymorpha*

(https://bioweb.uwlax.edu/bio203/f2012/meyer_doug/morphology.htm)

ออสติโอล (Ostiole)

ลักษณะออสติโอลของรา Xylariaceae มี 2 ลักษณะคือ umbilicate ostiole และ papillate ostiole แต่ลักษณะที่มักพบได้ในราสกุล *Xylaria* คือ papillate ostiole ซึ่งจะอยู่เหนือพื้นผิวของสโตรมาจึงทำให้เห็นเป็นหัวขนาดเล็ก



รูปที่ 2.3 แสดงลักษณะ papillate ostiole ของ *Xylaria melanura* (Lév.) Sacc.

(Rogers และคณะ, 1997).

แอสคัส (Ascus) และแอฟพิคัล แอพพาราตัส (Apical apparatus)

แอสคัส คือถุงห่อหุ้มแอสโคสปอร์ (ascospores) ในหนึ่งแอสคัสมักจะประกอบไปด้วย 8 แอสโคสปอร์ (Minter และ Webster, 1983) โดยทั่วไปแอสคัสจะมีผนัง 2 ชั้นแต่จะติดกันมากจนเห็นเป็นชั้นเดียว (unitunicate) แอสคัสมีลักษณะเป็นรูปทรงกระบอกหรือแท่งยาวมีทั้งแบบมีก้านชูแอสคัส (stipes) และแบบไม่มีก้าน อัตราส่วนระหว่างบริเวณที่สปอร์เกาะอยู่กับก้านชูแอสคัส อาจใช้เป็นข้อมูลในการจัดจำแนกกลุ่มของ Xylariaceae เช่นใน *Xylaria* มักจะมีก้านชูแอสคัสยาว มีแอฟพิคัล แอพพาราตัสด้านบน เมื่อทดสอบด้วย Melzer's reagent จะเกิดสีน้ำเงิน (Eriksson, 1966; Kohn และ Korf, 1975; Nannfeldt, 1976; Suwannasai, 2005)

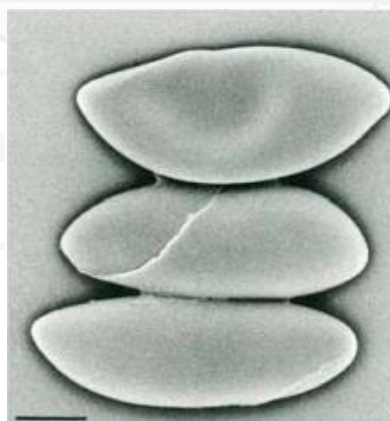


รูปที่ 2.4 แสดงลักษณะแอสคัสและแอฟพิคัล แอพพาราตัส (บริเวณหัวลูกศร) ของ *Xylaria aristata* (Suwannasai และคณะ, 2012)

แอสโคสปอร์ (Ascospores) และ เจริ้มสลิท (Germ slit)

ลักษณะของแอสโคสปอร์มีหลายลักษณะเช่น รูปทรงค่อนข้างกลม (subglobose) รูปทรงกระสวย (fusiform) รูปทรงรี (ellipsoid) รูปทรงคล้ายพระจันทร์เสี้ยว (broadly crescentric) อาจมีความป่องของสปอร์ทั้งสองด้านเท่ากัน (equilateral) ทั้งสองด้านมีความป่องเกือบเท่ากัน (slightly inequilateral) ทั้งสองด้านป่องเพียงด้านใดด้านหนึ่ง (inequilateral) ด้านปลายของสปอร์แคบ (narrowly round ends) หรือปลายสปอร์กว้าง (broadly ends) สีของแอสโคสปอร์ ได้แก่ สีน้ำตาลอ่อน สีน้ำตาล และสีน้ำตาลเข้ม (Rogers, 1979; Suwannasai และคณะ, 2012) โดยส่วนมากแล้ว *Xylaria* มักมีรูปทรงคล้ายพระจันทร์เสี้ยว

เจริญสลิท คือร่อง รอยแยก ซึ่งอยู่ภายในผนังเซลล์ของแอสโคสปอร์ ทำหน้าที่เป็นช่องในการงอกของแอสโคสปอร์และยังช่วยให้การดูดซึมน้ำและสารอาหารง่ายขึ้น ลักษณะสำคัญของเจริญสลิทที่ใช้ในการจัดจำแนก ได้แก่ ตำแหน่งของเจริญสลิทบนแอสโคสปอร์ ความยาวของเจริญสลิท รวมถึงรูปร่างของเจริญสลิท ซึ่งอาจจะเป็นเส้นตรง เส้นโค้ง เส้นเกลียว หรือ เป็นจุด เจริ้มสลิทของ *Xylaria* มักพบบริเวณด้านท้องหรือด้านเว้า (Suwannasai, 2005)



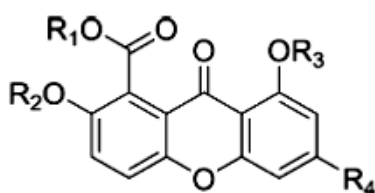
รูปที่ 2.5 แสดงลักษณะแอสโคสปอร์และเจริญสลิทของ *Xylaria longipes* เจริ้มสลิทเป็นเส้นเกลียว (Suwannasai และคณะ, 2012)

2.4.2 การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (Anamorph)

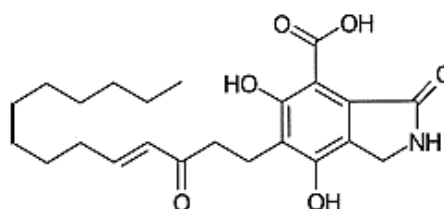
เมื่อเซลล์สืบพันธุ์ต่างๆ อยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ รา จะพัฒนาให้มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยสร้างเส้นใยบนพื้นผิวนอกของสโตรมาอ่อนหรือแก่ หรือสร้างเส้นใยภายในสโตรมา ระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของ *Xylaria* จะมีการสร้างเส้นใย ปกคลุมทั้งสโตรมาอ่อนหรือบางส่วนบนผิวสโตรมาอ่อน โดยโคนดิโอโพร (conidiophores) ถูกจัดอยู่ในบริเวณชั้นพาลิเสต (palisade layer) (Rogers, 1979) หรือ อาจมีการเจริญเป็นเส้นใยก่อนที่จะพัฒนาไปเป็นสโตรมาซึ่งการเจริญลักษณะนี้จะพบได้ใน *Xylaria* เช่น *X. cubensis* (Rogers, 1984; 1985) และ *X. poitei* (Lév.) Fr. (Rogers และ Callan, 1986)

2.5 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สร้างโดยรา *Xylaria*

Xylaria มีความสามารถในการผลิตสารทุติยภูมิหลายชนิด บางชนิดพบว่า มีฤทธิ์ทางชีวภาพ ในการต้านจุลินทรีย์ก่อโรค เชลล์มะเร็ง ไวรัส และมีฤทธิ์ในการต้านสารอนุมูลอิสระ (antioxidant) นอกจากนี้ *Xylaria* บางชนิดพบว่าสามารถผลิตสารชนิดใหม่ เช่น สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในกลุ่ม xanthenes (2-hydroxy-6-methyl-8-methoxy-9-oxo-9H-xanthenes-1-carboxylic acid และ 2-hydroxy-6-hydroxymethyl-8-methoxy-9-oxo-9H-xanthenes-1-carboxylic acid) ซึ่งผลิตจาก *Xylaria* sp. FRR5657 (Healy และคณะ, 2004) และสาร xyloketal H ซึ่งเป็นสารชนิดใหม่ ผลิตจาก *Xylaria* sp. No. 2508 (Yin และคณะ, 2008) xylactam, penochalasin B2 และ neoechinulin ซึ่งสกัดจาก *Xylaria euglossa* (Wang และคณะ, 2005)



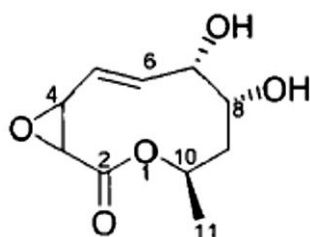
(1)



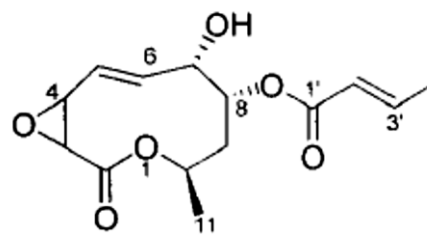
(2)

รูปที่ 2.6 แสดงโครงสร้างสาร (1) Xanthenes (Healy และคณะ, 2004) (2) xylactam (Wang และคณะ, 2005)

Multipholides A และ B ซึ่งถูกแยกจากน้ำเลี้ยง *Xylaria multiplex* BCC 1111 สารทั้งสองชนิดนี้สามารถยับยั้งเชื้อ *Candida albicans* มีค่า IC_{50} เท่ากับ 7 และ 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ตามลำดับ (Boonphong และคณะ, 2001)



Multipholides A

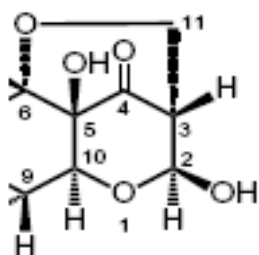


Multipholides B

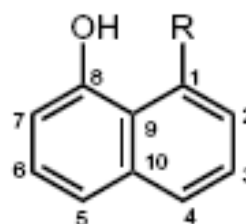
รูปที่ 2.7 แสดงโครงสร้างของ Multipholides A และ B (Boonphong และคณะ, 2001)

Xylaria mellisii (BCC 1005) ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิด mellisol และ 1,8-dihydroxynaphthol 1-O- α -glucopyranoside โดยสามารถในการยับยั้ง herpes simplex virus-type 1 ได้โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 10.50 และ 8.40 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ตามลำดับ (Pittayakhajonwut และคณะ, 2005)

R = α -glucose



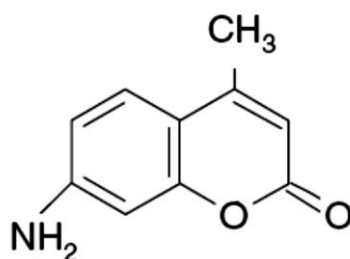
(1)



(2)

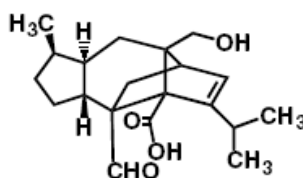
รูปที่ 2.8 แสดงโครงสร้างของ (1) mellisol และ (2) 1,8-dihydroxynaphthol1-O- α -glucopyranoside (Pittayakhajonwut และคณะ, 2005)

สารประกอบทางชีวภาพที่ผลิตจาก *Xylaria* sp.YX-28 ซึ่งผ่านการสกัดด้วย เมทานอล สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ และยังตรวจพบ 7-amino-4-methylcoumarin ซึ่งถูกแยกได้จาก *Xylaria* sp.YX-28 สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราได้อีกด้วย (Liu และคณะ, 2008)



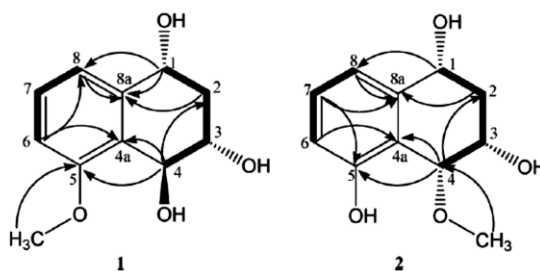
รูปที่ 2.9 แสดงโครงสร้างของ 7-amino-4-methylcoumarin (Liu และคณะ, 2008)

Xylaria sp. PSU-D14 สามารถสร้างสาร sordaricin ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *Candida albicans* ATCC90028 โดยมีค่า MIC ในการยับยั้งเท่ากับ 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Pongcharoen และคณะ, 2008)



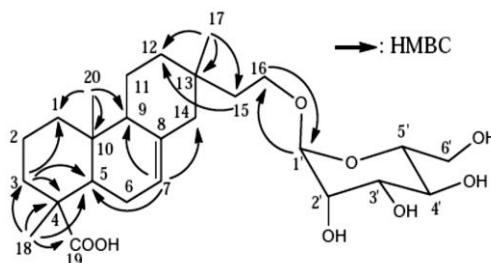
รูปที่ 2.10 แสดงโครงสร้าง sordaricin (Pongcharoen และคณะ, 2008)

Xylariol A และ B ที่แยกได้จาก *Xylaria hypoxylon* AT-028 สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งตับ Hep G2 cells โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 22.3 และ 21.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (Gu และ Ding, 2008)



รูปที่ 2.11 แสดงโครงสร้าง 1 Xylariol A และ 2 Xylariol B (Gu และ Ding, 2008)

Xylaria polymorpha สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้แก่ สาร 16-a-D-mannopyranosyloxyisopimar-7-en-19-oic acid, 15-hydroxy-16-a-D-mannopyranosyloxyisopimar-7-en-19-oic acid และ 16-a-D-glucopyranosyloxyisopimar-7-en-19-oic acid ที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมี IC_{50} ในช่วง 71 ถึง 607 ไมโครโมลาร์ (Shiono และคณะ, 2009)



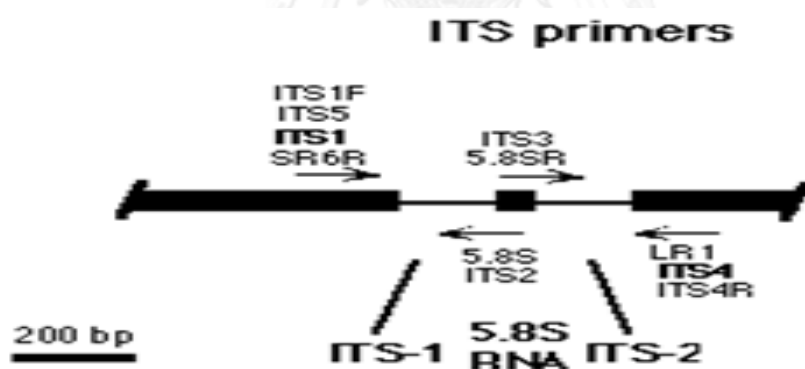
รูปที่ 2.12 แสดงโครงสร้าง 16-a-D-mannopyranosyloxyisopimar-7-en-19-oic acid (Shiono และคณะ, 2009)

2.6 การจำแนกกลุ่มราโดยเทคนิคทางอณูชีววิทยา

การจัดจำแนกรากรา *Xylaria* จะอาศัยโครงสร้างต่างๆ เช่น สโตรมา เพอริทีเซีย แอปพิคัล แอปพาราตัส แอสโคสปอร์ และเจอร์มสลิท ของราชนิดนั้นๆ แต่อย่างไรก็ตามยังมีราหลายชนิดที่ไม่อาจจัดจำแนกลักษณะโครงสร้างต่างๆ ดังกล่าวได้ เช่นกลุ่มราเอนโดไฟท์ ซึ่งอาจไม่พบระยะสืบพันธุ์แบบ

อาศัยเพศ เป็นต้น ดังนั้นในช่วงหลายปีที่ผ่านมาจึงได้นำเทคนิคทางอณูชีววิทยามาใช้ในการกำหนดทั้งชนิดและสกุล และนำมาใช้บ่อยๆ ในการอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างสกุลที่แน่นอน (Stadler และคณะ, 2001; Hsieh และคณะ, 2005) โดยบริเวณที่นำไปใช้ในการวิเคราะห์ความแตกต่างของราแต่ละชนิด เช่น บริเวณ Internal transcribed spacer (ITS) และบางส่วนของยีน alpha-actin และ beta-tubulin (Hsieh และคณะ, 2010)

ITS ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ITS1 ซึ่งเป็นบริเวณที่อยู่ระหว่าง 18S กับ 5.8S rRNA gene และ ITS2 อยู่ระหว่าง 5.8S กับ 28S rRNA gene บริเวณที่ได้รับการนิยามอย่างสูงในการศึกษาหาความแตกต่างในระดับชนิดของราเนื่องจากมีข้อดีหลายประการ คือ เป็นบริเวณที่มีลำดับเบสที่มีความผันแปรสูง และมีขนาดไม่ใหญ่มากเกินไปประมาณ 500-800 คู่เบส ทำให้ง่ายต่อการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ตำแหน่งนี้ด้วย นอกจากนี้ยังเป็นบริเวณที่จำนวนซ้ำมาก ทำให้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ง่าย (White และคณะ, 1990)



รูปที่ 2.13 แสดงตำแหน่ง primer มาจับที่บริเวณ Internal transcribed spacer (ITS) region (<http://biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm>)

2.7 สถานีวิจัยและฝึกอบรมวนเกษตรตราด

จังหวัดตราด มีสภาพภูมิอากาศแบบร้อนชื้น มีช่วงฤดูกาล 3 ฤดู มีช่วงความแห้งแล้งที่ยาวนานกว่า 4 เดือน แต่มีปริมาณน้ำฝนค่อนข้างสูง คือมากกว่า 4,000 มิลลิเมตรต่อปี สังคมพืชถาวรที่ควรเป็นตามสภาพภูมิอากาศจึงควรเป็นป่าดิบแล้ง (อนุชา และ สคาร, 2554) ซึ่งป่าในลักษณะ

นี้เป็นพื้นที่ที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของราในสกุล Xylaria (Thienhirun, 1997) แต่อย่างไรก็ตามยังแทบไม่มีข้อมูลการวิจัยเกี่ยวกับรากลุ่มนี้ในพื้นที่ดังกล่าว จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะศึกษาเกี่ยวกับรากลุ่มนี้ รวมทั้งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่รากลุ่มนี้สามารถผลิตได้ด้วย

สถานีวิจัยและฝึกอบรมวนเกษตรตราด เดิมชื่อ สถานีวิจัยวนเกษตรตราด ตั้งอยู่ในพื้นที่ป่าสงวนแห่งชาติท่ากุ่ม – ห้วยแร้ง ซึ่งเดิมเป็นสวนป่าที่ปลูกขึ้นตามเงื่อนไขสัมปทานการทำไม้ของบริษัทตราดทำไม้ จำกัด ต่อมาในปี พ.ศ. 2532 รัฐบาลได้มีนโยบายยกเลิกการให้สัมปทานป่าไม้ทั่วประเทศทางบริษัท ฯ ซึ่งมีความประสงค์ที่จะให้พื้นที่แห่งนี้ได้รับการพัฒนาเพื่อประโยชน์ต่อสาธารณชนมากขึ้นจึงได้ทำหนังสือถึงมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ขอให้สำรวจพื้นที่แห่งนี้จัดตั้งเป็นสถานีวิจัยก่อนที่พื้นที่จะถูกโอนให้มาอยู่ในความดูแลขององค์การอุตสาหกรรมป่าไม้ (ออป.) เมื่อมหาวิทยาลัย ฯ ได้ทำการสำรวจพื้นที่แล้ว จึงเห็นสมควรบรรจุโครงการจัดตั้งสถานีวิจัยวนเกษตรตราดไว้ในแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติฉบับที่ 7 (2535 – 2539) ซึ่งได้รับอนุมัติจากทบวงมหาวิทยาลัย ฯ ต่อมาเมื่อเริ่มแผน ฯ 7 จึงได้ดำเนินการขออนุญาตใช้พื้นที่จาก ออป. และกรมป่าไม้ตามขั้นตอนต่าง ๆ จนกระทั่งวันที่ 14 กุมภาพันธ์ 2537 จึงได้รับอนุมัติจากกระทรวงเกษตรและสหกรณ์โดยกรมป่าไม้ให้ใช้ประโยชน์พื้นที่แห่งนี้จำนวน 703 ไร่ เพื่อจัดตั้งเป็นสถานีวิจัยวนเกษตรตราดตั้งแต่นั้นมา ต่อมาในปี 2542 กรมชลประทานได้สร้างอ่างเก็บน้ำและขอใช้พื้นที่ ฯ เพื่อกิจการดังกล่าวจำนวนเนื้อที่ 109 ไร่ และในปี 2543 ได้ผนวกพื้นที่ของประชาชนที่มอบให้มหาวิทยาลัย ฯ ใช้ประโยชน์ เนื้อที่ 17 ไร่ 2 งาน ปัจจุบันสถานีฯ มีพื้นที่รวมจำนวน 611 ไร่ 2 งาน ต่อมาในปี พ.ศ. 2552 ได้มีการปรับโครงสร้างของหน่วยงาน ดังนั้นเพื่อเป็นการแสดงให้เห็นถึงวิสัยทัศน์และภารกิจหลักมากขึ้น จึงได้มีการปรับเปลี่ยนชื่อจากสถานีวิจัยวนเกษตรตราด เป็น “สถานีวิจัยและฝึกอบรมวนเกษตรตราด” (สถานีวิจัยและฝึกอบรมวนเกษตรตราด, ออนไลน์) (http://www2.rdi.ku.ac.th/trad/?page_id=2)

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์

1. ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (incubator) Memmert รุ่น BE600 บริษัท Jebsen and Jessen
2. ตู้ควบคุมอุณหภูมิภายใต้บรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂ incubator) Hepa Class100 รุ่น 311 บริษัท Thermo electron corporation
3. ตู้ถ่ายเชื้อ (laminar flow) CLEAN รุ่น H1 บริษัท Lab Service Ltd, Part.
4. หม้อนึ่งความดัน (autoclave) TOMY รุ่น SS-325 บริษัท Tomy Seiko Co., Ltd. Tokyo, Japan
5. ตู้อบความร้อนแห้ง (hot air oven) Memmert รุ่น UE600 บริษัท Jebsen and Jessen
6. เครื่องชั่งน้ำหนัก (digital scale) รุ่น PB3002 บริษัท Mettler Toledo
7. กล้องจุลทรรศน์ (microscope) Olympus รุ่น BX51 บริษัท Olympus Optical Co., Ltd. Japan
8. กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ (inverted microscope) Olympus รุ่น CK2 บริษัท Olympus Optical Co., Ltd. Japan
9. เครื่องเขย่า (shaker) New Brunswick Scientific บริษัท New Brunswick Scientific Co., Inc. Edison, USA
10. เครื่องระเหยแห้งสูญญากาศแบบหมุน (rotary vacuum evaporator) Eyela รุ่น N-1000 บริษัท Tokyo Rikakikai Co., Ltd. Japan
11. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) Hettich รุ่น Rotofix 32 บริษัท Becthai, Germany
12. เครื่องวัดค่าความเป็นกรดเบส (pH meter) รุ่น S20-K ยี่ห้อ Mettler Toledo
13. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น WB-710M บริษัท Optima, Japan

14. ฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemocytometer) ขนาด 0.0025 mm^2 ยี่ห้อ Loptik Labor
15. เครื่องอ่านค่าความดูดกลืนแสง (microplate reader) รุ่น ELX800 บริษัท Bio-Tek Instruments, Inc.
16. เครื่อง DNA Thermal cycler บริษัท Hangzhou Bioer Technology. China
17. เครื่อง Electrophoresis apparatus บริษัท Hangzhou Bioer Technology. China
18. เครื่องถ่ายภาพรูปลง (UV-transilluminator) บริษัท Vilber Lourmat . Germany
19. เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (micro centrifuge) รุ่น CM-610T บริษัท Hslangtai
20. เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (micro refrigerated centrifuge) Kubota รุ่น 3700 บริษัท Kubota Corporation, Tokyo Japan
21. เครื่องไมโครเวฟ (microwave oven) Turbora รุ่น MW-2020
22. ตู้เย็น $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (refrigerator) Mitsubishi รุ่น Tiara บริษัท Mitsubishi electric
23. ตู้เย็น $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ยี่ห้อ Sharp
24. ตู้เย็น $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ รุ่น 8620 บริษัท Thermo Electron Corporation
25. เครื่อง Vortex mixer รุ่น VX-100 บริษัท Labnet International, Inc.
26. โกร่งบดยา (motar)
27. ไมโครปิเปตต์ (automatic adjustable micropipette) บริษัท Gilson P2 (0.1-2 ไมโครลิตร), P10 (0.5-10 ไมโครลิตร), P20 (5-20 ไมโครลิตร), P200 (20-200 ไมโครลิตร), P1000 (0.1- 1 มิลลิลิตร)
28. ปิเปตต์ทิวป์ (pipette tip) บริษัท Axygen Scientific, Inc. USA
29. หลอดไมโครเซนตริฟิวส์ (micro centrifuge tubes) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร บริษัท Axygen Scientific, Inc. USA
30. หลอดพีซีอาร์ (PCR tubes) ขนาด 200 ไมโครลิตร บริษัท Axygen Scientific, Inc. USA
31. พาราฟิล์ม
32. ขวดรูปชมพู่ (flask)

33. ปีกเกอร์ (beaker)
34. ขวดแก้ว (bottle)
35. กระบอกตวง (cylinder)
36. ลูป (loop)
37. เข็มเย็บผ้า (needle)
38. ที่เจาะอาหารวุ้น (cork borer)
39. จานเลี้ยงเชื้อพลาสติก (petridish) ปราศจากเชื้อ ยี่ห้อ greiner bio-one
40. จานเลี้ยงเซลล์แบบ 96 หลุม (96 wells plate) ปราศจากเชื้อ ยี่ห้อ costar
41. ขวดเลี้ยงเซลล์ ยี่ห้อ Corning บริษัท Corning Incorporated, USA
42. หลอดเก็บเซลล์
43. หลอดเซนต์ปีวีสขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร ยี่ห้อ Corning บริษัท Corning Incorporated, USA
44. ปิเปตต์แก้ว ขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร
45. เครื่องดูดจากปิเปตต์ (pipette aid) ยี่ห้อ Drummond
46. หัวกรองอาหารเลี้ยงเซลล์ ขนาด 0.22 ไมโครเมตร ยี่ห้อ Corning บริษัท Corning Incorporated, USA
47. เครื่องกวนโดยใช้แม่เหล็ก (magnetic stirrer) ยี่ห้อ Clifton Ceraplate
48. TLC aluminium sheet รุ่น Silica gel60 F₂₅₄ บริษัท Merck, Germany
49. คอลัมน์แก้วสำหรับแยกสาร
50. ขวดแก้วก้นกลม
51. ขวดแก้วสำหรับเก็บสาร
52. เครื่อง Nuclear Magnetic Resonance (NMR) รุ่น Varian Mercury 400
53. เครื่อง Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT- IR) รุ่น 410 บริษัท Nicolet Impact model

54. เครื่อง Fison Instruments Mass Spectrometer model Trio 2000 บริษัท Frisons Instruments, England

3.2 สารเคมี

1. Agar
2. Glucose บริษัท Ajax Finechem Pty. Ltd.
3. Peptone บริษัท Dickinson and Company
4. Beef extract บริษัท Dickinson and Company
5. Malt extract บริษัท HiMedia Laboratories Pvt. Ltd.
6. Mueller-Hinton starch บริษัท Dickinson and Company
7. DMSO (Dimethylsulfoxide) steried บริษัท Sigma, USA
8. Fetal Bovine Serum (FBS) ยี่ห้อ Hyclone บริษัท PERBIO
9. MTT (3-(4,5-dimethylthiazolyl-2-) 2,5- diphenylterazolium bromide) บริษัท Sigma, USA.
10. RPMI ยี่ห้อ Hyclone บริษัท PERBIO
11. Typhan blue ยี่ห้อ Hyclone บริษัท PERBIO
12. Trypsin-EDTA steried filtered ยี่ห้อ Hyclone บริษัท PERBIO
13. HEPES ยี่ห้อ Hyclone บริษัท PERBIO
14. Sodium pyruvate ยี่ห้อ Hyclone บริษัท PERBIO
15. Streptomycin บริษัท M & H Manvfactuging co., LTD
16. Penicillin บริษัท M & H Manvfactuging co., LTD
17. Nystatin บริษัท M & H Manvfactuging co., LTD
18. Potassium hydrogen phosphate (KH_2PO_4) บริษัท E. Merck, Germany

19. Sodium chloride (NaCl) บริษัท E. Merck, Germany
20. Barium chloride ($BaCl_2$) บริษัท E. Merck, Germany
21. Sulfuric acid (H_2SO_4) บริษัท E. Merck, Germany
22. Potassium chloride (KCl) บริษัท E. Merck, Germany
23. Disodium hydrogenphosphate (Na_2HPO_4) บริษัท E. Merck, Germany
24. Hydrochloride (HCl) บริษัท LAB - SCAN
25. Isopropanol บริษัท LAB - SCAN
26. Vanillin
27. ตัวทำละลาย ได้แก่ hexane, ethyl acetate, chloroform, methanol และ ethanol
บริษัท Mallinckrodt Bakre, Inc.
28. Silica 60 (No 9385) ขนาดอนุภาค 0.040 – 0.063 mm (230 – 400 ASTM) บริษัท E.
Merck, Germany
29. 2-Mercaptoethanol บริษัท Sigma
30. Taq DNA polymerase บริษัท Fermentas
31. Primers ได้แก่ ITS5 และ ITS4
32. Agarose molecular biology grade บริษัท ISC Bio Express
33. วาสลิน

3.3 เก็บตัวอย่าง แยกเชื้อ และเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์

เก็บตัวอย่างสโตรมาของ *Xylaria* spp. จากบริเวณสถานีวิจัยและฝึกอบรมวนเกษตรตราด ต.ท่ากุ่ม อ.เมือง จ.ตราด ในเดือนกรกฎาคม ปี 2553 ทำการศึกษาลักษณะของสโตรมา เช่น วัดขนาด สังเกตสี ลักษณะออสติโอล และ เพอริทิเซีย จากนั้นแยกเชื้อโดยใช้เทคนิค spore shooting ทำได้โดยการตัดส่วนผิวของสโตรมา มาติดบนฝาจานเพาะเลี้ยงเชื้อ โดยหันด้านออสติโอล เข้าหาอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) ที่เติม 0.5% Streptomycin จากนั้นปิดฝาแล้วตั้งทิ้งไว้ เพื่อให้สปอร์ตกลงไปเจริญบนอาหารด้านล่าง ส่วนตัวอย่างที่ไม่สามารถแยกได้ด้วยวิธี spore shooting ได้นำมาแยกโดยใช้ใบมีดผ่าตัดที่ปราศจากเชื้อตัดผิวของสโตรมา ออกแล้วใช้เข็มเย็บที่ปราศจากเชื้อ เขี่ยสปอร์ภายในเพอริทิเซียภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอไมโครสโคป (stereomicroscope) มาวางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 5-7 วัน หรือจนพบการเจริญของเส้นใยจึงทำการ subculture เพื่อให้งอกและได้เชื้อบริสุทธิ์ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากนั้นเก็บรักษาบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA slant (Thienhirun, 1997)

3.4 การเลี้ยง *Xylaria* spp. ในอาหารเหลวและการสกัด

3.4.1 การเตรียมหัวเชื้อ *Xylaria* spp. เพื่อเลี้ยงในอาหารเหลว

นำ *Xylaria* spp. ที่แยกได้มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสให้มีอายุประมาณ 10 - 15 วันขึ้นอยู่กับอัตราการเจริญของราแต่ละชนิด

3.4.2 การเลี้ยง *Xylaria* spp. ในอาหารเหลว

ใช้ที่เจาะอาหารวุ้น (cork borer) ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 8 มิลลิเมตร เจาะเส้นใยราที่เจริญอยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA นำไปเลี้ยงในอาหารเหลว Malt Extract Broth (MEB) 2% ที่มีน้ำตาล Glucose 2% ปริมาตร 100 มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตรบ่มที่

อุณหภูมิห้องภายใต้สภาวะอยู่กับที่ (static) เป็นระยะเวลา 30 วัน (Healy และคณะ, 2004) แล้วจึงนำมากรองด้วยผ้าขาวบางที่ผ่านการฆ่าเชื้อ เพื่อแยกเส้นใยออกจากน้ำเลี้ยงเชื้อ

3.4.3 สกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากน้ำเลี้ยง *Xylaria* spp.

นำส่วนของน้ำเลี้ยงรามาสกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ (Pittayakhajonwut และคณะ, 2005) และสกัดส่วนของเส้นใยด้วยเมทานอล (Shiono และคณะ, 2009) จากนั้นนำไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหย (rotary evaporator) ส่วนสกัดหยาบ (crude) ที่ได้จะเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3.5 การทดสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของ *Xylaria* spp.

3.5.1 ทดสอบความสามารถของส่วนสกัดหยาบในการยับยั้งจุลินทรีย์

3.5.1.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ

จุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบมี 5 สายพันธุ์ โดยแบ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bacillus subtilis* ATCC6633 และ *Staphylococcus aureus* ATCC6538-P แบคทีเรียแกรมลบ 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Escherichia coli* ATCC8739 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027 และยีสต์ ได้แก่ *Candida albicans* ATCC 10231

3.5.1.2 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ

การเตรียมเชื้อแบคทีเรียทดสอบ

นำแบคทีเรียทดสอบชนิด (steak) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Mueller – Hinton agar (MHA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อแยกให้ได้โคโลนีเดี่ยว ใช้ลูปเชียวโคโลนีเดี่ยว ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Mueller – Hinton broth (MHB) 5 มิลลิลิตร บ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อพร้อมเขย่า (shaker incubator) ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรับความขุ่นของแบคทีเรียทดสอบโดยใช้อาหาร

เลี้ยงเชื้อเหลว MHB ให้มีความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland Standard ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร ให้อยู่ในช่วง 0.08 – 0.10

การเตรียมเชื้อยีสต์ทดสอบ

นำยีสต์ทดสอบชนิดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Potato dextrose agar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อแยกให้ได้โคโลนีเดี่ยว ใช้ลูป เชี่ยวโคโลนีเดี่ยวลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Potato dextrose broth (PDB) 5 มิลลิลิตร บ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อพร้อมเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรับความขุ่นของยีสต์ทดสอบโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว PDB ให้มีความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland Standard ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร ให้อยู่ในช่วง 0.08 – 0.10

3.5.1.3 การเตรียมส่วนสกัดหยาบเพื่อใช้ในการทดสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

นำส่วนสกัดหยาบที่ได้จากขั้นตอน 3.4.3 มาละลายด้วย DMSO 100% ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 32 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

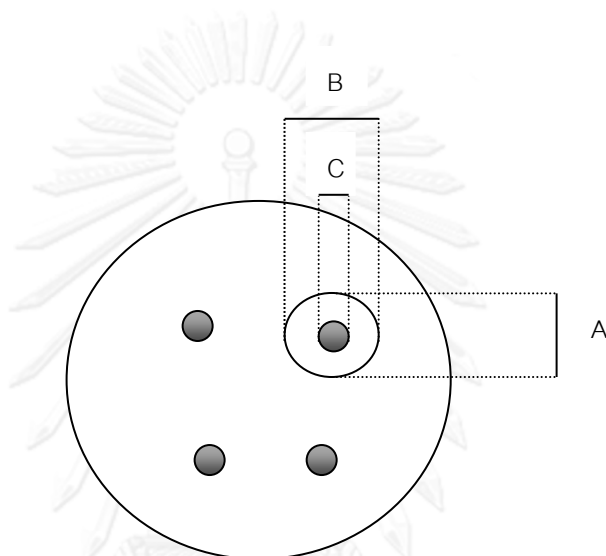
3.5.1.4 โดยวิธี *paper disc diffusion methods (Boyanova และคณะ, 2005)*

นำแบคทีเรียทดสอบที่เตรียมไว้จากข้อ 3.5.1.2 มาป้ายกระจาย (spread) บนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA (สำหรับแบคทีเรียทดสอบ) โดยใช้ไม้พันสำลีปราศจากเชื้อจุ่มลงในหลอดเชื้อแบคทีเรียทดสอบที่เตรียมไว้ในข้อ 3.5.1.2 ป้ายลงบนผิวหน้าอาหาร จากนั้นหยดส่วนสกัดหยาบที่เตรียมไว้จากข้อ 3.5.1.3 ลงบนแผ่น paper disc ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ด้วยปริมาตร 10 ไมโครลิตร แล้ววางลงบนเชื้อแบคทีเรียทดสอบ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง วัดความกว้างของบริเวณวงใสที่เกิดขึ้น (clear zone)

สำหรับเชื้อยีสต์ที่เตรียมไว้จาก 3.5.1.2 นำมาป้ายลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA จากนั้นหยดส่วนสกัดหยาบที่เตรียมไว้จากข้อ 3.5.1.3 ลงบนแผ่น paper disc ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตรแล้ววางลงบนเชื้อยีสต์ทดสอบ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18 ชั่วโมง วัดความกว้างของบริเวณวงใสที่เกิดขึ้น

โดยตัวควบคุมที่ให้ผลบวกของแบคทีเรีย ได้แก่ streptomycin ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับยีสต์คือ nystatin ความเข้มข้น 100 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตัวควบคุมที่ให้ผลลบคือตัวทำละลาย DMSO 100% ที่ไม่มีสารสกัดละลายอยู่

$$\text{ขนาดบริเวณวงใส} = [(A+B)/2] - C$$



A = ความยาวของบริเวณวงใส (มิลลิเมตร)

B = ความยาวของบริเวณวงใสที่ตั้งฉากกับ A (มิลลิเมตร)

C = เส้นผ่านศูนย์กลางของ paper disc หรือรูที่ถูกเจาะด้วย cork borer (มิลลิเมตร)

3.5.1.5 โดยวิธี Minimal inhibitory concentration (MIC)

ทดสอบ MIC ตามวิธีของ (Mazzola และคณะ, 2009) โดยเตรียมส่วนสกัดหยาบให้มีความเข้มข้นในช่วง 0.5 – 256 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรจากนั้นทำการทดสอบในงานเลี้ยงเซลล์แบบ 96 หลุม (microtiter plate 96 wells plate) กับเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 5 สายพันธุ์ข้างต้น โดยเตรียมเชื้อให้มีปริมาณ 10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร ป่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสสำหรับแบคทีเรียและ 30 องศาเซลเซียสสำหรับยีสต์ตามลำดับเป็นเวลา 18 ชั่วโมง ตรวจวัดการเจริญของ

จุลินทรีย์ด้วยตา โดยค่า MIC คือค่าความเข้มข้นของส่วนสกัดหยาบที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้

3.5.2 ทดสอบความสามารถของส่วนสกัดหยาบในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง

3.5.2.1 เซลล์มะเร็งที่ใช้ในการทดสอบ

เซลล์มะเร็งปากมดลูก CaSki (Human papilloma virus positive cervical cancer cell line), SiHa (Human papillomavirus type 16 (HPV16) positive cervical cancer cells) เซลล์มะเร็งผิวหนัง A375 (Human malignant melanoma) และเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว Jurkat (Human acute T-cell leukemia) โดยได้รับการอนุเคราะห์จาก รศ.ดร. ธนาภัทร ปาลกะ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.5.2.2 การเตรียมเซลล์มะเร็งทดสอบ

นำเซลล์มะเร็งทดสอบที่เก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลวมาทำการเพาะเลี้ยงโดยแช่หลอดเก็บเซลล์ในอ่างน้ำอุ่น 37 องศาเซลเซียสทันที เมื่อละลายนำเซลล์ทดสอบมาใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่ปราศจากซีรัม 9 มิลลิลิตร จากนั้นปั่นเซลล์ให้ตกตะกอนด้วยความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง ดัดให้เซลล์กระจายตัวแล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 complete medium ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นดูดสารละลายเซลล์ใส่ขวดเลี้ยงเซลล์ (T flask) ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 complete medium ปริมาตร 6 มิลลิลิตร ตรวจสอบสัณฐานวิทยาของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% จนกว่าเซลล์จะเจริญเต็มผิวขวดเลี้ยงเซลล์

การเปลี่ยนถ่ายอาหารเลี้ยงเซลล์ของเซลล์มะเร็งชนิดเกาะ

เซลล์มะเร็งชนิดเกาะได้แก่ เซลล์มะเร็งปากมดลูก CaSki, SiHa และเซลล์มะเร็งผิวหนัง A375 การเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับเซลล์มะเร็งชนิดเกาะ ทำโดยการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออกจนหมด ล้างเซลล์ด้วยสารละลาย 1x PBS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วดูดออก จากนั้นเติม 0.25% trypsin- EDTA ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้เซลล์หลุดออกจากขวด

เลี้ยงเซลล์ จากนั้นใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 complete medium ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงไป เพื่อหยุดปฏิกิริยาการย่อยเซลล์ของ 0.25% trypsin - EDTA จากนั้นดูดเซลล์ทั้งหมดใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์ ปั่นเซลล์ให้ตกตะกอน ด้วยความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง ใช้วิธีดีดหลอดเซนตริฟิวจ์เบาๆ เพื่อให้เซลล์กระจายตัวแล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 complete medium ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นดูดสารละลายเซลล์ใส่ขวดเลี้ยงเซลล์ ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 complete medium ปริมาตร 6 มิลลิลิตร ตรวจสอบสัดส่วน วิทยาของเซลล์ นำไปป่มที่อุณหภูมิตั้งที่ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5%

การเปลี่ยนถ่ายอาหารเลี้ยงเซลล์ของเซลล์มะเร็งชนิดแวนลอย

เซลล์มะเร็งชนิดแวนลอยได้แก่ เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว Jurkat การเปลี่ยนถ่ายอาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับเซลล์มะเร็งชนิดแวนลอย ทำโดยการใช้ปิเปตต์ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ขึ้นลงเบาๆ 2-3 ครั้ง เพื่อให้เซลล์ที่รวมตัวกันอยู่เป็นก้อนกระจายเป็นเซลล์เดี่ยวๆ จากนั้นดูดเซลล์ทั้งหมดใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์ ปั่นเซลล์ให้ตกตะกอน ด้วยความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง ใช้วิธีดีดหลอดเซนตริฟิวจ์เบาๆ เพื่อให้เซลล์กระจายตัวแล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 complete medium ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นดูดสารละลายใส่ขวดเลี้ยงเซลล์ ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 complete medium ปริมาตร 6 มิลลิลิตร ตรวจสอบคุณสมบัติของเซลล์ นำไปป่มที่อุณหภูมิตั้งที่ 37 องศาเซลเซียสภายใต้บรรยากาศที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5%

การเก็บรักษาเซลล์เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิตั้งที่ -80 องศาเซลเซียส

ทำเช่นเดียวกับวิธีการเปลี่ยนถ่ายอาหารเลี้ยงเซลล์ ซึ่งหลังจากการปั่นเหวี่ยงและเทอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้งแล้วใช้วิธีดีดหลอดเซนตริฟิวจ์เบาๆ เพื่อให้เซลล์กระจายตัว เติมหาอาหารสำหรับเก็บเซลล์แช่แข็ง (freezing medium) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ดูดขึ้นลงเบาๆ แล้วดูดใส่หลอดเก็บเซลล์แช่แข็ง (cryotube) ที่อุณหภูมิตั้งที่ -80 องศาเซลเซียส

การนับเซลล์มะเร็งทดสอบที่มีชีวิตโดยย้อมด้วยสี trypan blue

ย้อมเซลล์มะเร็งทดสอบด้วยสี trypan blue นับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตต่อมิลลิลิตร เพื่อใช้คำนวณปริมาณเซลล์ที่ใช้เลี้ยงต่อหลุม โดยดูดสารละลายเซลล์มาเจือจางด้วยสีย้อมอัตราส่วน 1:1 จากนั้นดูมา 10 ไมโครลิตรเพื่อนับเซลล์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemocytometer) โดยคำนวณตามสมการดังนี้

$$\text{จำนวนเซลล์ที่นับได้ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมดที่นับได้} \times 10^4 \times 2^n}{4}$$

n = จำนวนการเจือจาง (dilution)

3.5.2.3 การเตรียมส่วนสกัดหยาบเพื่อใช้ในการทดสอบการยับยั้งเซลล์มะเร็ง

เตรียมส่วนสกัดหยาบจากข้อ 3.4.2 ให้มีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรใน DMSO ดูดส่วนสกัดหยาบนั้นเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 complete medium โดยให้ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.5.2.4 ทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งโดยวิธี 3 - (4, 5 - dimethylthiazol - 2 - yl) -2, 5 - diphenyltetrazolium bromide colorimetric assay (MTT) (Palaga และคณะ, 1996)

เลี้ยงเซลล์มะเร็งทดสอบในงานเลี้ยงเซลล์แบบ 96 หลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร โดยให้มีจำนวนเซลล์ 10^4 เซลล์ต่อหลุมโดยนับเซลล์มะเร็งทดสอบด้วยการย้อมสี trypan blue บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสภายใต้บรรยากาศที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับเซลล์มะเร็งชนิดเกาะผิว ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกให้หมดแล้วเติมส่วนสกัดหยาบที่เตรียมไว้ในข้อ 3.5.2.3 ลงในหลุมเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 100 ไมโครลิตร โดยใช้ DMSO 1% เป็นชุดควบคุมลบ และหลุมที่ไม่มีสารสกัดเป็นชุดควบคุมบวก บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 96 ชั่วโมง จากนั้นย้อมเซลล์มะเร็งทดสอบโดยดูดสารละลาย MTT (3-(4,5- dimethylthiazolyl-2-yl) -2,5- diphenyltetrazolium bromide)

หลุมละ 10 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ดูดสารละลาย MTT และอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากหลุมละลายตะกอน farmazan ด้วยสารละลาย 0.04 N HCl ใน isopropanol หลุมละ 150 ไมโครลิตร ดูดขึ้นลงจนตะกอนละลายหมด นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรโดยใช้เครื่อง microplate reader แล้วนำข้อมูลมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์

สำหรับเซลล์มะเร็งชนิดแควนลอย เตรียมเซลล์ให้มีปริมาณ 2×10^4 ต่อหลุม ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นเตรียมส่วนสกัดหยาบโดยเจือจางด้วย RPMI1640 complete medium ให้มีความเข้มข้นเป็นสองเท่าของสารสกัดที่ใช้สำหรับเซลล์เกาะผิว จากนั้นเติมส่วนสกัดหยาบที่เตรียมไว้ลงในแต่ละหลุมปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 96 ชั่วโมง จากนั้นย้อมเซลล์มะเร็งทดสอบโดยหยดสารละลาย MTT (3-(4,5-dimethylthiazolyl-2-yl)-2,5-diphenylterazolium bromide) หลุมละ 10 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นละลายตะกอน farmazan ด้วยสารละลาย 0.04 N HCl ใน isopropanol หลุมละ 150 ไมโครลิตร ดูดขึ้นลงจนตะกอนละลายหมด แล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรโดยใช้เครื่อง microplate reader แล้วนำข้อมูลมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์ ซึ่งคำนวณได้ดังสมการนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยู่รอดของเซลล์} = \frac{(\text{OD test} - \text{OD blank}) \times 100}{\text{OD control} - \text{OD blank}}$$

OD test = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

OD control = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวควบคุม

OD blank = ค่าการดูดกลืนแสงของ blank

นำข้อมูลที่ได้จากการคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยู่รอดของเซลล์เพื่อใช้วิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตายไปครึ่งหนึ่ง (IC₅₀)

3.6 พิสูจน์เอกลักษณ์โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางพันธุกรรมด้วยวิธีทางอณูชีววิทยาของเชื้อ *Xylaria* sp. TR30.

3.6.1 การตรวจสอบการจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ศึกษาลักษณะปรากฏของสโตรมาเชื้อ *Xylaria* sp. TR30 ด้วยตาเปล่าและภายใต้กล้องสเตอริโอไมโครสโคป รวมทั้งโครงสร้างขนาดเล็กภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เช่น วัดขนาด สังเกตสี ลักษณะออสติโอล เพอริทีเซีย แอปพิคูล แอปพาราตัส แอสโคสปอร์ และเจอร์มสลิท เป็นต้น โดยนำไปเทียบและตรวจสอบกับเอกสารต่างๆ ที่ใช้เป็นหลักในการจำแนก (Suwannasai, 2005; Thienhirun, 1997)

3.6.2 การตรวจสอบการจำแนกชนิดด้วยวิธีทางอณูชีววิทยา

3.6.2.1 การเตรียมเส้นใยราเพื่อใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

เลี้ยงเชื้อ *Xylaria* sp. TR30 ที่คัดเลือกได้บน PDA ประมาณ 5-7 วัน ชูดเส้นใยทั้งหมดใส่ในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ (Microcentrifuge tube) แล้วบดให้ละเอียดด้วยแท่งแก้วปราศจากเชื้อ

3.6.2.2 การสกัดดีเอ็นเอ

นำเส้นใยที่บดแล้วมาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุด Favorprep Plant Genomic DNA Extraction Mini Kit (FAVORGEN)

3.6.2.3 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ *internal transcribed spacer (ITS1-5.8S-ITS2 region)* ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส (*polymerase chain reaction, PCR*)

เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 โดยใช้ ITS5 และ ITS4 ไพรเมอร์

ตารางที่ 3.1 แสดงลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส

ไพรเมอร์	ลำดับเบส (5' - 3')	อ้างอิง
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	White และคณะ (1990)
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White และคณะ (1990)

ตารางที่ 3.2 แสดงส่วนประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส

ส่วนประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยา	ปริมาตร	ความเข้มข้นสุดท้าย
forward primer (ITS5) เข้มข้นเริ่มต้น 10 ไมโครโมลาร์	1 ไมโครลิตร	0.4 ไมโครโมลาร์
reverse primer (ITS4) เข้มข้นเริ่มต้น 10 ไมโครโมลาร์	1 ไมโครลิตร	0.4 ไมโครโมลาร์
DNA template	5 ไมโครลิตร	10 - 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร
TopTaq 2X master mix kit	12.5 ไมโครลิตร	Taq Polymerase = 1.25 ยูนิต ต่อ 25 ไมโครลิตร dNTP = 400 ไมโครโมลาร์
สีย้อม (corral red)	2.5 ไมโครลิตร	
น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	3 ไมโครลิตร	
ปริมาตรทั้งหมด	25 ไมโครลิตร	

ตารางที่ 3.3 แสดงเวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส

กระบวนการ	อุณหภูมิ	เวลา
Initial denaturation	94 องศาเซลเซียส	2 นาที
Denaturation	94 องศาเซลเซียส	45 วินาที
Annealing	50 องศาเซลเซียส	45 วินาที
Extension	72 องศาเซลเซียส	1 นาที
Final extension	72 องศาเซลเซียส	10 นาที

3.6.2.4 ติดตามผลปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส โดย agarose gel electrophoresis

นำตัวอย่างดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส มาตรวจหาชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้โดยใช้เทคนิค agarose gel electrophoresis ซึ่งเป็นวิธีหนึ่งที่ใช้ในการวิเคราะห์หาขนาดของชิ้นดีเอ็นเอในตัวอย่าง โดยการนำดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสปริมาตร 5 ไมโครลิตร หยดลงใน 1% agarose gel ซึ่งแช่ใน 0.5X TBE buffer มาแยกบนตัวกลางที่มีกระแสไฟฟ้า โดยอาศัยหลักการที่ว่าดีเอ็นเอมีประจุเป็นลบดังนั้นจึงสามารถเคลื่อนไปยังขั้วบวกในสนามไฟฟ้าได้ ตัวกลางที่ใช้ได้แก่วุ้น (agarose) โดยเมื่อวุ้นแข็งตัวจะมีลักษณะเป็นรูพรุนอยู่ภายในขนาดของรูพรุนขึ้นกับความเข้มข้นของวุ้น ถ้าวุ้นเข้มข้นมากรูพรุนจะเล็ก ดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่จะเคลื่อนที่ไปได้ยาก ดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ไปในสนามไฟฟ้าตามขนาดโมเลกุลโดยที่สารโมเลกุลเล็กจะเคลื่อนที่ไปได้เร็วกว่าสารโมเลกุลใหญ่

3.6.2.5 การทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์

นำชิ้นดีเอ็นเอมาทำบริสุทธิ์ด้วยชุด FavorPrep GEL/PCR purification mini kit (FAVORGEN) จากนั้นติดตามชิ้นดีเอ็นเอที่ทำบริสุทธิ์แล้วด้วยวิธี agarose gel electrophoresis เพื่อให้มั่นใจว่าหลังการทำบริสุทธิ์แล้วดีเอ็นเอไม่สูญหาย

3.6.2.6 วิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอ

นำดีเอ็นเอที่ทำบริสุทธิ์แล้วส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ จากนั้นนำไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank DNA (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) ด้วยโปรแกรม BLAST นำข้อมูลของลักษณะทางสัญญาณวิทยาและลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาวิเคราะห์เพื่อการระบุชนิดที่ถูกต้อง

3.7 พิสูจน์เอกลักษณ์โครงสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของ *Xylaria* sp. TR30. ที่คัดเลือกได้

นำ *Xylaria* sp. TR30. ที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีที่สุดมาเลี้ยงในอาหารเหลว MEB 2% ที่มีน้ำตาล Glucose 2% ปริมาตร 500 มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่ขนาด 1000 มิลลิลิตรโดยเลี้ยงให้ได้ปริมาตรทั้งหมด 30 ลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องภายใต้สภาวะอยู่กับที่เป็นระยะเวลา 30 วัน จากนั้นนำส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อมาสกัดโดยใช้วิธีตามหัวข้อที่ 3.2 ได้ส่วนสกัดหยาบที่เป็นของแข็งและของเหลวรวมกัน นำส่วนสกัดหยาบที่ได้ทั้งหมดมาสกัดซ้ำด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ ได้ส่วนสกัดหยาบสองส่วนคือส่วนที่เป็นของเหลว (TR30N1) และส่วนสกัดหยาบที่เป็นของแข็ง (TR30N2)

ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสาร โดยนำส่วนสกัดหยาบทั้งสองส่วนมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปี เช่น Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR) และนำส่วนสกัดหยาบส่วนที่ 1 ซึ่งมีน้ำหนักแห้ง 19 กรัมมาแยกด้วยวิธีโครมาโตกราฟีชนิดคอลัมน์ (Column Chromatography) โดยใช้ silica gel 60 เป็น stationary phase และใช้ เฮกเซน เอทิลแอลกอฮอล์ และเมทานอล เป็นตัวชะซึ่งมีอัตราส่วนดังนี้

เฮกเซน 100 %

เอทิลแอลกอฮอล์ต่อเฮกเซน, 10:90, 20:80, 30:70, 40:60, 50:50, 60:40, 70:30, 80:20, 90:10,

เอทิลแอลกอฮอล์ 100 %

เมทานอลต่อเอทิลแอลกอฮอล์, 20:80, 40:60, 60:40, 80:20

เมทานอล 100%

เก็บลำดับส่วน (fractions) ทุกๆ 50 มิลลิลิตรจากนั้นรวมลำดับส่วนที่ได้โดยใช้เทคนิค Thin Layer Chromatography (TLC) โดยรวมลำดับส่วนที่มีจุดบน TLC เหมือนกันเข้าด้วยกัน ซึ่งรวมลำดับส่วนได้ทั้งหมด 11 ลำดับส่วนแล้วนำไปทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ด้วยวิธี

paper disc diffusion methods ในหัวข้อ 3.5.1.4 และวิธี agar well diffusion methods และทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งปากมดลูก CaSki

ทำการวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร TR30N2 ที่แยกได้ด้วยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปี เช่น Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR) และ Mass Spectroscopy

3.7.1 วิธี Agar well Diffusion Methods

เจาะรูอาหารที่ต้องใช้ในการทดสอบด้วยที่เจาะอาหารวุ้นที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 3 มิลลิเมตรที่ปราศจากเชื้อ จากนั้นทำเช่นเดียวกันกับวิธี paper disc diffusion methods ในหัวข้อ 3.5.1.4 แล้วหยดสารละลายที่ถูกละลายด้วย DMSO ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หยดลงในช่องที่ถูกเจาะไว้โดยมีปริมาตร 10 ไมโครลิตร (Boyanova และคณะ, 2005)

3.7.2 วิธีโครมาโตกราฟีชนิดคอลัมน์ (Column Chromatography)

ใช้ silica gel 60 รหัส 9385 ในการบรรจุลงในคอลัมน์ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 เซนติเมตร

3.7.3 วิธี Thin Layer Chromatography (TLC)

ใช้แผ่น aluminium ที่เคลือบผิวด้วย silica gel F254 (Merck) เป็น stationary phase จากนั้นตรวจสอบด้วย UV ที่มีความยาวคลื่น 254 และ 356 นาโนเมตร และนำไปชุบด้วยสารละลาย Vanillin แล้วเผา

3.7.4 วิธี Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR)

วิเคราะห์ NMR ด้วยเครื่อง Bruker AV 400 spectrometer 400MHz โดยละลายสารที่จะวิเคราะห์ให้มีปริมาณเนื้อสารมากกว่า 10 มิลลิกรัม ด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม เช่น CDCl₃, DMSO, MeOH-D

3.7.5 วิธี Mass Spectroscopy (MS)

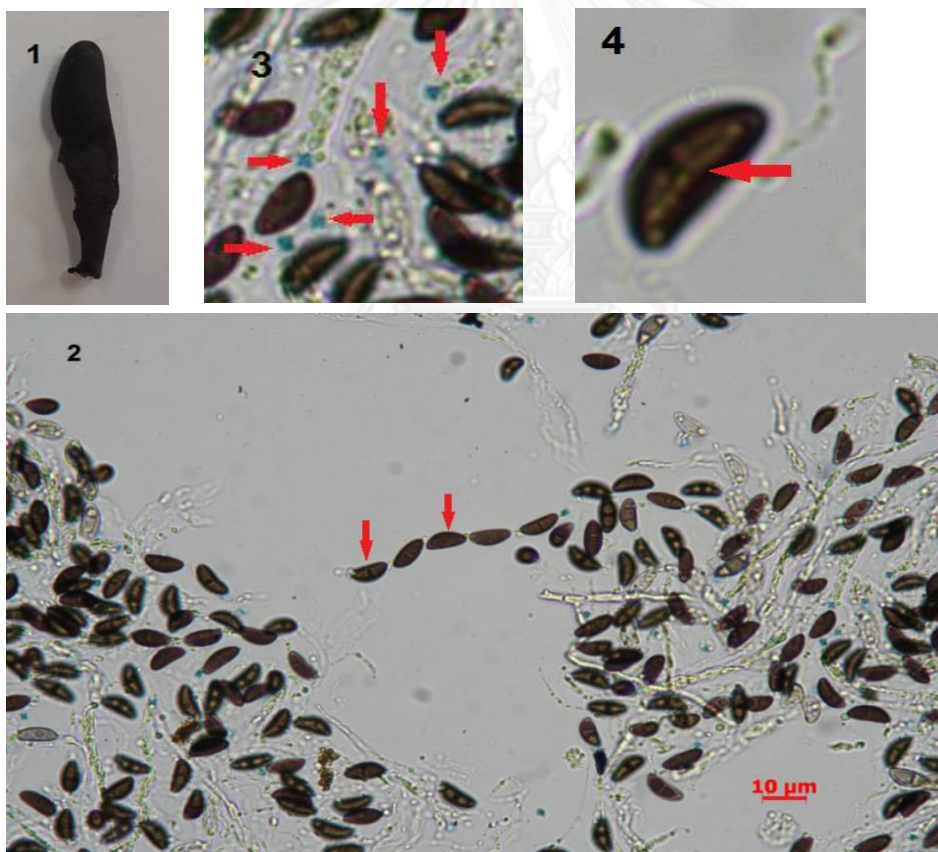
วิเคราะห์ MS ด้วยเครื่อง micrOTOF 72 ด้วยวิธี MKE_tune_low_positive 20130204.m

บทที่ 4

ผลการทดลอง

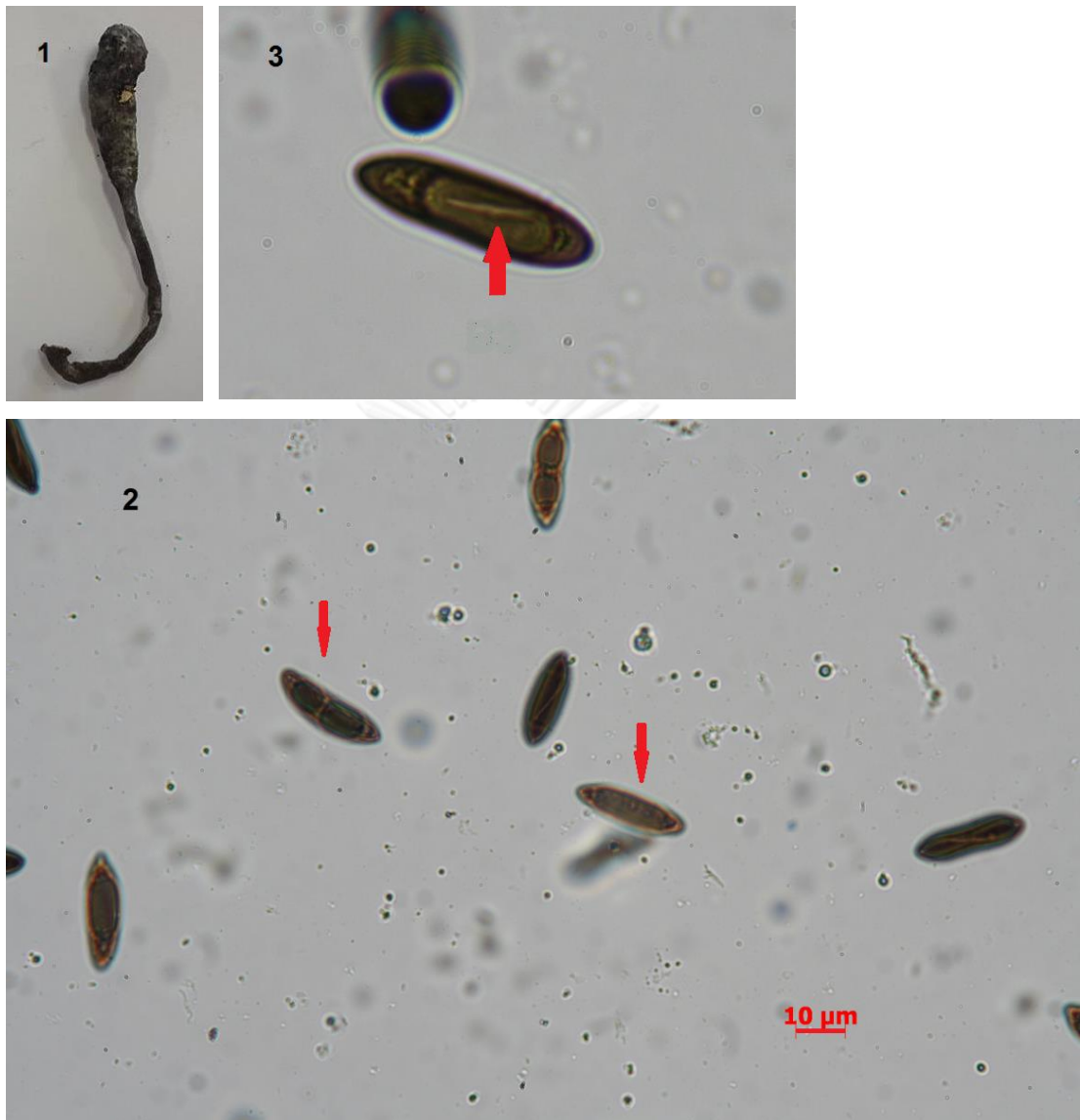
4.1 เก็บตัวอย่าง แยกเชื้อ และเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์

สำรวจเก็บตัวอย่างสโตรมา *Xylaria* spp. จากบริเวณสถานีวิจัยและฝึกอบรมวนเกษตรตราด ต.ท่ากุ่ม อ.เมือง จ.ตราด ในเดือนกรกฎาคม ปี 2553 จำนวนตัวอย่าง *Xylaria* spp. ที่เก็บรวบรวมได้ 27 ตัวอย่าง นำมาศึกษาลักษณะของสโตรมา เช่น วัดขนาด สังเกตสี โดยมีข้อมูลแสดงรูปที่ 4.1 – 4.24 และตารางที่ 4.1



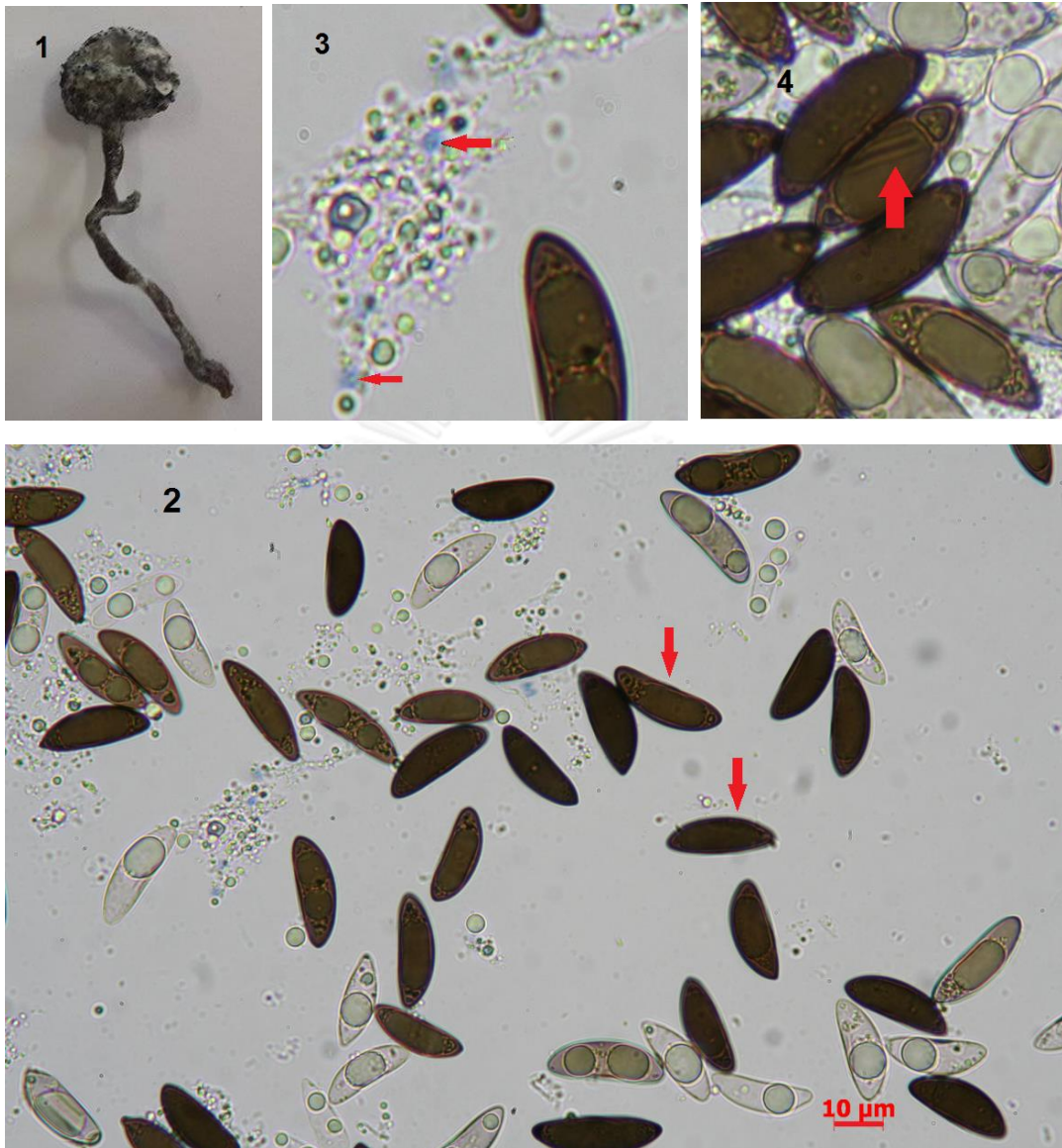
รูปที่ 4.1 แสดงลักษณะของสโตรมา แอสโคสปอร์ เจริ้มสลิท แอพพิคัล แอพพาราตัส ของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR01

- 1 = สโตรมาของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR01
- 2 = แอสโคสปอร์ของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR01 (ปลายลูกศร)
- 3 = แอพพิคัล แอพพาราตัส ของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR01 (ปลายลูกศร)
- 4 = เจริ้มสลิทของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR01 (ปลายลูกศร)



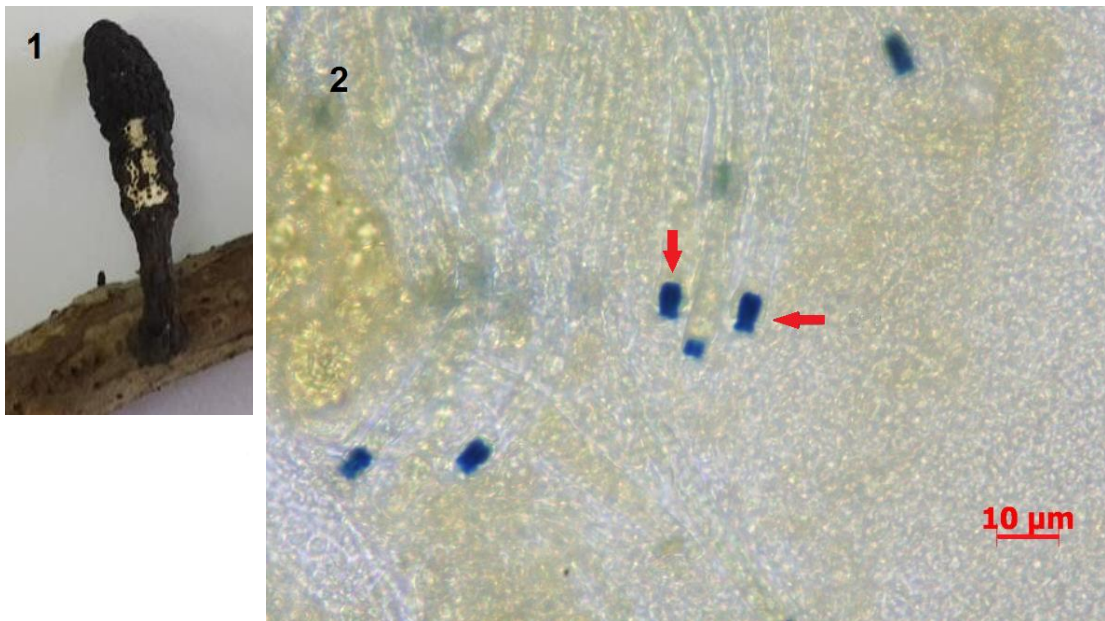
รูปที่ 4.2 แสดงลักษณะของสโตรมา แอสโคสปอร์ เจริ้มสลิท ของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR02/1

- 1 = สโตรมาของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR02/1
- 2 = แอสโคสปอร์ของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR02/1 (ปลายลูกศร)
- 3 = เจริ้มสลิทของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR02/1 (ปลายลูกศร)



รูปที่ 4.3 แสดงลักษณะของสโตรมา แอสโคสปอร์ เจริ่มสลิท แอพพิคัล แอพพาราตัส ของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR02/3

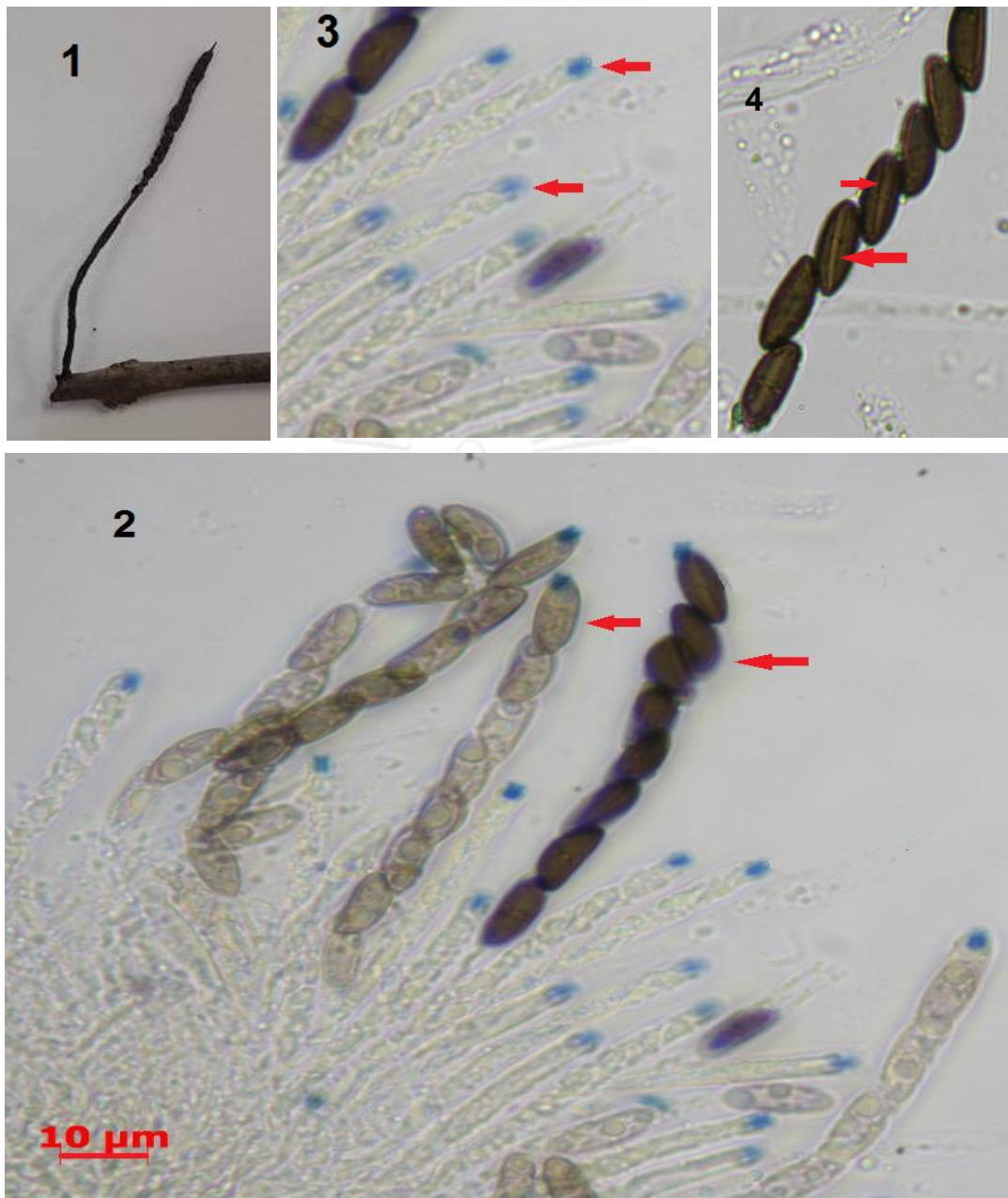
- 1 = สโตรมาของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR02/3 (ปลายลูกศร)
- 2 = แอสโคสปอร์ของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR02/3 (ปลายลูกศร)
- 3 = แอพพิคัล แอพพาราตัสของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR02/3 (ปลายลูกศร)
- 4 = เจริ่มสลิทของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR02/3 (ปลายลูกศร)



รูปที่ 4.4 แสดงลักษณะของสโตรมา แอสโคสปอร์ เจริญสลิท แอปพิคัล แอปพาราตัส ของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR03/1

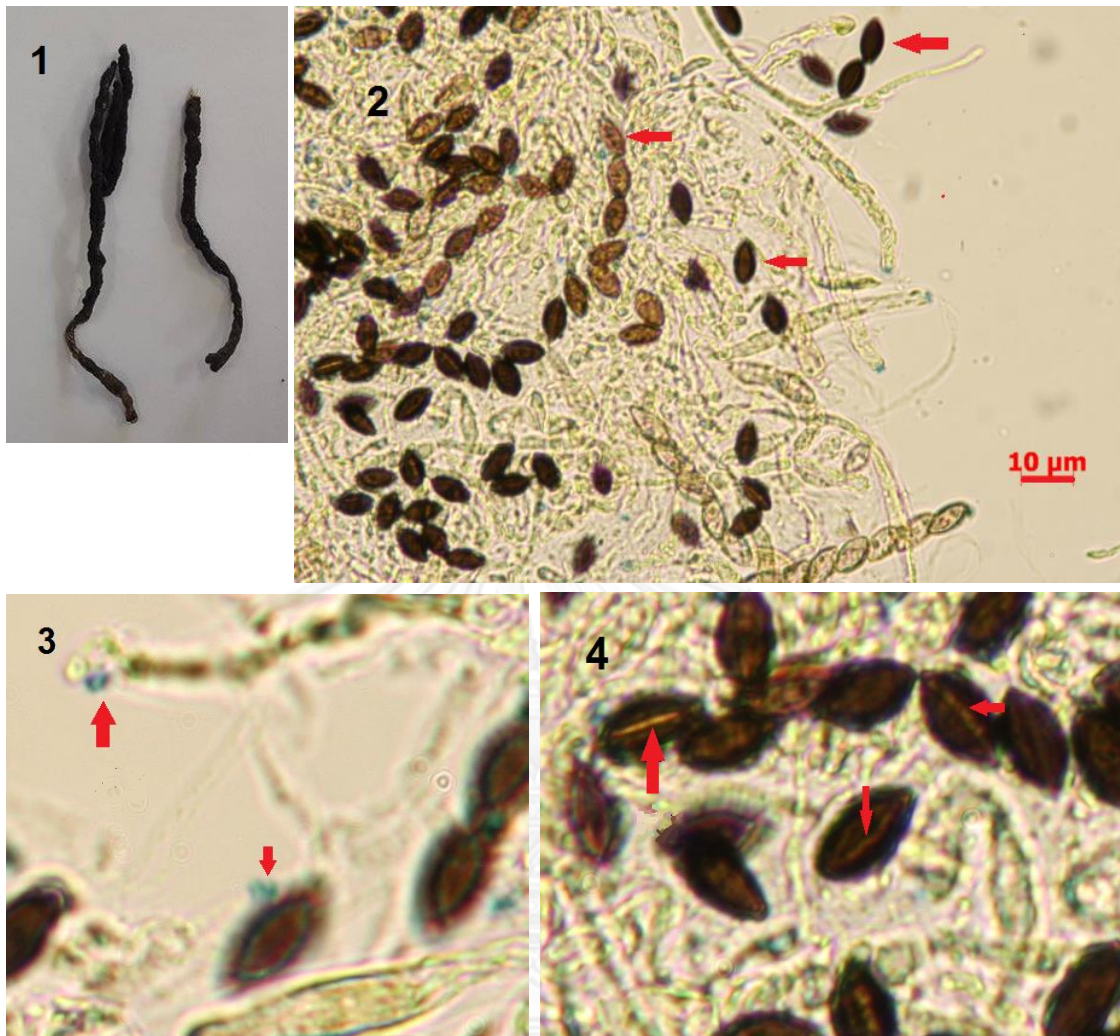
1 = สโตรมาของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR03/1

2 = แอปพิคัล แอปพาราตัส ของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR03/1 (ปลายลูกศร)



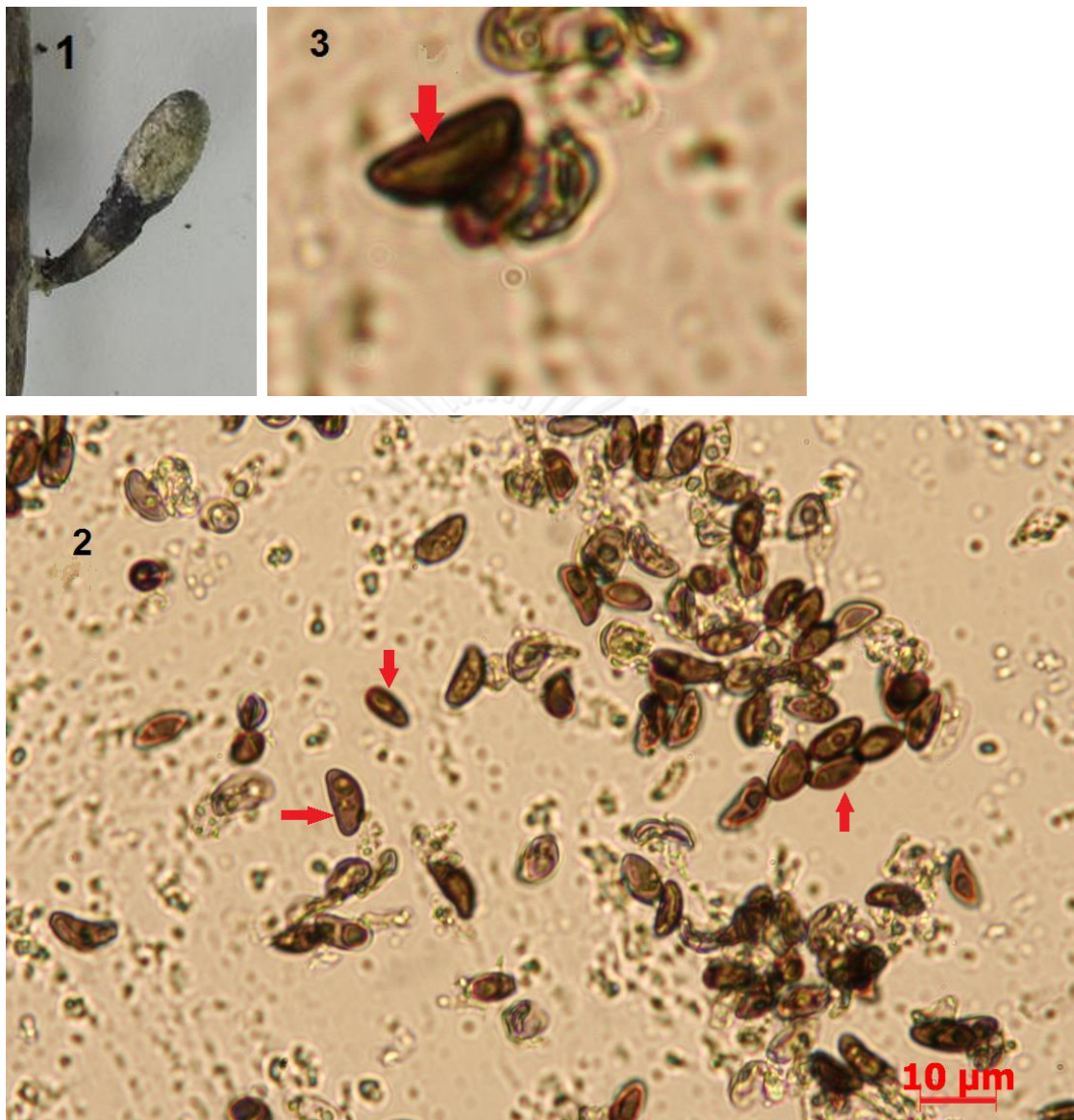
รูปที่ 4.5 แสดงลักษณะของสโตรมา แอสโคสปอร์ เจริ้มสลิท แอพพิคัล แอพพาราตัสของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR04

- 1 = สโตรมาของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR04
- 2 = แอสโคสปอร์ของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR04 (ปลายลูกศร)
- 3 = แอพพิคัล แอพพาราตัส ของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR04 (ปลายลูกศร)
- 4 = เจริ้มสลิทของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR04 (ปลายลูกศร)



รูปที่ 4.6 แสดงลักษณะของสโตรมา แอสโคสปอร์ เจริ่มสลิท แอพพิคัล แอพพาราตัส ของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR05

- 1 = สโตรมาของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR05
- 2 = แอสโคสปอร์ของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR05 (ปลายลูกศร)
- 3 = แอพพิคัล แอพพาราตัสของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR05 (ปลายลูกศร)
- 4 = เจริ่มสลิทของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR05 (ปลายลูกศร)



รูปที่ 4.7 แสดงลักษณะของสโตรมา แอสโคสปอร์ เจริญสลิท ของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR08

- 1 = สโตรมาของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR08
- 2 = แอสโคสปอร์ของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR08 (ปลายลูกศร)
- 3 = เจริญสลิทของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR08 (ปลายลูกศร)

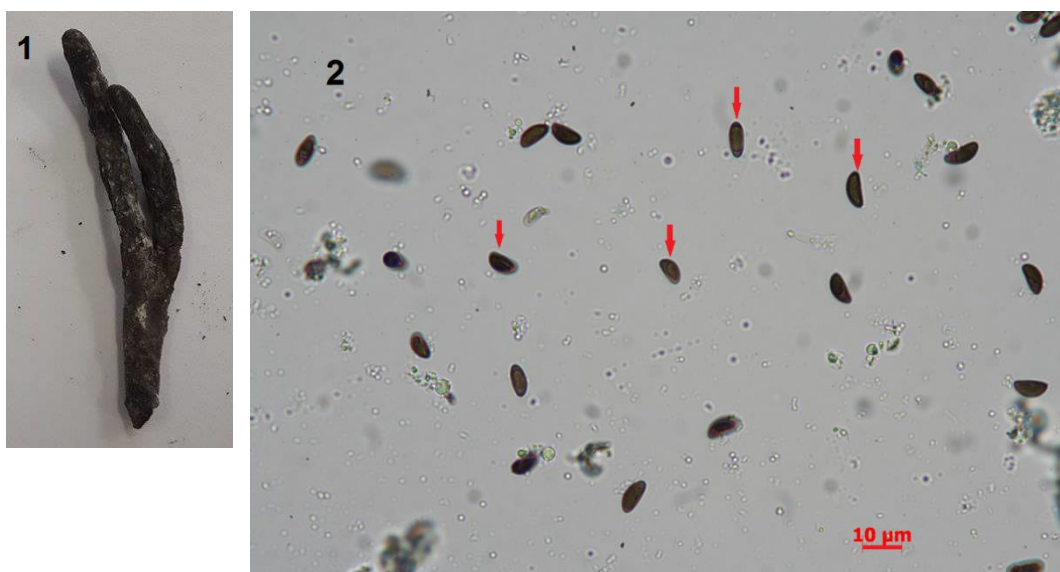


รูปที่ 4.8 แสดงลักษณะของสโตรมาของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR09X



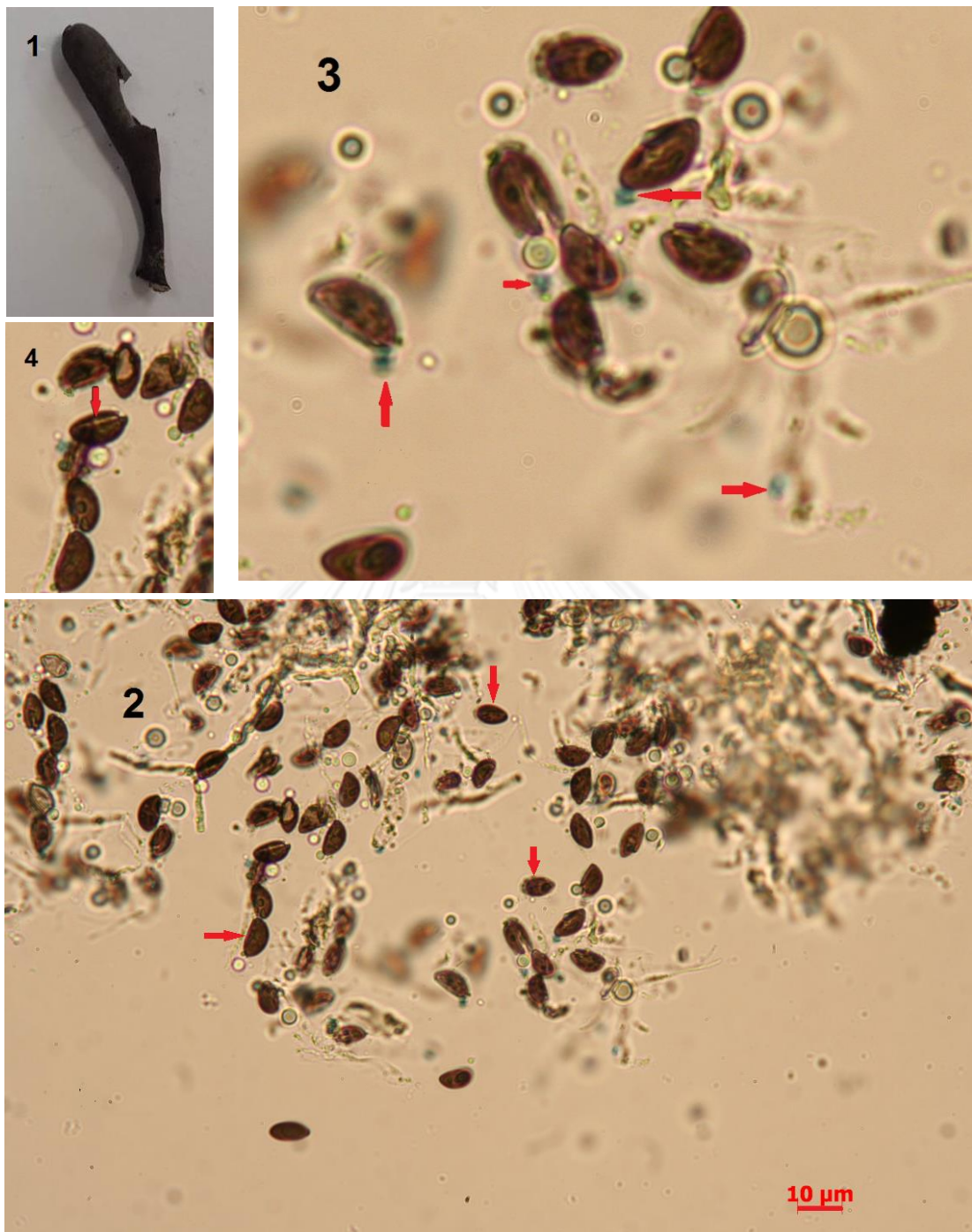
รูปที่ 4.9 แสดงลักษณะของสโตรมาของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR15

- 1 = สโตรมาของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR15 (ปลายลูกศร)
 2 = แอสคัสของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR15 (ปลายลูกศร)



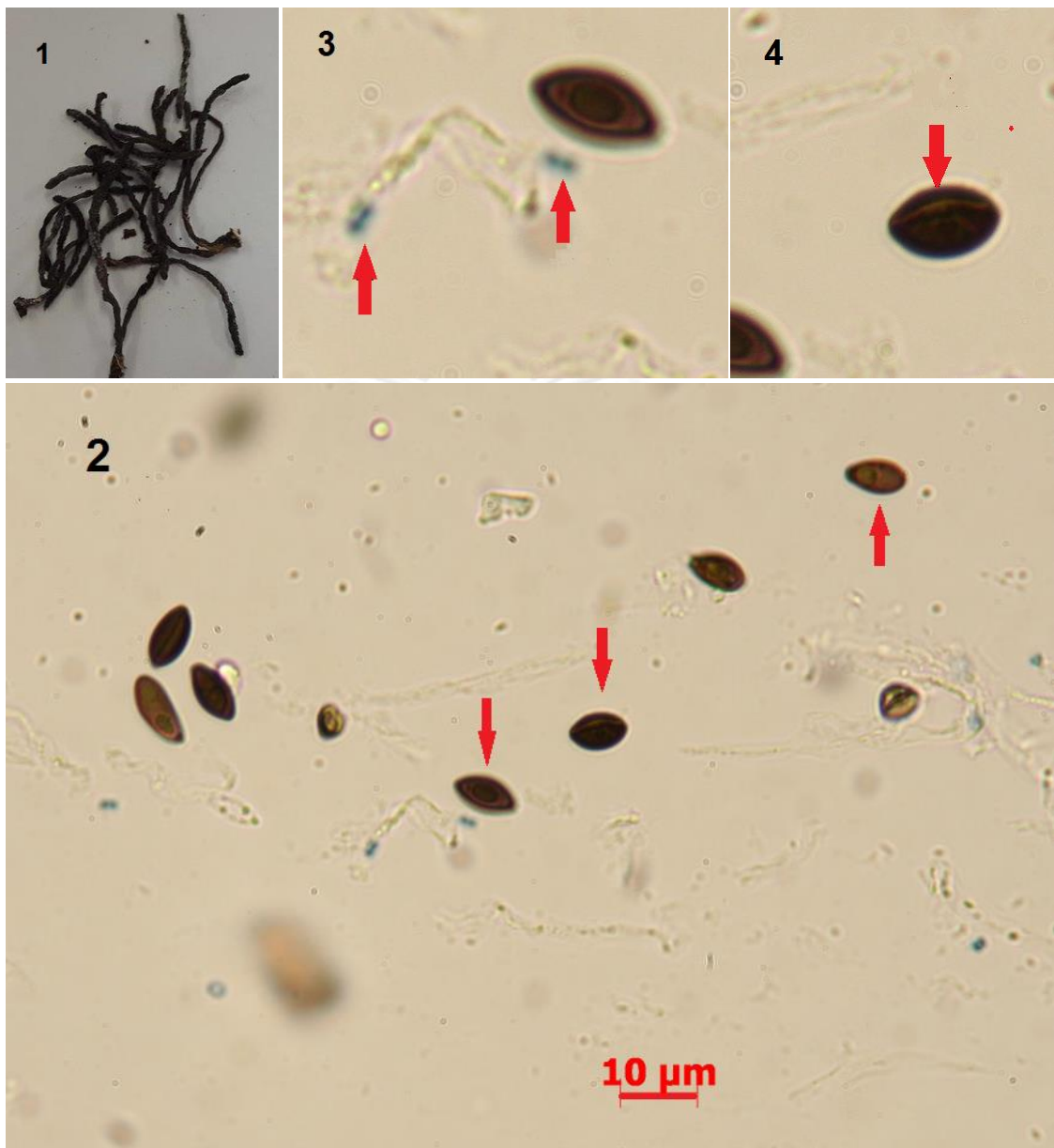
รูปที่ 4.10 แสดงลักษณะของสโตรมา แอสโคสปอร์ เจริ่มสลิต ของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR17

- 1 = สโตรมาของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR17
- 2 = แอสโคสปอร์ของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR17 (ปลายลูกศร)
- 3 = เจริ่มสลิตของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR17 (ปลายลูกศร)



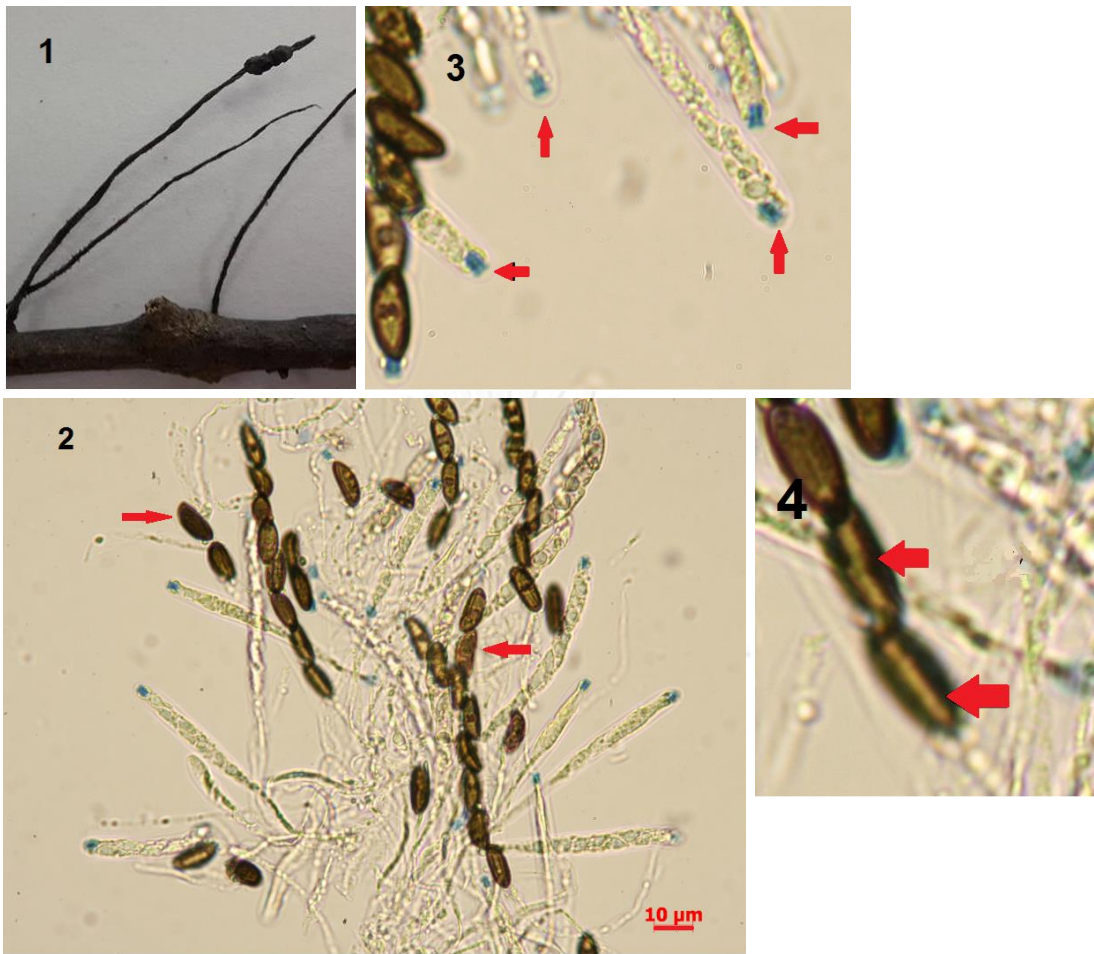
รูปที่ 4.11 แสดงลักษณะของสโตรมา แอสโคสปอร์ เจริ้มสลิท แอพพิคัล แอพพาราตัสของ *Xylaria sp.* ไอโซเลต TR20

- 1 = สโตรมาของ *Xylaria sp.* ไอโซเลต TR20
- 2 = แอสโคสปอร์ของ *Xylaria sp.* ไอโซเลต TR20 (ปลายลูกศร)
- 3 = แอพพิคัล แอพพาราตัสของ *Xylaria sp.* ไอโซเลต TR20 (ปลายลูกศร)
- 4 = เจริ้มสลิทของ *Xylaria sp.* ไอโซเลต TR20 (ปลายลูกศร)



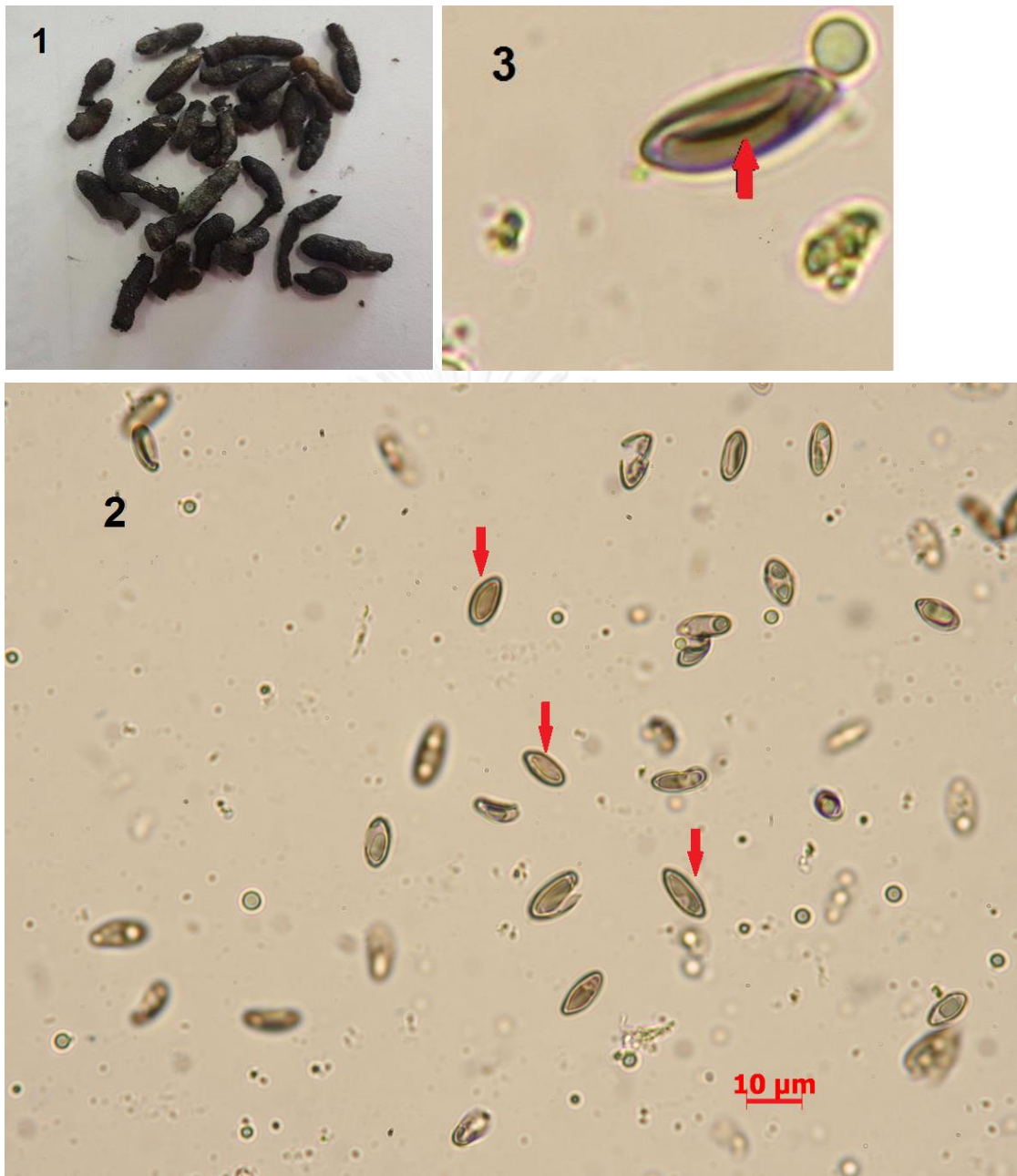
รูปที่ 4.12 แสดงลักษณะของสโตรมา แอสโคสปอร์ เจิร์มสลิต แอปพิคัล แอปพาราตัส ของ *Xylaria sp.* ไอโซเลต TR23

- 1 = สโตรมาของ *Xylaria sp.* ไอโซเลต TR23
- 2 = แอสโคสปอร์ของ *Xylaria sp.* ไอโซเลต TR23 (ปลายลูกศร)
- 3 = เจิร์มสลิตของ *Xylaria sp.* ไอโซเลต TR23 (ปลายลูกศร)
- 4 = แอปพิคัล แอปพาราตัส ของ *Xylaria sp.* ไอโซเลต TR23 (ปลายลูกศร)



รูปที่ 4.13 แสดงลักษณะของสโตรมา แอสโคสปอร์ เจริ้มสลิท แอพพิคัล แอพพาราตัส ของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR28

- 1 = สโตรมาของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR28
- 2 = แอสโคสปอร์ของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR28 (ปลายลูกศร)
- 3 = แอพพิคัล แอพพาราตัส ของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR28 (ปลายลูกศร)
- 4 = เจริ้มสลิทของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR28 (ปลายลูกศร)



รูปที่ 4.14 แสดงลักษณะของสโตรมา แอสโคสปอร์ เจริญสลิทของ *Xylaria sp.* ไอโซเลต

TR30

- 1 = สโตรมาของ *Xylaria sp.* ไอโซเลต TR30
- 2 = แอสโคสปอร์ของ *Xylaria sp.* ไอโซเลต TR30 (ปลายลูกศร)
- 3 = เจริญสลิทของ *Xylaria sp.* ไอโซเลต TR30 (ปลายลูกศร)



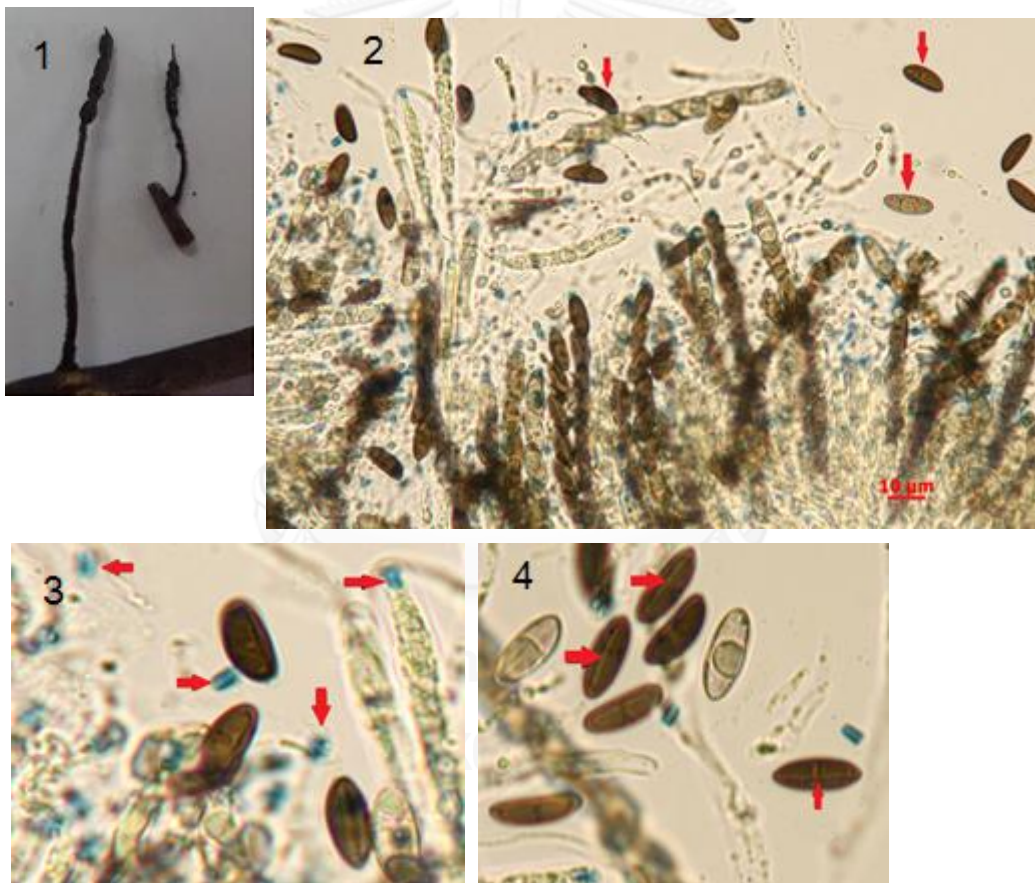
รูปที่ 4.15 แสดงลักษณะของสโตรมา แอสโคสปอร์ของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR31

1 = สโตรมาของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR31

2 = แอสโคสปอร์ของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR31 (ปลายลูกศร)

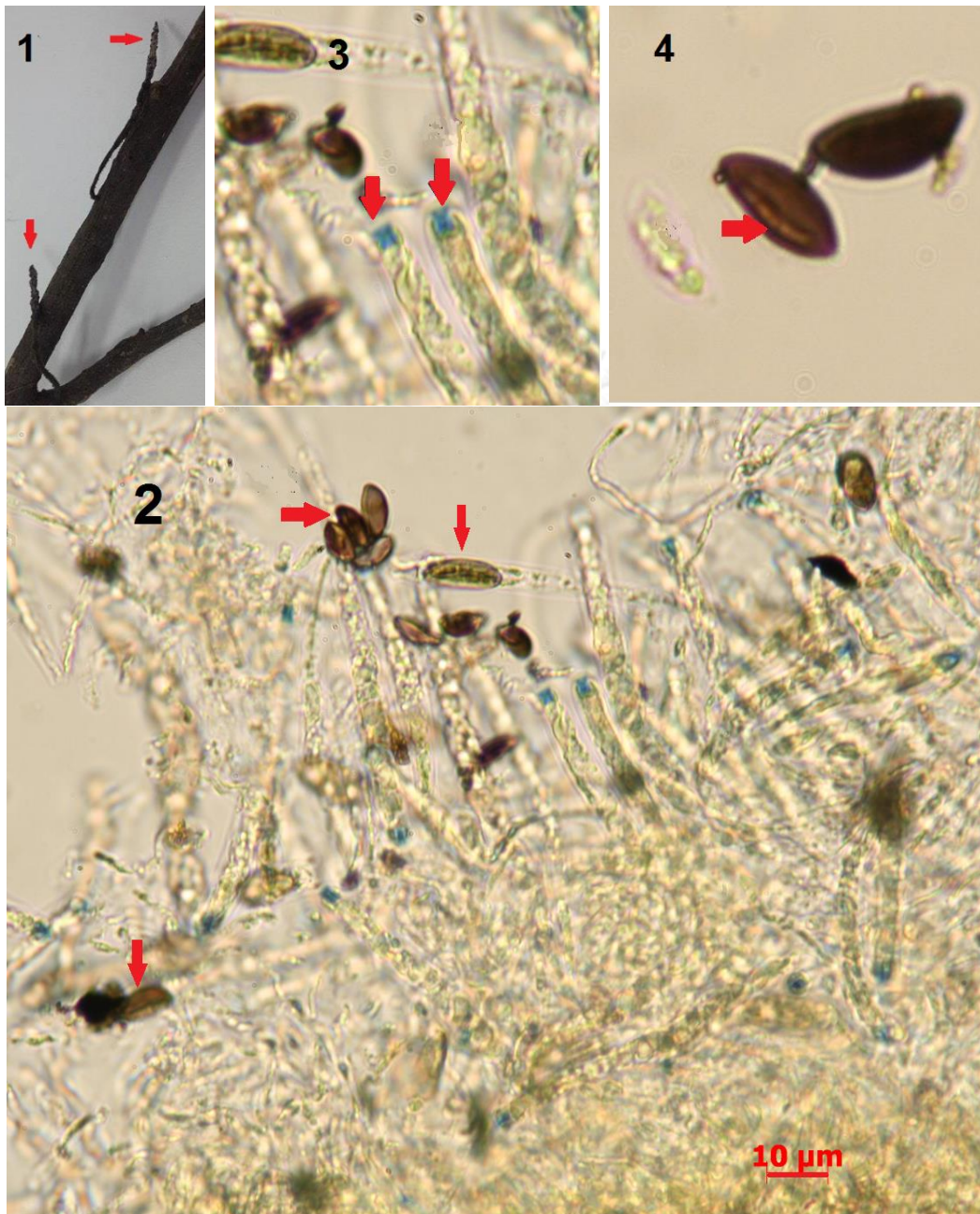


รูปที่ 4.16 แสดงลักษณะของสโตรมาของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR32



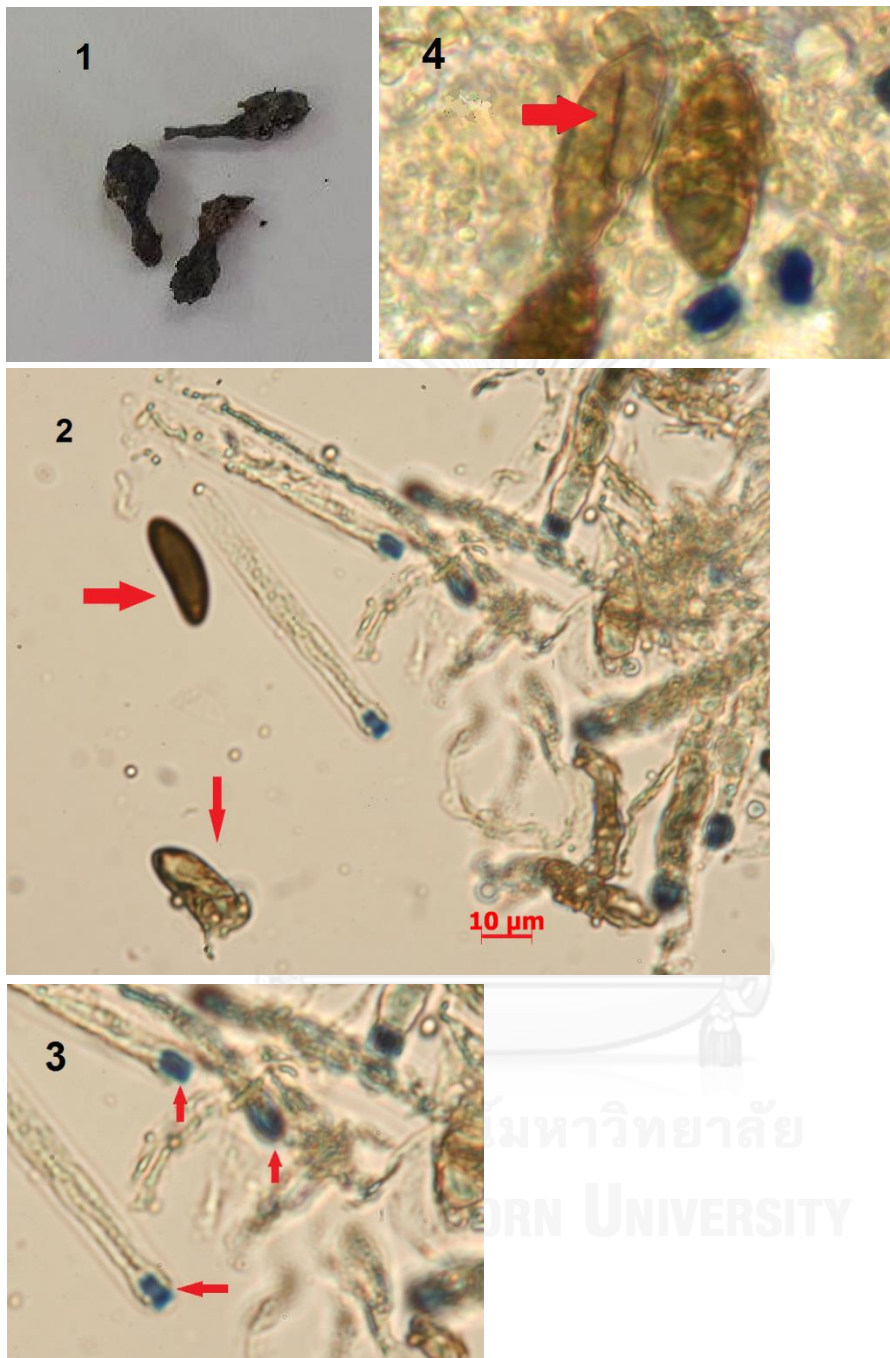
รูปที่ 4.17 แสดงลักษณะของสโตรมา แอสโคสปอร์ เจริ่มสลิต แอพพิคัล แอพพาราตัส ของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR34

- 1 = สโตรมาของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR34
- 2 = แอสโคสปอร์ของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR34 (ปลายลูกศร)
- 3 = แอพพิคัล แอพพาราตัสของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR34 (ปลายลูกศร)
- 4 = เจริ่มสลิตของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR34 (ปลายลูกศร)



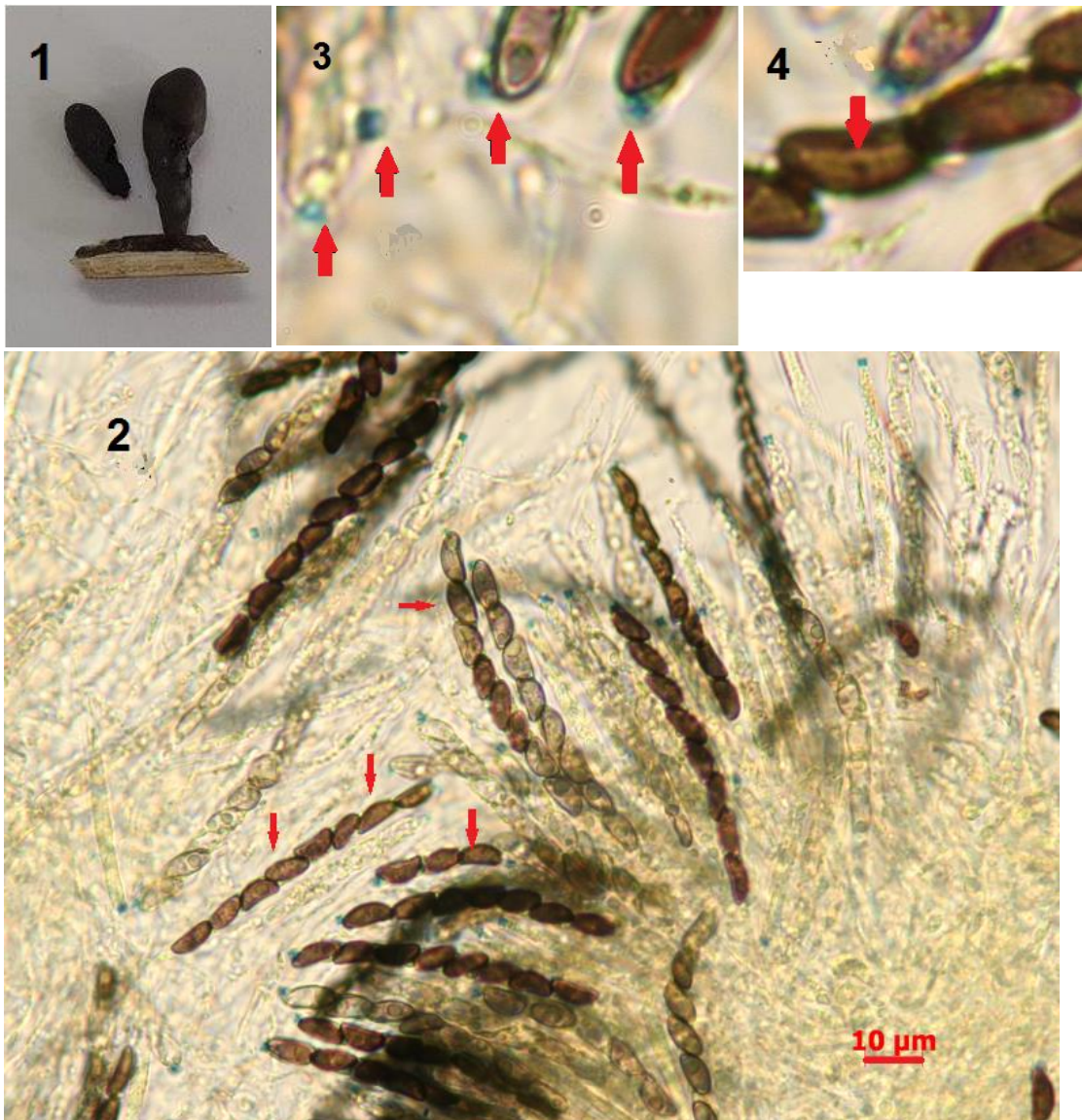
รูปที่ 4.18 แสดงลักษณะของสโตรมา แอสโคสปอร์ เจริ้มสลิท แอปพิคัล แอปพาราตัสของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR36

- 1 = สโตรมาของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR36
- 2 = แอสโคสปอร์ของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR36 (ปลายลูกศร)
- 3 = แอปพิคัล แอปพาราตัสของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR36 (ปลายลูกศร)
- 4 = เจริ้มสลิทของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR36 (ปลายลูกศร)



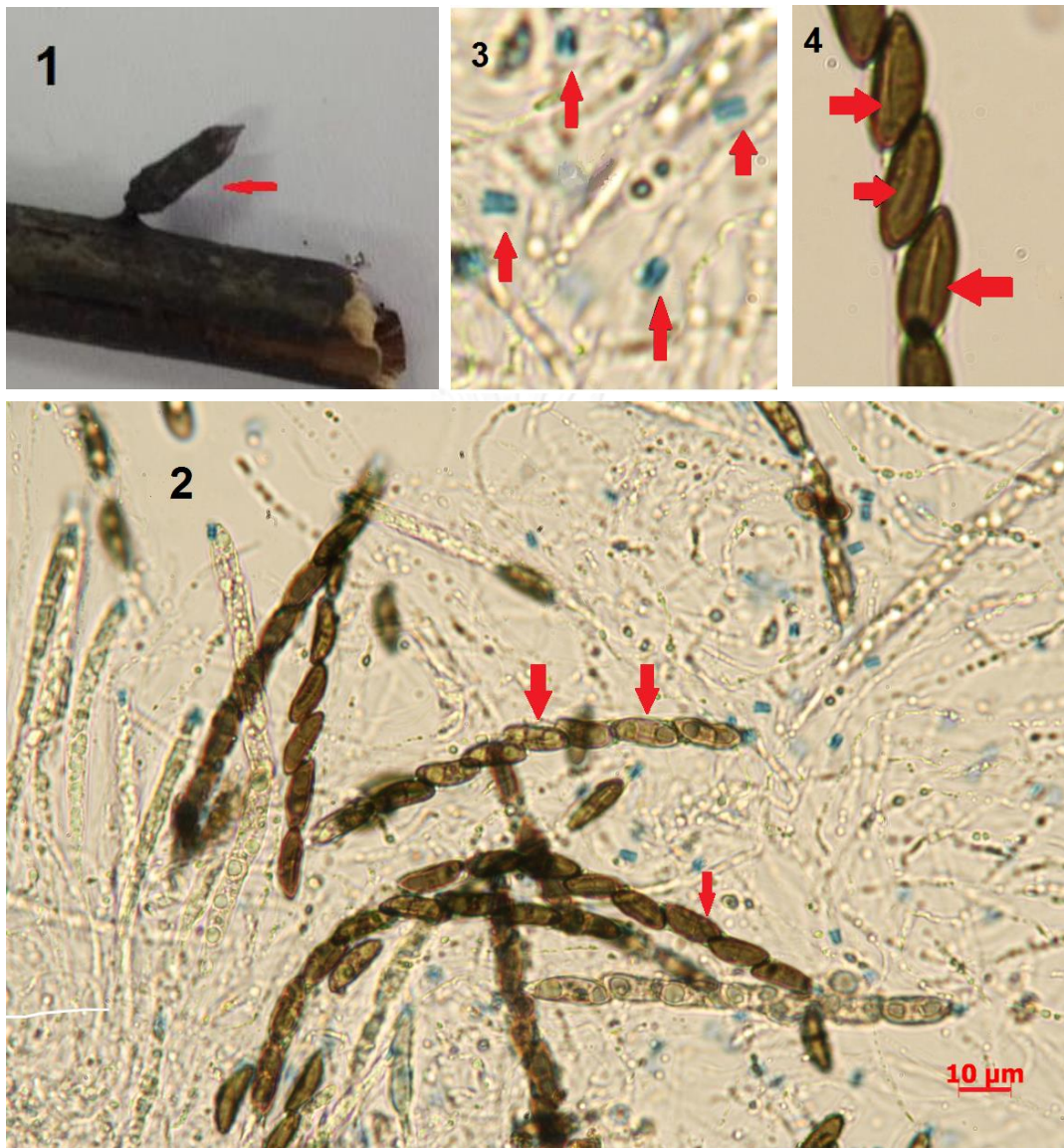
รูปที่ 4.19 แสดงลักษณะของสโตรมา แอสโคสปอร์ เจริ้มสลิท แอพพิคัล แอพพาราตัสของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR42

- 1 = สโตรมาของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR42
- 2 = แอสโคสปอร์ของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR42 (ปลายลูกศร)
- 3 = แอพพิคัล แอพพาราตัสของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR42 (ปลายลูกศร)
- 4 = เจริ้มสลิทของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR42 (ปลายลูกศร)



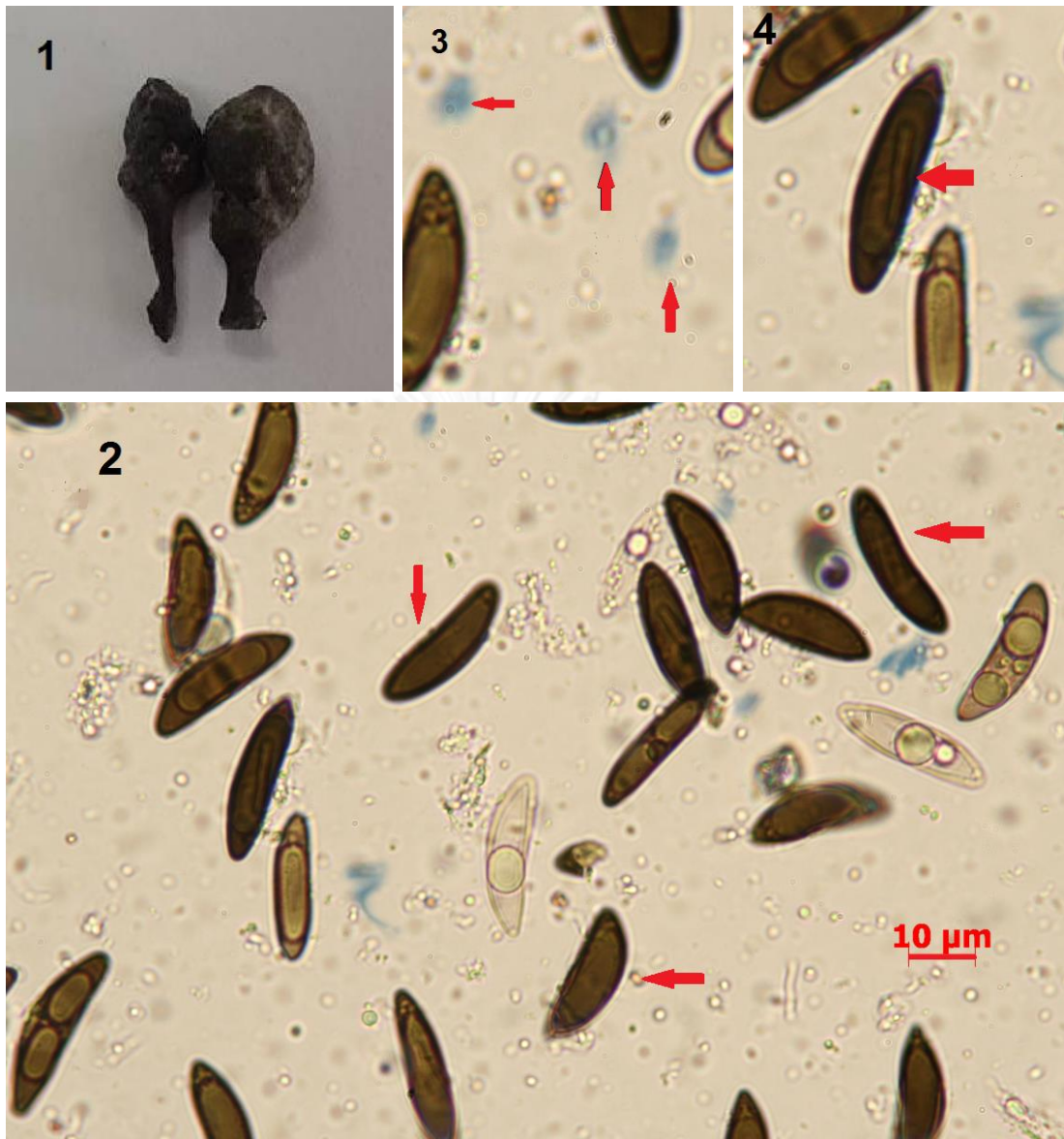
รูปที่ 4.20 แสดงลักษณะของสโตรมา แอสโคสปอร์ เจริ่มสลิท แอพพิคัล แอพพาราตัสของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR45

- 1 = สโตรมาของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR45 (ปลายลูกศร)
- 2 = แอสโคสปอร์ของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR45 (ปลายลูกศร)
- 3 = แอพพิคัล แอพพาราตัสของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR45 (ปลายลูกศร)
- 4 = เจริ่มสลิทของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR45 (ปลายลูกศร)



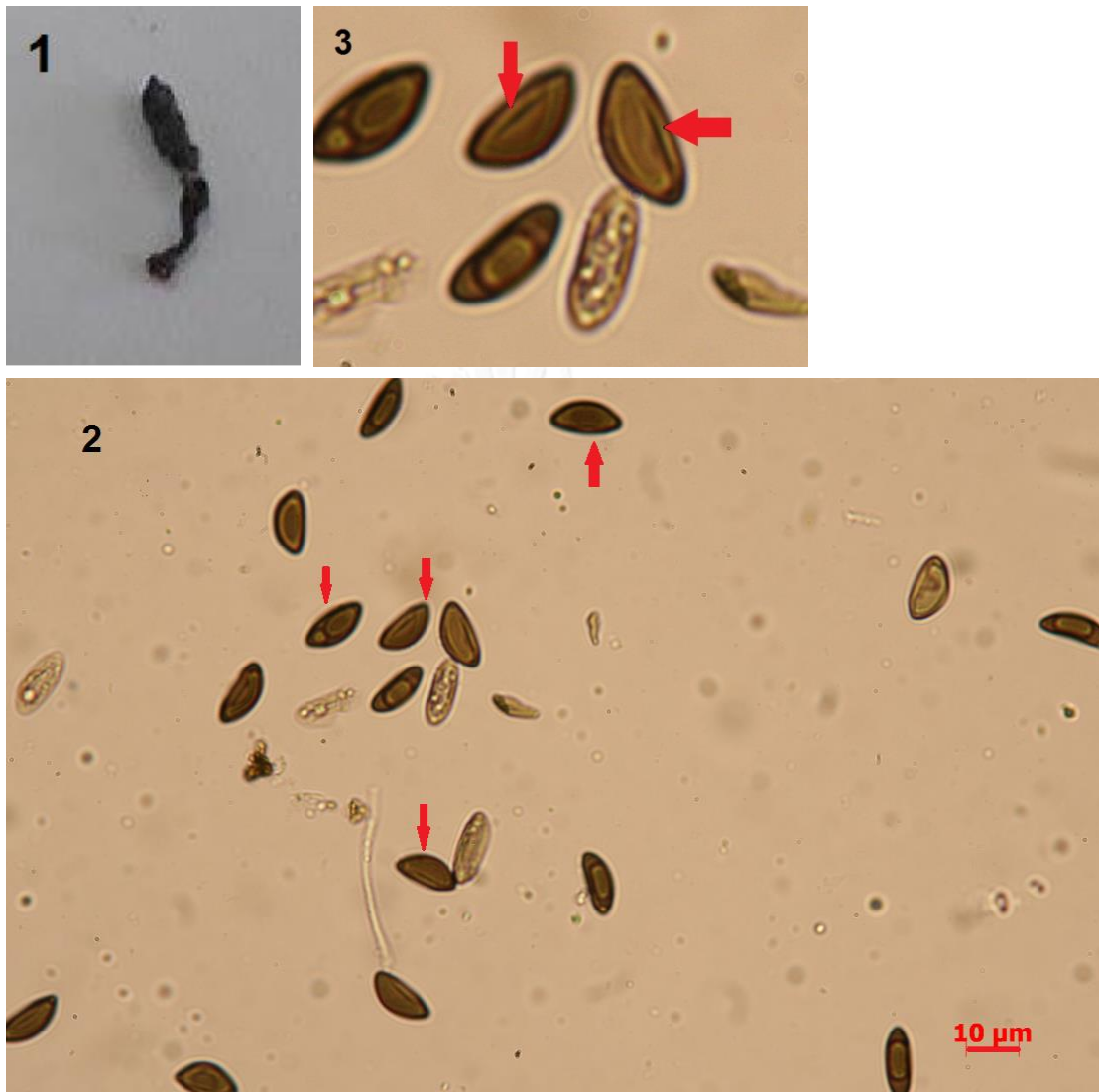
รูปที่ 4.21 แสดงลักษณะของสโตรมา แอสโคสปอร์ เจริ่มสลิต แอพพิตัล แอพพาราตัส ของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR47

- 1 = สโตรมาของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR47
- 2 = แอสโคสปอร์ของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR47 (ปลายลูกศร)
- 3 = แอพพิตัล แอพพาราตัสของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR47 (ปลายลูกศร)
- 4 = เจริ่มสลิตของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR47 (ปลายลูกศร)



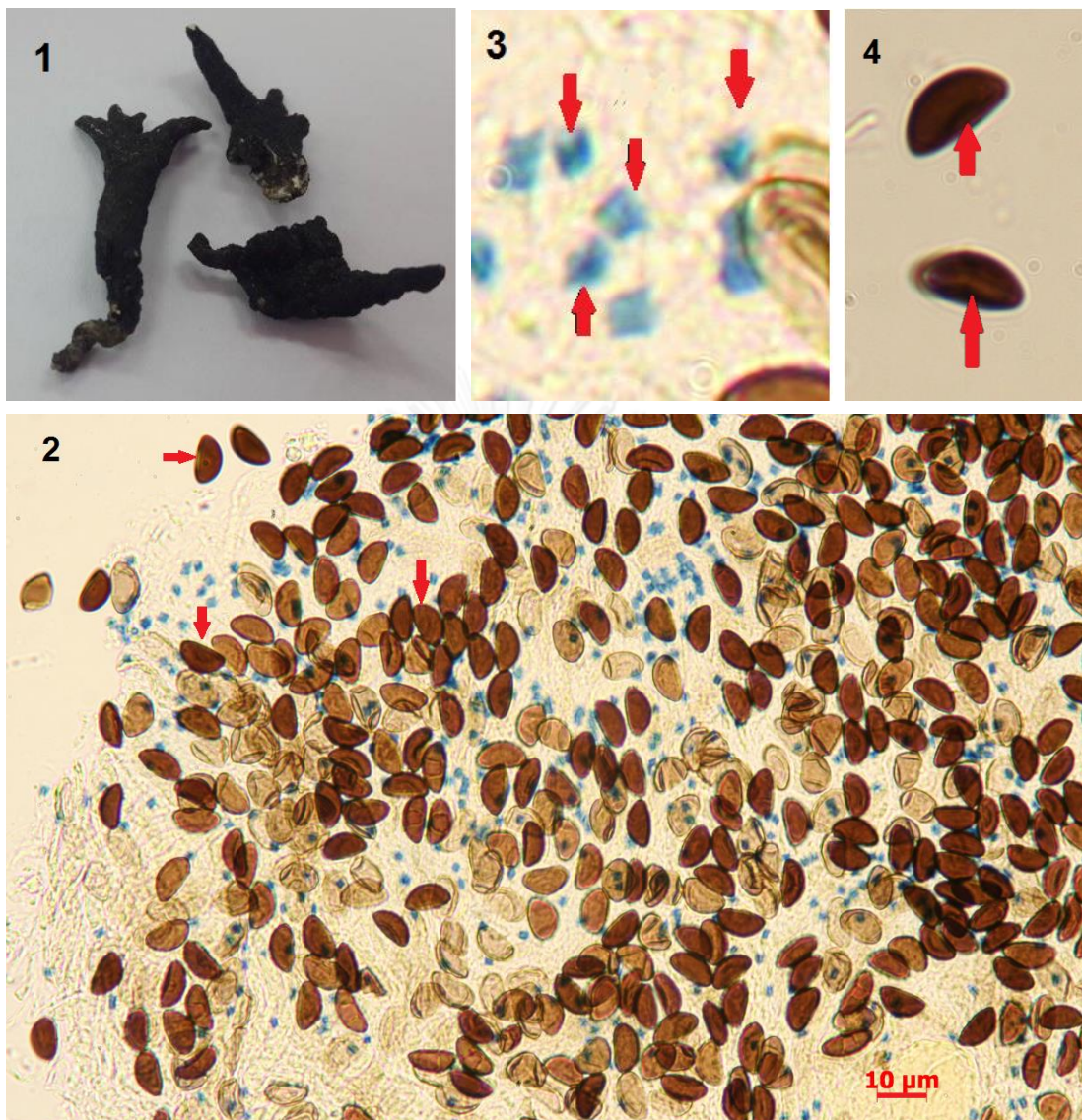
รูปที่ 4.22 แสดงลักษณะของสโตรมา แอสโคสปอร์ เจริ่มสลิท แอปพิคัล แอปพาราตัสของ *Xylaria sp.* ไอโซเลต TR48

- 1 = สโตรมาของ *Xylaria sp.* ไอโซเลต TR48
- 2 = แอสโคสปอร์ของ *Xylaria sp.* ไอโซเลต TR48 (ปลายลูกศร)
- 3 = แอปพิคัล แอปพาราตัสของ *Xylaria sp.* ไอโซเลต TR48 (ปลายลูกศร)
- 4 = เจริ่มสลิทของ *Xylaria sp.* ไอโซเลต TR48 (ปลายลูกศร)



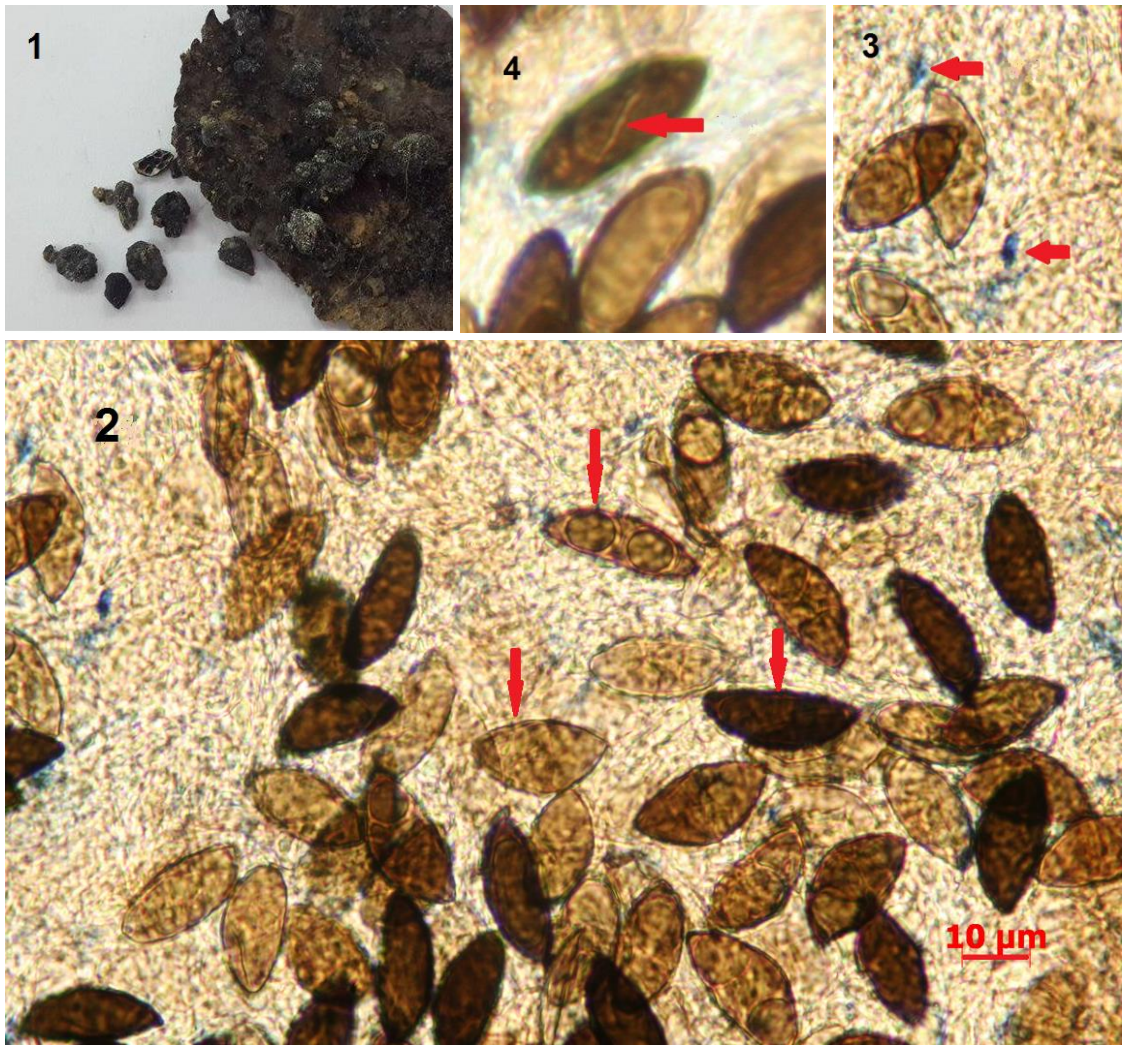
รูปที่ 4.23 แสดงลักษณะของสโตรมา แอสโคสปอร์ เจริ้มสลิท ของ *Xylaria sp.* ไอโซเลต TR49A

- 1 = สโตรมาของ *Xylaria sp.* ไอโซเลต TR49A
- 2 = แอสโคสปอร์ของ *Xylaria sp.* ไอโซเลต TR49A (ปลายลูกศร)
- 3 = เจริ้มสลิทของ *Xylaria sp.* ไอโซเลต TR49A (ปลายลูกศร)



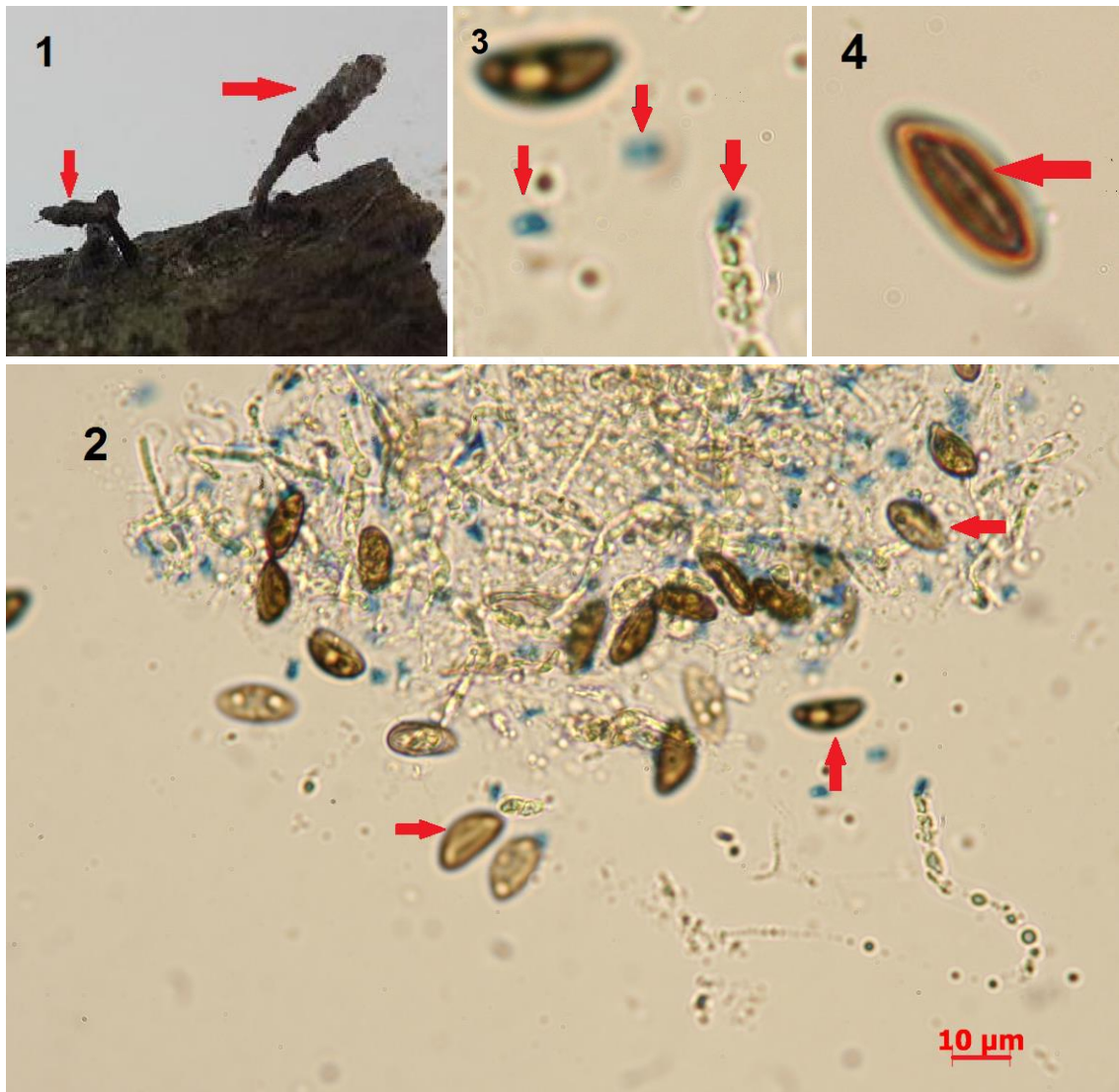
รูปที่ 4.24 แสดงลักษณะของสโตรมา แอสโคสปอร์ เจริ้มสลิท แอพพิคัล แอพพาราตัสของ *Xylaria sp.* ไอโซเลต TR51

- 1 = สโตรมาของ *Xylaria sp.* ไอโซเลต TR51
- 2 = แอสโคสปอร์ของ *Xylaria sp.* ไอโซเลต TR51 (ปลายลูกศร)
- 3 = แอพพิคัล แอพพาราตัสของ *Xylaria sp.* ไอโซเลต TR51 (ปลายลูกศร)
- 4 = เจริ้มสลิทของ *Xylaria sp.* ไอโซเลต TR51 (ปลายลูกศร)



รูปที่ 4 25 แสดงลักษณะของสโตรมา แอสโคสปอร์ เจริ่มสลิต แอปพิคัล แอปพาราตัส ของ *Xylaria sp.* ไอโซเลต TR54H

- 1 = สโตรมาของ *Xylaria sp.* ไอโซเลต TR54H
- 2 = แอสโคสปอร์ของ *Xylaria sp.* ไอโซเลต TR54H (ปลายลูกศร)
- 3 = แอปพิคอล แอปพาราตัสของ *Xylaria sp.* ไอโซเลต TR54H (ปลายลูกศร)
- 4 = เจริ่มสลิตของ *Xylaria sp.* ไอโซเลต TR54H (ปลายลูกศร)



รูปที่ 4.26 แสดงลักษณะของสโตรมา แอสโคสปอร์ เจริ้มสลิท แอปพิคัล แอปพาราตัส ของ *Xylaria sp.* ไอโซเลต TR55

- 1 = สโตรมาของ *Xylaria sp.* ไอโซเลต TR55
- 2 = แอสโคสปอร์ของ *Xylaria sp.* ไอโซเลต TR55 (ปลายลูกศร)
- 3 = แอปพิคอล แอปพาราตัสของ *Xylaria sp.* ไอโซเลต TR55 (ปลายลูกศร)
- 4 = เจริ้มสลิทของ *Xylaria sp.* ไอโซเลต TR55 (ปลายลูกศร)

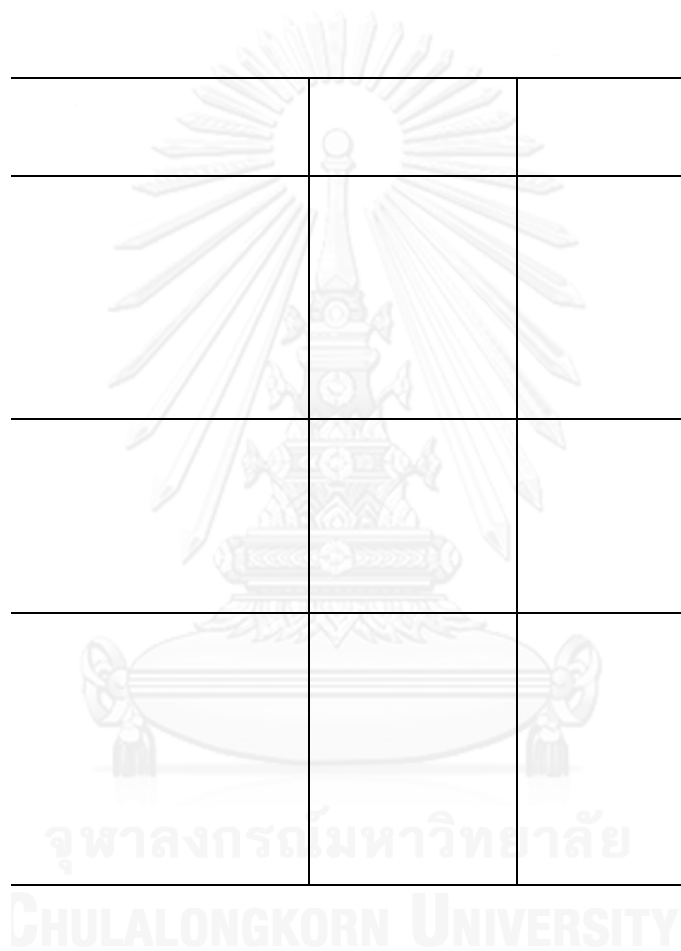
ตารางที่ 4.1 แสดงข้อมูลต่างๆของตัวอย่างสโตร์มาที่เก็บจากสถานีวิจัยและฝึกอบรมรวมนเกษตรตราด

ตารางที่ 4.1 (ต่อ) แสดงข้อมูลต่างๆของตัวอย่างสโตรมที่เก็บจากสถานีวิจัยและมีปริมาณฝนแตกต่างกัน

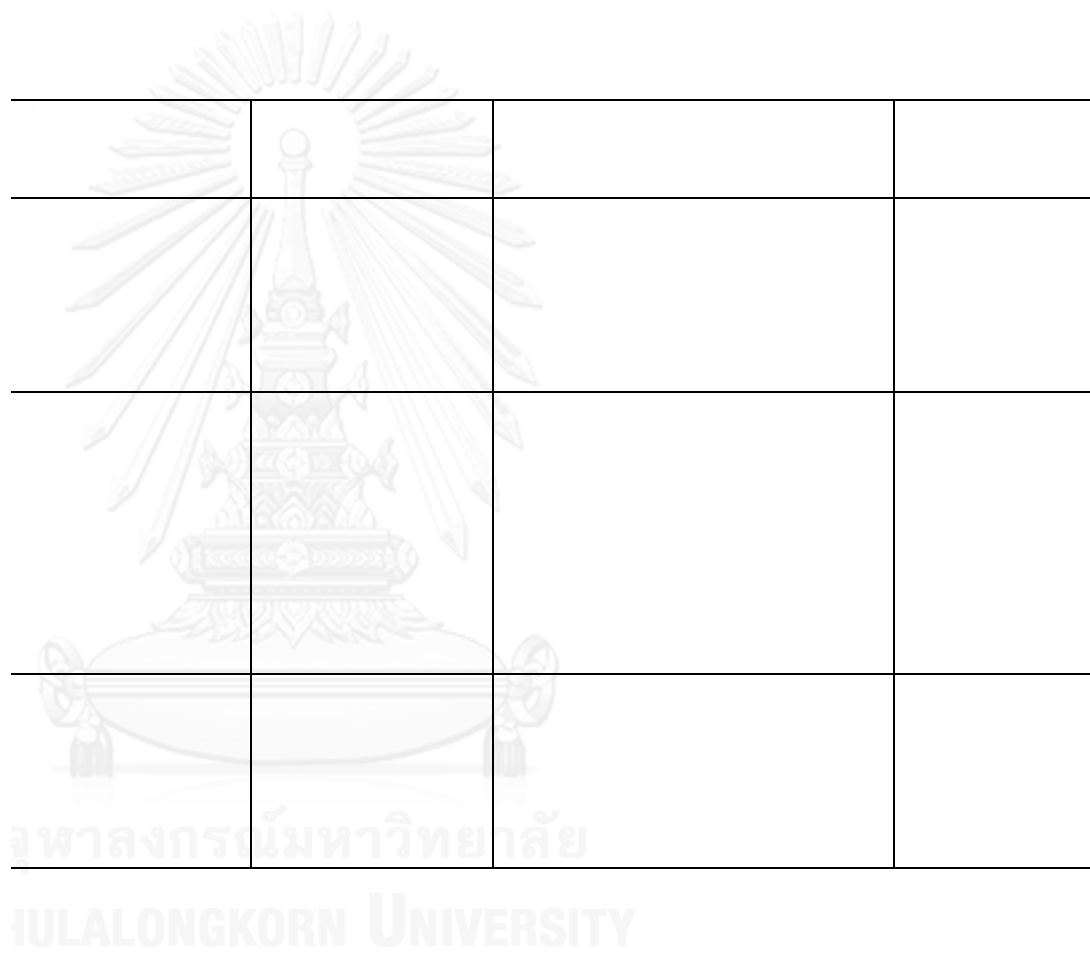
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ 4.1 (ต่อ) แสดงข้อมูลต่างๆของตัวอย่างสโตรมที่เก็บจากสถานีวิจัยและฝึกอบรมวนเกษตรตราด

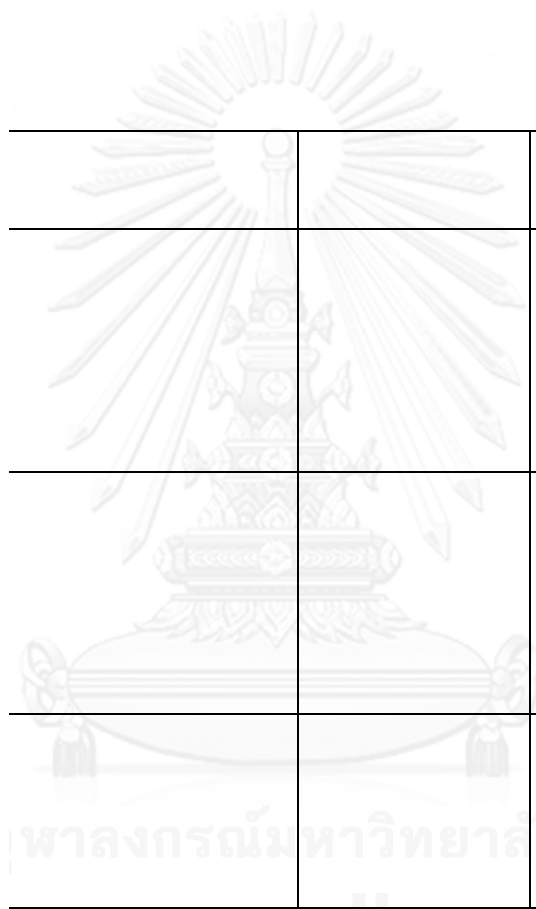
ตารางที่ 4.1 (ต่อ) แสดงข้อมูลต่างๆของตัวอย่างสัตว์มาจากสถานีวิจัยและฝึกอบรมวงเกษตรตราด



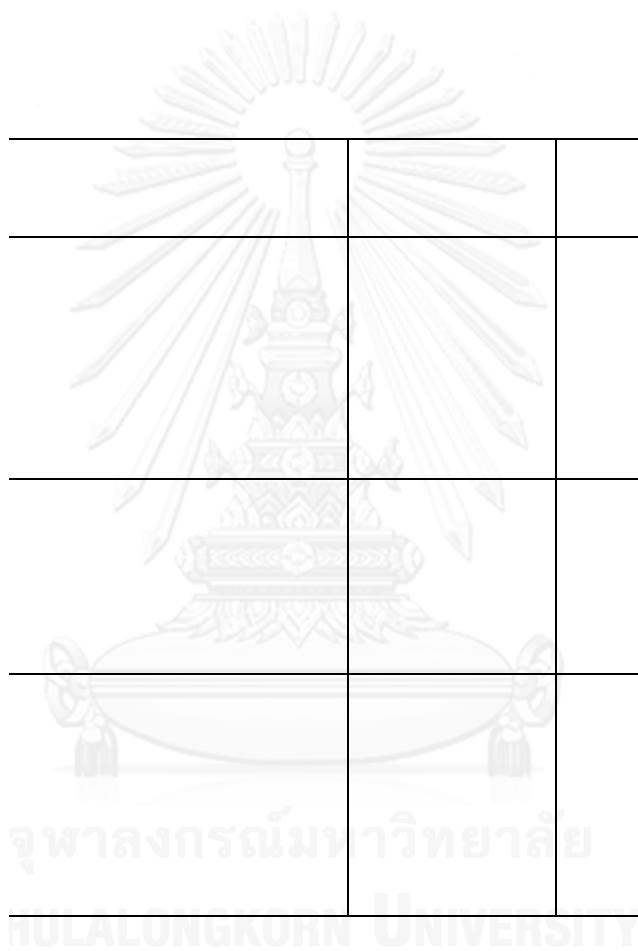
ตารางที่ 4.1 (ต่อ) แสดงข้อมูลต่างๆของตัวอย่างสโตรมาที่เก็บจากสถานีวิจัยและฝักอบรมวนเกษตรตราด



ตารางที่ 4.1 (ต่อ) แสดงข้อมูลต่างๆของตัวอย่างสีที่เก็บจากสถานีวิจัยและฝึกลอบรรณวนเกษตรตราด



ตารางที่ 4.1 (ต่อ) แสดงข้อมูลต่างๆของตัวอย่างสตรีตมาที่เก็บจากสถานีวิจัยและฝึกอบรมรวมเกษตรชาติ

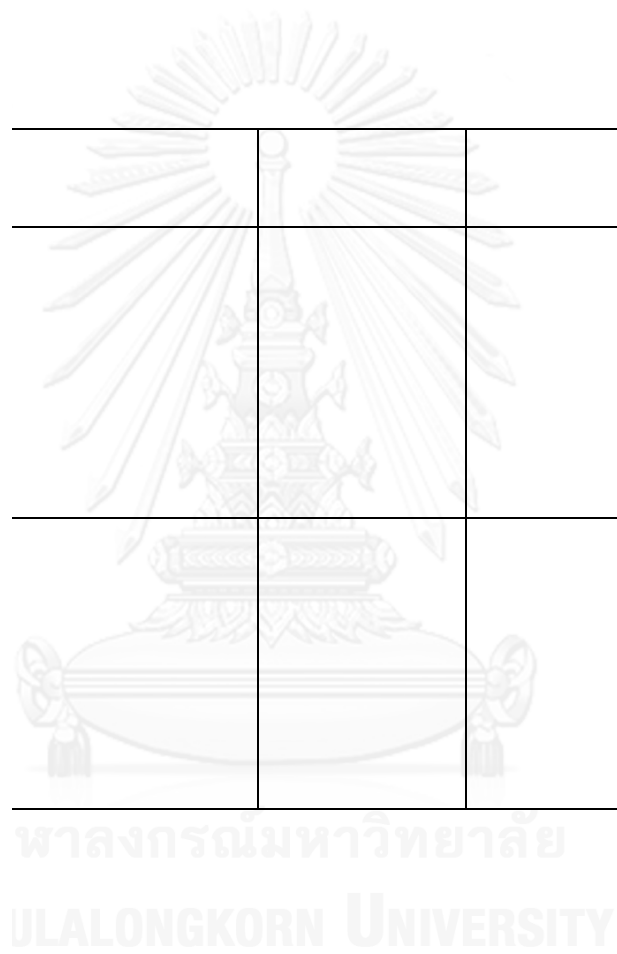


ตารางที่ 4.1 (ต่อ) แสดงข้อมูลต่างๆของตัวอย่างสัตรมที่เก็บจากสถานีวิจัยและฝึกอบรมรวมนเกษตรตราด

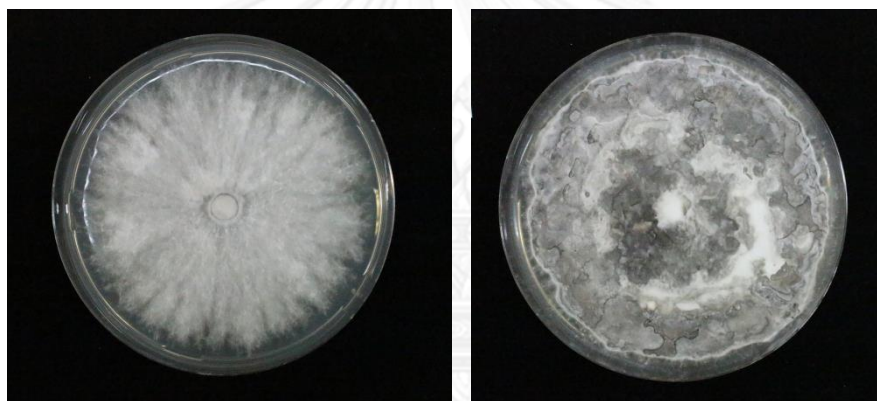
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

HULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ 4.1 (ต่อ) แสดงข้อมูลต่างๆของตัวอย่างสโตรมาที่เก็บจากสถานีวิจัยและฝึกอบรมวนเกษตรตราด



แยกเส้นใย *Xylaria* spp. โดยการใช้เทคนิค spore shooting ส่วนตัวอย่างที่ไม่สามารถแยกได้ด้วยวิธี spore shooting ได้นำมาแยกโดยการใช้ใบมีดผ่าตัดที่ปราศจากเชื้อตัดผิวของสโตรมา ออกแล้วใช้เข็มเย็บที่ปราศจากเชื้อ เย็บเอาสปอร์ภายในเพอริทีเซียมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ สเตอริโอไมโครสโคปออกมาวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 5-7 วัน จนกระทั่งพบการงอกของสปอร์และการเจริญของเส้นใย จากการเพาะเลี้ยง *Xylaria* spp. ทั้งหมด 27 ไอโซเลต พบว่า *Xylaria* spp. ในงานเพาะเลี้ยงจะมีเส้นใยสีขาว และเมื่อเส้นใยมีอายุมากขึ้นเส้นใยอาจเปลี่ยนเป็นสีเข้มขึ้น บางไอโซเลตมีการรวมตัวของเส้นใยอัดกันแน่นเพื่อเตรียมตัวเข้าสู่ระยะ telomorph แสดงดังรูปที่ 4.27



(1)

(2)



(3)

รูปที่ 4.27 แสดงลักษณะของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR30 ในอาหารแข็งและอาหารเหลว (1) ลักษณะเส้นใยของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR30 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เมื่ออายุ 10 วัน (2) ลักษณะเส้นใยของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR30 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เมื่ออายุ 30 วัน (3) ลักษณะเส้นใยอัดกันแน่นเพื่อเตรียมตัวเข้าสู่ระยะ telomorph บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MEB

4.2 การเลี้ยง *Xylaria* spp. ในอาหารเหลวและการสกัด

เลี้ยง *Xylaria* spp. ในอาหารเหลว MEB เป็นระยะเวลา 30 วัน ที่อุณหภูมิห้องภายใต้สภาวะอยู่กับที่ นำส่วนของน้ำเลี้ยงรามาสกัดด้วยเอทิลเอซีเตตอัตราส่วน 1:1 และสกัดส่วนของเส้นใยด้วยเมทานอล จากนั้นนำไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยแห้งสุญญากาศแบบหมุน (rotary vacuum evaporator) และชั่งน้ำหนักส่วนสกัดหยาบดังแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 แสดงน้ำหนักแห้งของส่วนสกัดหยาบที่สกัดจากน้ำหมักซึ่งสกัดด้วยเอทิลเอซีเตตและสกัดจากเส้นใยด้วยเมทานอลของ *Xylaria* spp.

รหัส <i>Xylaria</i> sp. ไอโซเลต	น้ำหนักแห้งของส่วนสกัด หยาบจากน้ำหมัก (มิลลิกรัม)	น้ำหนักแห้งของส่วนสกัด หยาบจากเส้นใย (มิลลิกรัม)
TR01	35.3	177.3
TR02/1	18.2	85.4
TR02/3	18.5	132.4
TR03/1	66.0	317.6
TR04	75.2	144.0
TR05	178.4	122.3
TR08	42.3	304.2
TR09X	56.5	104.7
TR15	128.3	140.4
TR17	16.8	345.8
TR20	42.0	300.6
TR23	79.2	143.8
TR25	33.3	353.7
TR28	35.8	191.7
TR30	59	308.7
TR31	110.7	144.9
TR32	33.3	80.1
TR34	44.8	132.9

ตารางที่ 4.2 (ต่อ) แสดงน้ำหนักแห้งของส่วนสกัดหยาบที่สกัดจากน้ำหมักซึ่งสกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ และสกัดจากเส้นใยด้วยเมทานอลของ *Xylaria* spp.

รหัส <i>Xylaria</i> sp. ไอโซเลต	น้ำหนักแห้งของส่วนสกัด หยาบจากน้ำหมัก (มิลลิกรัม)	น้ำหนักแห้งของส่วนสกัดหยาบ จากเส้นใย (มิลลิกรัม)
TR36	32.7	120.4
TR42	69.1	160.3
TR45	145.6	122.8
TR47	24.8	208.0
TR48	21.4	175
TR49A	75.5	56.9
TR51	86.8	268.6
TR54H	100.7	306.1
TR55	36.1	210.7

4.3 การทดสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อ *Xylaria* spp.

4.3.1 ทดสอบประสิทธิภาพของส่วนสกัดหยาบในการยับยั้งจุลินทรีย์

นำส่วนสกัดหยาบมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ซึ่งจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบมี 5 สายพันธุ์ โดยแบ่งเป็น

แบคทีเรียแกรมบวก 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bacillus subtilis* ATCC6633 และ *Staphylococcus aureus* ATCC6538-P

แบคทีเรียแกรมลบ 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Escherichia coli* ATCC8739 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027

ยีสต์ ได้แก่ *Candida albicans* ATCC 10231

4.3.1.1 การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบด้วยวิธี paper disc diffusion methods

การทดสอบประสิทธิภาพของส่วนสกัดหยาบที่สกัดจากน้ำเลี้ยง *Xylaria* spp. ในการยับยั้งจุลินทรีย์ด้วยวิธี paper disc diffusion จะวัดขนาดความกว้างของบริเวณวงใส

จากการทดสอบพบว่าส่วนสกัดหยาบที่สกัดจากน้ำเลี้ยงราจำนวน 7 ไอโซเลต ซึ่งได้แก่ TR15, TR23, TR28, TR30, TR31, TR34 และ TR54H มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบแกรมบวก (*Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus*) ส่วนสกัดหยาบจำนวน 2 ไอโซเลตซึ่งได้แก่ TR15 และ TR31 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ (*Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa*) และส่วนสกัดหยาบไอโซเลต TR01 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งยีสต์ (*Candida albicans*) ดังได้แสดงในตารางที่ 4.3 และส่วนสกัดหยาบที่สกัดจากเส้นใย *Xylaria* spp. มีเพียงส่วนสกัดหยาบไอโซเลต TR09X ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบแกรมบวก (*Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus*) เท่านั้นซึ่งได้แสดงในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.3 แสดงประสิทธิภาพของส่วนสกัดหยาบที่สกัดจากน้ำเลี้ยง *Xylaria* spp. เข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ

ไอโซเลต	จุลินทรีย์ทดสอบ				
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
รหัส <i>Xylaria</i> sp.					
TR01	0	+	0	+++	++
TR02/1	0	0	0	+	0
TR02/3	0	0	0	++	0
TR03/1	0	0	0	++	0
TR04	0	0	0	++	0
TR05	0	0	0	+	0
TR08	+	0	0	++++	0
TR09X	0	+	0	++	0
TR15	+	+++	++	++++	0
TR17	0	++	0	++	0
TR20	0	+	0	+++	0
TR23	0	+	+	+++	0
TR25	0	++	0	++	0

ตารางที่ 4.3 (ต่อ) แสดงประสิทธิภาพของส่วนสกัดหยาบที่สกัดจากน้ำเลี้ยง *Xylaria* spp. เข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ

รหัส <i>Xylaria</i> sp. ไอโซเลต	จุลินทรีย์ทดสอบ				
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
TR28	0	+	+	+++	0
TR30	+	++	++	+++	0
TR31	+	+++	+++	++++	0
TR32	0	+	0	+	0
TR34	0	++	+	+++	0
TR36	0	++	+	+	0
TR42	0	++	+	++	0
TR45	0	+	0	+	0
TR47	0	++	0	+	+
TR48	0	++	0	++	0
TR49A	+	++	0	++	0
TR51	+	++	+	++	0
TR54H	0	++	++	+++	+
TR55	0	0	0	+	0
Streptomycin	++++	++++	++++	++++	ND
Nystatin	ND	ND	ND	ND	++++
DMSO	0	0	0	0	0

หมายเหตุ

- 0 ไม่มีบริเวณวงใส
 + บริเวณวงใสกว้าง 1 - 3 มิลลิเมตร
 ++ บริเวณวงใสกว้าง 4 - 6 มิลลิเมตร
 +++ บริเวณวงใสกว้าง 7 - 9 มิลลิเมตร
 ++++ บริเวณวงใสกว้าง 10 มิลลิเมตรหรือมากกว่า
 ND ไม่ได้ทดสอบ
 Streptomycin เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
 Nystatin เข้มข้น 100 หน่วยต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 4.4 แสดงประสิทธิภาพของส่วนสกัดหยาบที่สกัดจากเส้นใย *Xylaria* spp. เข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ

รหัส <i>Xylaria</i> sp. ไอโซเลต	จุลินทรีย์ทดสอบ				
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
TR01	0	0	0	0	0
TR02/1	0	0	0	0	0
TR02/3	+	0	0	0	0
TR03/1	0	0	+	0	0
TR04	+	0	+	0	0
TR05	0	0	+	0	0
TR08	0	0	+	+	0
TR09X	0	0	++	++	0
TR15	0	0	+	0	0
TR17	0	0	0	0	0
TR20	0	0	0	0	0
TR23	0	0	+	0	0
TR25	0	0	+	0	0
TR28	0	0	0	0	0
TR30	0	0	0	0	0
TR31	0	0	0	0	0
TR32	0	0	0	0	0
TR34	0	0	+	0	+
TR36	0	0	0	0	0
TR42	0	0	0	0	+
TR45	0	0	0	0	0
TR47	0	0	0	0	0
TR48	+	0	+	0	0

ตารางที่ 4.4 (ต่อ) แสดงประสิทธิภาพของส่วนสกัดหยาบที่สกัดจากเส้นใย *Xylaria* spp. เข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ

รหัส <i>Xylaria</i> sp. ไอโซเลต	จุลินทรีย์ทดสอบ				
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
TR49A	+	0	+	0	0
TR51	0	0	0	0	0
TR54H	0	0	0	0	0
TR55	0	0	0	0	0
Streptomycin	++++	++++	++++	++++	ND
Nystatin	ND	ND	ND	ND	++++
DMSO	0	0	0	0	0

หมายเหตุ	0	ไม่มีบริเวณวงใส
	+	บริเวณวงใสกว้าง 1 - 3 มิลลิเมตร
	++	บริเวณวงใสกว้าง 4 - 6 มิลลิเมตร
	+++	บริเวณวงใสกว้าง 7 - 9 มิลลิเมตร
	++++	บริเวณวงใสกว้าง 10 มิลลิเมตรหรือมากกว่า
	ND	ไม่ได้ทดสอบ
		Streptomycin เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
		Nystatin เข้มข้น 100 หน่วยต่อมิลลิลิตร

4.3.1.2 การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบด้วยวิธี *minimal inhibitory concentration (MIC)*

คัดเลือก *Xylaria* spp. ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบที่ดีที่สุดจำนวน 9 ไอโซเลตโดยเป็นส่วนสกัดหยาบที่สกัดจากน้ำเลี้ยง *Xylaria* จำนวน 8 ไอโซเลตซึ่งได้แก่ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR01, TR15, TR23, TR28, TR30, TR31, TR34 และ TR54H อีก 1 ไอโซเลตเป็นส่วนสกัดหยาบที่สกัดจากเส้นใย *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR09X เพื่อมาทดสอบหาความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ (MIC) โดยเจือจางความเข้มข้นให้อยู่ในช่วง 0.5 - 256 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากการทดสอบพบว่าส่วนสกัดหยาบที่ถูกคัดเลือกทั้ง 9 ไอ

โชนิต มีค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบมากกว่า 265 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตรโดยได้แสดงดังตารางที่ 4.5 ตารางที่ 4.5 แสดงค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ (MIC) ของส่วนสกัดหยาบของ *Xylaria* จำนวน 9 โชนิต

รหัส <i>Xylaria</i> sp. โชนิต	ค่า MIC ของส่วนสกัดหยาบที่ยับยั้ง การเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ (ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร)
TR01	> 256
TR15	> 256
TR23	> 256
TR28	> 256
TR30	> 256
TR31	> 256
TR34	> 256
TR54H	> 256
TR09X	> 256

4.3.2 ทดสอบประสิทธิภาพของส่วนสกัดหยาบของ *Xylaria* ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง

นำส่วนสกัดหยาบที่ถูกคัดเลือกจำนวน 9 โชนิต มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งซึ่งได้แก่ CaSki, SiHa, A375, Jurkat ด้วยวิธี MTT พบว่า 3 โชนิต มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปากมดลูก CaSki ซึ่งได้แก่ *Xylaria* sp. โชนิต TR01, TR30 และ TR34 โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 8.30 ± 0.85 , 10.01 ± 1.57 และ 7.79 ± 0.69 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร ตามลำดับ 3 โชนิต มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปากมดลูก SiHa ซึ่งได้แก่ *Xylaria* sp. โชนิต TR01, TR28 และ TR34 โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 33.30 ± 0.39 , 32.76 ± 3.96 และ 24.81 ± 0.36 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตรตามลำดับ 3 โชนิต มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งผิวหนัง A375 ซึ่งได้แก่ *Xylaria* sp. โชนิต TR

01, TR28 และ TR34 โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 11.00 ± 2.12 , 8.05 ± 0.39 และ 9.47 ± 0.46 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ และ TR34 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว Jurkat โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 21.34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ดังได้แสดงในตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 แสดงประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบของ *Xylaria* spp. จำนวน 10 ตัวอย่างในการยับยั้งเซลล์มะเร็งทดสอบ 4 ชนิดด้วยวิธี MTT

Isolates Number	IC_{50} ของการยับยั้งเซลล์มะเร็งทดสอบ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)			
	CaSki	SiHa	A375	Jurkat
TR01	8.30 ± 0.85	33.30 ± 0.39	11.00 ± 2.12	0
TR15	0	0	0	0
TR23	0	0	0	0
TR28	0	32.76 ± 3.96	8.05 ± 0.39	0
TR30	10.01 ± 1.57	0	0	0
TR31	0	0	0	0
TR34	7.79 ± 0.69	24.81 ± 0.36	9.47 ± 0.46	21.34
TR54H	0	0	0	0
TR09X	0	0	0	0

หมายเหตุ 0 = ไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งทดสอบ

CaSki = มะเร็งปากมดลูก (Human papilloma virus positive cervical cancer cell line)

SiHa = มะเร็งปากมดลูก (Human papillomavirus type 16 (HPV16) positive cervical cancer cells)

A375 = มะเร็งผิวหนัง (Human malignant melanoma)

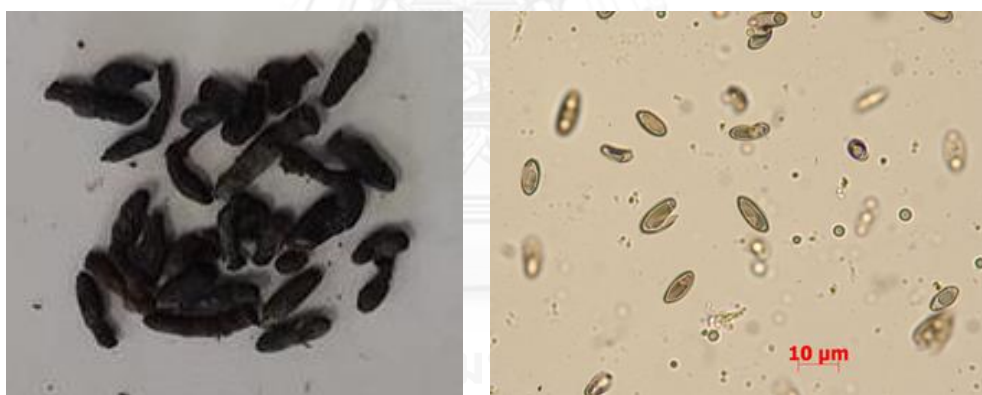
Jurkat = มะเร็งเม็ดเลือดขาว (Human acute T-cell leukemia)

จากผลการทดสอบในตารางที่ 4.6 จึงได้คัดเลือก *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR 30 เพื่อนำมาพิสูจน์เอกลักษณ์ทางสัณฐานวิทยา ลักษณะทางอนุชีววิทยา และพิสูจน์โครงสร้างสารที่ได้จากส่วนสกัดหยาบ TR 30 เนื่องจาก *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR 30 สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปากมดลูก CaSki ได้อย่างจำเพาะ

4.4 พิสูจน์เอกลักษณ์โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางพันธุกรรมด้วยวิธีทางอนุชีววิทยาของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR30

4.4.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR30 ดังแสดงในตารางที่ 4.1 พบว่า *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR30 น่าจะเป็น *Xylaria badia*

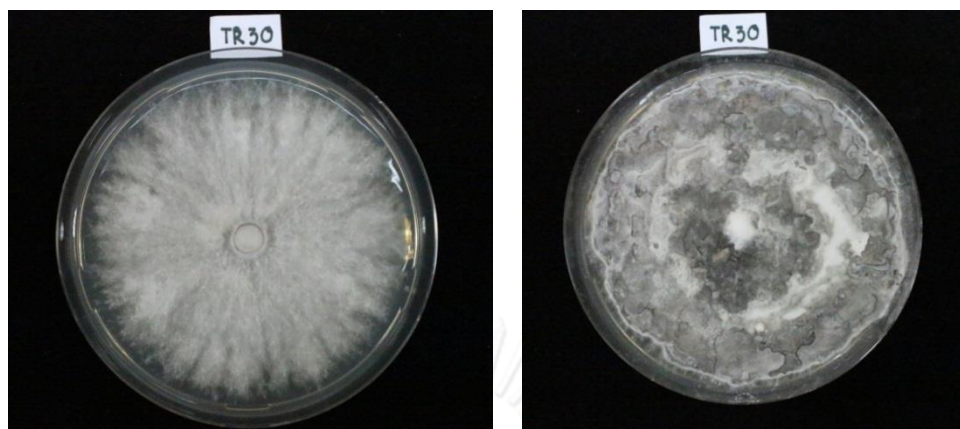


(1)

(2)

รูปที่ 4.28 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาและแอสโคสปอร์ของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR30

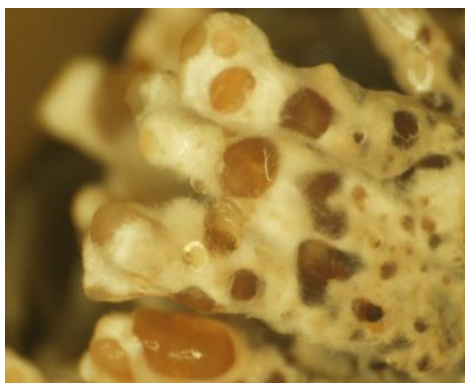
(1) สัณฐานวิทยา *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR30 (2) แอสโคสปอร์ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR30



รูปที่ 4.29 แสดงลักษณะเส้นใยของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR30 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (1) ลักษณะเส้นใยเมื่อเวลาผ่านไป 10 วัน (2) ลักษณะเส้นใยเมื่อเวลาผ่านไป 30 วัน



รูปที่ 4.30 แสดงลักษณะเส้นใยของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR30 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MEB เมื่ออายุ 30 วัน



รูปที่ 4.31 แสดงลักษณะของ *Xylaria* sp. ไฮโซเลต TR30 เส้นใยที่อัดกันแน่นเพื่อเตรียมตัวเข้าสู่ระยะ telomorph ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอไมโครสโคป

4.4.2 การศึกษาลักษณะทางอนุชีววิทยา

ผลจากการเพิ่มจำนวน DNA บริเวณ ITS1 – 5.8S ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสได้ขนาดสั้น DNA ที่มีขนาดเท่ากับ 583 คู่เบส ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้

```
5'CCAAAGCGAAGAGGAGGACTTACAGAGTTCTATAACTCCCAAACCCATGTGCACATACCGTA
CGTTGCCTCGGCAGGCGGCCTACCCCGTAGCGCCCTACACCCGGTAGGGCCTGCCCGGTGG
ACGCCGACAAAGCCTGCCGGCGGCCCTGAAAATTCTGTTTCTTACTGGATCTCTGAACATATA
CCAAAATACGTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCG
AAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGC
GCCATTAGTATTCTAGTGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTTAAGCCCCTGTTGC
TTAGCGTTGGGAGCCTACCGTCACACGTAGCTCCTGAAAAGTAGTGGCGGAGTCGGTTTCTACT
CTAGACGTAGTAAATTCTATCTCGCCTATCAGTAGGACCGGTCCCTCGCCGTAAAACCCCCCT
ATACTTTAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGC
cGGAGGAAA 3'
```

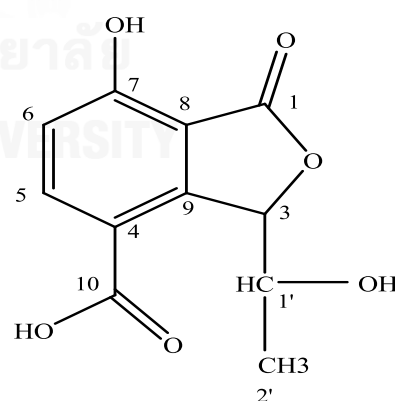
เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปเทียบกับฐานข้อมูล GenBank แล้วพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับ *Xylaria badia* (GU322446.1) ซึ่งมีค่า % identity เท่ากับ 99 %

4.5 พิสูจน์เอกลักษณ์โครงสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR 30

นำ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR30 มาเลี้ยงในอาหาร MEB ปริมาตร 30 ลิตรที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 วันภายใต้สภาวะอยู่กับที่ จากนั้นนำส่วนน้ำเลี้ยงรามาสกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ในอัตราส่วน 1:1 เมื่อได้สารละลายของส่วนสกัดที่เข้มข้นขึ้นก็ตั้งทิ้งไว้พบว่ามีส่วนที่เป็นตะกอนของแข็งจึงแยกส่วนตะกอนมาสกัดซ้ำด้วยเอทิลแอลกอฮอล์และกรอง นำส่วนที่ละลายเอทิลแอลกอฮอล์ไประเหยซ้ำจนได้ส่วนสกัดหยาบส่วนที่ 1 (TR30N1) เป็นส่วนสกัดหยาบสีเข้ม มีความชื้นหนืด น้ำหนัก 19.50 กรัม ส่วนตะกอนที่ไม่ละลายในเอทิลแอลกอฮอล์ ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งได้สารสกัดส่วนที่ 2 (TR30N2) ซึ่งมีลักษณะเป็นตะกอนสีน้ำตาลเทาเข้ม น้ำหนัก 0.55 กรัม นำ TR30N2 ไปวิเคราะห์ NMR, MS, IR (ภาคผนวก ก) พบว่าเป็นสาร 4-carboxy-7-hydroxy-3-(1-hydroxyethyl)-3H-isobenzofuran-1-one ซึ่งเป็นสารบริสุทธิ์ชนิดใหม่ที่ยังไม่เคยถูกรายงาน มีโครงสร้างดังรูปที่ 4.31 และทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์และเซลล์มะเร็งปากมดลูก CaSki พบว่า TR30N1 สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ด้วยวิธี paper disc diffusion methods (ตารางที่ 4.9) และด้วยวิธี agar well diffusion methods (ตารางที่ 4.10) ได้และสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งปากมดลูก CaSki (ตารางที่ 4.11) ได้เช่นกัน ส่วนสารบริสุทธิ์ TR30N2 ไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งทั้งจุลินทรีย์และเซลล์มะเร็งปากมดลูก CaSki



(1)



(2)

รูปที่ 4.32 แสดง (1) ลักษณะสาร TR30N2 (2) ลักษณะโครงสร้างของ TR30N2

ตารางที่ 4.7 แสดงข้อมูลของสาร TR 30N2

ตำแหน่ง	δ_C	δ_H	HMBC
1	171.5		
1'	67.2	4.59 (qd, $J = 6.5, 0.6$ Hz, 1H)	C2',C3,C9
2			
2'	20.9	1.45 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H)	C1',C3
3	86.7	5.75 (s, 1H)	C1,C4,C8,C9,C2'
4	118.2		
5	139.6	8.15 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H)	C3,C7,C9,C10
6	117.1	6.94 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H)	C1,C4,C7,C8
7	161.8		
8	114.7		
9	154		
10	167.8		

เนื่องจากส่วนสกัดหยาบ TR30N1 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบและเซลล์มะเร็งปากมดลูก CaSki จึงนำส่วนสกัดหยาบ TR30N1 มาแยกสารโดยใช้เทคนิค TLC และโครมาโทกราฟีชนิดคอลัมน์ โดยสารที่ใช่เป็นตัวชะ ได้แก่ เฮกเซน เอทิลแอสิตเตต และเมทานอล ซึ่งมีอัตราส่วนดังตาราง 4.8 โดยเก็บลำดับส่วนทุกๆ 50 มิลลิลิตร

ตารางที่ 4 8 แสดงอัตราส่วน ปริมาตรของตัวชะ การรวมลำดับส่วน และน้ำหนักแห้งของลำดับส่วน Xy1-Xy11 ที่แยกจากส่วนสกัดหยาบของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR30

ตัวชะ	ปริมาตร (มิลลิลิตร)	ลำดับส่วน	รหัสลำดับส่วน	น้ำหนักแห้ง (กรัม)
100% H	500	1-10	-	
10% EH	1,000	11-20	Xy1	4.10
		21-30		
20%EH	1,000	31-32	Xy2	0.30
		33-50		
30%EH	2,000	51-54	Xy3	0.96
		55-90		
40%EH	1,650	92-100	Xy4	0.85
		101-123		
50%EH	1,500	124-152	Xy5	1.77
		153	Xy6	0.74
60%EH	1,500	154-182	Xy7	0.41
		183		
70%EH	1,500	184-195	Xy8	0.84
		196-210		
		211-213		
80%EH	1,500	214-243	Xy9	1.85
90%EH	1,500	244-273		
100%EH	1,500	274-275		
		276-303	Xy10	4.28
20%ME	1,500	304	Xy11	0.95
		305-330		
		331-333		

ตารางที่ 4.8 (ต่อ) แสดงอัตราส่วน ปริมาตรของตัวชะ การรวมลำดับส่วน และน้ำหนักแห้งของลำดับส่วน Xy1-Xy11 ที่แยกจากส่วนสกัดหยาบของ *Xylaria* sp.ไอโซเลต TR30

ตัวชะ	ปริมาตร (มิลลิลิตร)	ลำดับส่วน	รหัสลำดับส่วน	น้ำหนักแห้ง (กรัม)
40%ME	1,500	334-363	-	0
60%ME	1,500	364-393	-	0
80%ME	1,000	394-413	-	0
100%M	2,000	414-415	-	0

หมายเหตุ - ไม่พบสารบน TLC จึงไม่นำมารวมลำดับส่วน
 O ไม่ได้ชั่งน้ำหนัก
 H เฮกเซน
 EH เอทิลแอสซิเตตต่อเฮกเซน
 E เอทิลแอสซิเตต
 ME เมทานอลต่อเอทิลแอสซิเตต
 M เมทานอล

จากการแยกลำดับส่วนดังกล่าวแยกได้ทั้งหมด 11 ลำดับส่วน (fractions) คือ Xy1-Xy11 โดยมีน้ำหนักแห้งดังตารางที่ 4.8 เมื่อนำทั้ง 11 ลำดับส่วนมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ด้วยวิธี paper disc diffusion methods (ตารางที่ 4.9) และ agar well diffusion methods (ตารางที่ 4.10) แล้ววัดขนาดบริเวณวงใส พบว่า การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ด้วย agar well diffusion methods มีขนาดของบริเวณวงใสกว้างกว่าการทดสอบด้วยวิธี paper disc diffusion methods เล็กน้อย อาจเนื่องมาจากสารละลายทดสอบในวิธี agar well diffusion methods สามารถแพร่กระจายไปบริเวณข้างเคียงได้ดีกว่าจึงทำให้มีขนาดของบริเวณวงใสกว้างกว่าวิธี paper disc diffusion methods โดยลำดับส่วนรหัส Xy2, Xy3, Xy5 มีขนาดความกว้างของบริเวณวงใสค่อนข้างกว้างเมื่อเทียบกับลำดับส่วนอื่นๆ และเมื่อนำลำดับส่วน Xy1-Xy11 มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งปากมดลูก CaSki ด้วยวิธี MTT พบว่าลำดับส่วน Xy1 และลำดับส่วน Xy2 สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งปากมดลูก CaSki ได้ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 3.87 ± 0.49 และ 16.38 ± 7.58 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.11

ตารางที่ 4.9 แสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ 5 ชนิดด้วยวิธี paper disc diffusion methods ของลำดับส่วน Xy1-Xy11 เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่แยกจากส่วนสกัดหยาบของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR30

รหัสลำดับส่วน	ความกว้างของวงใส (มิลลิเมตร) ที่ยับยั้งการเจริญจุลินทรีย์ทดสอบ				
	<i>P.aeruginos</i>	<i>E.coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
TR30N1	0	0	0	0	0
TR30N2	0	0	0	0	0
Xy1	0	0	0	0	0
Xy2	9	10	5	7	0
Xy3	5	6	4	5	0
Xy4	4	5	1	0	0
Xy5	6	9	3	4	0
Xy6	3	5	1	3	0
Xy7	2	3	0	2	0
Xy8	0	0	0	0	0
Xy9	1	1	0	0	0
Xy10	0	0	0	0	0
Xy11	0	0	0	0	0
Streptomycin	19	24	20	19	ND
Nystatin	ND	ND	ND	ND	20
DMSO	0	0	0	0	0

หมายเหตุ 0 ไม่มีบริเวณวงใส
 ND ไม่ได้ทดสอบ
 Streptomycin เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
 Nystatin เข้มข้น 100 หน่วยต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 4.10 แสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ 5 ชนิดด้วยวิธี agar well diffusion methods ของลำดับส่วน Xy1-Xy11 เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่แยกจากส่วนสกัดหยาบของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR30

รหัสลำดับส่วน	ความกว้างของวงใส (มิลลิเมตร) ที่ยับยั้งการเจริญจุลินทรีย์ทดสอบ				
	<i>P.aeruginos</i>	<i>E.coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
TR30N1	2	2	4	3	0
TR30N2	0	0	0	0	0
Xy1	0	0	0	0	0
Xy2	13	13	9	13	0
Xy3	7	7	6	8	0
Xy4	5	5	5	6	0
Xy5	7	7	8	8	0
Xy6	5	4	6	6	0
Xy7	4	5	5	0	0
Xy8	0	1	2	0	0
Xy9	2	2	4	0	0
Xy10	0	0	0	0	0
Xy11	0	0	0	0	0
Streptomycin	28	29	25	24	ND
Nystatin	ND	ND	ND	ND	27
DMSO	0	0	0	0	0

หมายเหตุ 0 ไม่เกิดบริเวณวงใส
 ND ไม่ได้ทดสอบ
 Streptomycin เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
 Nystatin เข้มข้น 100 หน่วยต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 4.11 แสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งปากมดลูก CaSki ของลำดับส่วน Xy1-Xy11 ที่แยกจากส่วนสกัดหยาบของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR30

รหัสลำดับส่วน	IC ₅₀ (ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร)
TR30N1	10.13 ± 0.45
TR30N2	0
Xy1	3.87 ± 0.49
Xy2	16.38 ± 7.58
Xy3	0
Xy4	0
Xy5	0
Xy6	0
Xy7	0
Xy8	0
Xy9	0
Xy10	0
Xy11	0

หมายเหตุ 0 = ไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งปากมดลูก CaSki

บทที่ 5

สรุป และอภิปรายผลการทดลอง

สถานีวิจัยและฝึกอบรมรวมเกษตรตราด เป็นพื้นที่ในเขตจังหวัดตราดซึ่งป่าบริเวณนี้เป็นพื้นที่ป่าดิบแล้ง มีสภาพภูมิอากาศแบบร้อนชื้นมีปริมาณน้ำฝนค่อนข้างสูง (อนุชา และ สคาร, 2554) ซึ่งเหมาะต่อการเจริญของรา *Xylaria* จากการได้สำรวจเก็บตัวอย่างรา *Xylaria* ในบริเวณพื้นที่นี้พร้อมทั้งนำมาคัดแยกแอสโคสปอร์โดยวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เพื่อให้งอกเป็นเส้นใยและทำการ subculture จำนวน 27 ไอโซเลต พบว่าเส้นใยราเจริญเริ่มต้นเป็นเส้นใยสีขาว จากนั้นอาจเปลี่ยนเป็นสีที่เข้มขึ้น บางไอโซเลตยังสร้างเม็ดสีบนเส้นใยและอาจเจริญเป็นเส้นใยที่อัดกันแน่นเพื่อเตรียมเข้าสู่ระยะ telomorph

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงราในอาหารเหลว MEB แล้วนำส่วนของน้ำเลี้ยงรามาสกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์และสกัดเส้นใยด้วยเมทานอล พบว่าได้ส่วนสกัดหยาบที่มีสีเหลืองไปจนถึงสีน้ำตาลเข้ม เมื่อนำส่วนสกัดหยาบที่ได้ไปทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ 5 ชนิดซึ่งได้แก่ *Bacillus subtilis* ATCC6633, *Staphylococcus aureus* ATCC6538-P, *Escherichia coli* ATCC8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027 และ *Candida albicans* ATCC 10231 พบว่า ส่วนสกัดหยาบที่สกัดจากน้ำเลี้ยงราสามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้อย่างน้อย 1 ชนิด และยับยั้ง *S. aureus* ATCC6538-P ได้มากที่สุด โดยมี TR15 TR30 TR31 และ TR51 สามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้ทุก นอกจากนี้ส่วนสกัดหยาบที่สกัดจากน้ำเลี้ยงราสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีกว่าส่วนสกัดหยาบที่สกัดจากเส้นใยและยับยั้งแบคทีเรียได้ดีกว่ายีสต์ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในงานวิจัยของ Khajadpai (2012) ส่วนสกัดหยาบของ *Xylaria* ส่วนใหญ่ในงานวิจัยนี้ ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Candida albicans* ได้หรือยับยั้งได้น้อยมาก แต่อย่างไรก็ตามยังมีรายงานการยับยั้งเชื้อ *Candida albicans* จากสารที่ผลิตจาก *Xylaria* เช่น *Xylaria multiplex* BCC 1111 สร้างสาร Multiplolides A และ B (Boonphong และคณะ, 2001) และเชื้อ *Xylaria* sp. PSU-D14 สร้าง

สาร sordaricin ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *Candida albicans* (Pongcharoen และคณะ, 2008)

จากนั้นทำการคัดเลือกสารสกัดหยาบของ *Xylaria* sp. ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีทั้งหมด 9 ไอโซเลต นำไปทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งทดสอบชนิดต่างๆ ซึ่งได้แก่ เซลล์มะเร็งปากมดลูก 2 ชนิดคือ CaSki และ SiHa, เซลล์มะเร็งผิวหนัง A375 และ เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว Jurkat พบว่าส่วนสกัดหยาบของ *Xylaria* spp. สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งปากมดลูก CaSki ได้ 3 ไอโซเลตได้แก่ ส่วนสกัดหยาบของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR01 TR30 และ TR34 เช่นเดียวกับกับรา เอนโดไฟท์ *Xylaria* X-17 ที่สามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งปากมดลูก CaSki (Khajadpai, 2012) ส่วนสกัดหยาบของ *Xylaria* spp. สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งปากมดลูก SiHa ได้ 3 ไอโซเลตได้แก่ ส่วนสกัดหยาบของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR01 TR28 และ TR34 ส่วนสกัดหยาบของ *Xylaria* spp. สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งผิวหนัง A375 ได้ 3 ไอโซเลตได้แก่ ส่วนสกัดหยาบของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR01 TR28 และ TR34 และส่วนสกัดหยาบของ *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR34 เป็นเพียงไอโซเลตเดียวที่สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว Jurkat ได้

จะเห็นได้ว่ารา *Xylaria* สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆได้ เช่น *Xylaria polymorpha* สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพซึ่งสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ (Shiono และคณะ, 2009) *Xylaria hypoxylon* AT-028 สร้างสาร Xylariol A และ B สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งตับ Hep G2 ได้ (Gu และ Ding, 2008) เช่นเดียวกับงานวิจัยนี้ *Xylaria* spp. สามารถสร้างสารที่ยับยั้งเซลล์มะเร็งเซลล์ปากมดลูก เซลล์มะเร็งผิวหนัง และเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวได้ โดยแต่ละสายพันธุ์อาจสร้างสารที่ยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ต่างกันหรือเหมือนกัน

เนื่องด้วย *Xylaria* ไอโซเลต TR 30 สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้เพียงชนิดเดียวคือ เซลล์มะเร็งปากมดลูก CaSki แสดงให้เห็นว่า *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR30 สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งปากมดลูก CaSki ได้อย่างจำเพาะเจาะจงโดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 10.01 ± 1.57 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

จึงได้คัดเลือก *Xylaria* ไอโซเลต TR30 มาศึกษาลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยา อณูชีววิทยา และ ศึกษาศาสตร์ประกอบของส่วนสัณฐานที่สกัดจาก *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR30

โดยในงานวิจัยนี้พบว่า *Xylaria* ไอโซเลต TR 30 เป็นไอโซเลตเดียวที่สามารถยับยั้ง เซลล์มะเร็งปากมดลูก CaSki ได้เพียงชนิดเดียว แสดงให้เห็นว่า *Xylaria* ไอโซเลต TR30 สามารถ ยับยั้งเซลล์มะเร็งปากมดลูก CaSki ได้อย่างจำเพาะโดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 10.01 ± 1.57 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร จึงได้คัดเลือก *Xylaria* ไอโซเลต TR30 มาศึกษาลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยา อณูชีววิทยา และ ศึกษาโครงสร้างทางเคมีของส่วนสัณฐานที่สกัดจาก *Xylaria* ไอโซเลต TR30

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาพร้อมทั้งยืนยันการจำแนกด้วยวิธีอณูชีววิทยาโดย ศึกษาบริเวณ ITS และนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พร้อมทั้งนำไปเทียบกับฐานข้อมูล GenBank พบว่า *Xylaria* sp. ไอโซเลต TR30 คือ *Xylaria badia* (GU322446.1) ซึ่งมีค่า % identity เท่ากับ 99%

จากการศึกษาลักษณะโครงสร้างสารที่ผลิตจาก *Xylaria badia* TR30 พบว่าสารบริสุทธิ์ที่ได้ คือ 4-carboxy-7-hydroxy-3-(1-hydroxyethyl)-3H-isobenzofuran-1-one เป็นสารที่ไม่มีฤทธิ์ ในการยับยั้งทั้งจุลินทรีย์ทดสอบและเซลล์มะเร็งปากมดลูก CaSki อย่างไรก็ตามเมื่อนำไปเทียบกับ ฐานข้อมูล ScienceFinder พบว่าเป็นสารซึ่งไม่เคยมีการรายงานมาก่อน ถึงแม้สารดังกล่าวนี้เป็น สารที่ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งทั้งจุลินทรีย์ทดสอบและเซลล์มะเร็งปากมดลูก CaSki ก็ตาม แต่ก็เป็นที่ น่าสนใจที่จะนำไปศึกษาประสิทธิภาพในด้านอื่นๆต่อไป

สาร 4-carboxy-7-hydroxy-3-(1-hydroxyethyl)-3H-isobenzofuran-1-one เป็นสารที่ มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับสารกลุ่ม Ochracein และ Xylaral ซึ่งเป็นสารที่ถูกผลิตโดย Xylariaceae (Whalley และ Edwards, 1998)

นอกจากนี้ยังมีลำดับส่วนอื่นๆ ที่แยกมาจากส่วนสัณฐานของ *Xylaria badia* TR30 ที่มี ฤทธิ์ในการยับยั้งคือ ลำดับส่วน Xy1 ยับยั้งเซลล์มะเร็งปากมดลูก CaSki ได้แต่ไม่ยับยั้งจุลินทรีย์ ทดสอบ ลำดับส่วน Xy2 สามารถยับยั้งทั้งแบคทีเรียทดสอบและเซลล์มะเร็งปากมดลูก CaSki ได้ ลำดับส่วนทั้งสองนี้เป็นลำดับส่วนที่น่าสนใจที่จะนำไปศึกษาลักษณะโครงสร้างทางเคมีต่อไป ซึ่งอาจ

ทำให้พบสารชนิดใหม่หรือทราบโครงสร้างสารที่แน่ชัดของสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบ
และ/หรือเซลล์มะเร็งปากมดลูก CaSki ได้



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

รายการอ้างอิง

- เลขา มาโนช. ประโยชน์และโทษของราต่อมนุษย์ สัตว์ และพืช [ออนไลน์], ภาควิชาโรคพืชคณะ
เกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. แหล่งที่มา :
http://rdi.ku.ac.th/kufair50/plant/41_plant/41_plant.html. [23/01/2555]
- สถานีวิจัยและฝึกอบรมวนเกษตรตราด. แหล่งที่มา : http://www2.rdi.ku.ac.th/trad/?page_id=2
[22/7/2557]
- สุรางค์, เขียวหิรัญ. (2545). ความหลากหลายของเห็ดราวงศ์ Xylariaceae ในพื้นที่อุทยานแห่งชาติ
ดอยอินทนนท์. *รายงานการประชุมวิชาการป่าไม้ ประจำปี 2545*: 13-22.
- อนุชา, ทะรา และ สคาร ทีจันติก. (2554). ลักษณะเชิงปริมาณของสังคัมพีชป่าดิบแล้งเสื่อมโทรม
ภายหลังการทำสัมปทานป่าไม้จังหวัดตราด. *เรื่องเตรียมการประชุมทางวิชาการของ
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 49: สาขาทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม.*, หน้า 54-
61 (234 หน้า).กรุงเทพฯ.
- Boonphong, S., Kittakoop, P., Isaka, M., Pittayakhajonwut, D., Tanticharoen, M., &
Thebtaranonth, Y. (2001). Multiplolides A and B, New Antifungal 10-Membered
Lactones from *Xylaria multiplex*. *Journal of natural products*, 62, 965-967.
- Boyanova, L., Gergova, G., Nikolov, R., Derejian, S., Lazarova, E., Katsarov, N., Mitov, I.,
and Krastev, Z. (2005). Activity of Bulgarian propolis against 94 *Helicobacter
pylori* strains *in vitro* by agar-well diffusion, agar dilution and disc diffusion
methods. *Journal of medical microbiology*, 54, 481-483.
- Eriksson, O. (1966). On *Anthostomella* Sacc., *Entosordaria* (Sacc.) Hohn. and some
related genera (*Pyrenomycetes*). *Svensk Botanisk Tidskrift*, 60, 315-324.
- Gu, W., & Ding, H. (2008). Two new tetralone derivatives from the culture of *Xylaria
hypoxylon* AT-028. *Chinese Chemical Letters*, 19(11), 1323-1326.

- Hawksworth, D. L., & Rossman, A. Y. (1997). Where are all the undescribed fungi? *Phytopathology*, *87*(9), 888-891.
- Healy, P. C., Hocking, A., Tran-Dinh, N., Pitt, J. I., Shivas, R. G., Mitchell, J. K. O., M., and Davis, R. A. (2004). Xanthones from a microfungus of the genus *Xylaria*. *Phytochemistry*, *65*(16), 2373-2378.
- Hsieh, H. M., Lin, C. R., Fang, M.-J., Rogers, J. D., Fournier, J., Lechat, C., & Ju, Y. M. (2010). Phylogenetic status of *Xylaria* subgenus *Pseudoxylaria* among taxa of the subfamily Xylarioideae (Xylariaceae) and phylogeny of the taxa involved in the subfamily. *Molecular phylogenetics and evolution*, *54*(3), 957-969.
- Ju, Y. M., Hsieh, H. M., Rogers, J. D., Fournier, J., Jaklitsch, W. M., & Courtecuisse, R. (2012). New and interesting penzigoid *Xylaria* species with small, soft stromata. *Mycologia*, *104*(3), 766-776.
- Khajadpai, K. (2012). *Isolation of endophytic Xylaria spp. from Trad province and their metabolites with anti-cervical cancer activity*. Master's Thesis, Department of Microbiology Faculty of Science Chulalongkorn University.
- Kohn, L. M., & Korf, R. P. (1975). Variation in ascomycete iodine reactions: KOH pretreatment explored. *Mycotaxon*, *3*, 165-172.
- Liu, X., Dong, M., Chen, X., Jiang, M., Lv, X., & Zhou, J. (2008). Antimicrobial activity of an endophytic *Xylaria* sp. YX-28 and identification of its antimicrobial compound 7-amino-4-methylcoumarin. *Applied microbiology and biotechnology*, *78*(2), 241-247.
- Lumbsch, H. T., & Huhndorf, S. M. (2010). Myconet Volume 14. Part One. Outline of Ascomycota–2009. Part Two. Notes on Ascomycete Systematics. Nos. 4751–5113. *Fieldiana: Life and Earth Sciences* 1: 1–64.

- Mazzola, P. G., Jozala, A. F., Novaes, L. C. d. L., Moriel, P., & Penna, T. C. V. (2009). Minimal inhibitory concentration (MIC) determination of disinfectant and/or sterilizing agents. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 45(2), 241-248.
- Mühlbauer, A., Triebel, D., Persoh, D., Wollweber, H., Seip, S., & Stadler, M. (2002). Macrocarpones, novel metabolites from stromata of *Hypoxylon macrocarpum*, and new evidence on the chemotaxonomy of *Hypoxylon* species. *Mycological Progress*, 1(3), 235-248.
- Nannfeldt, J. (1976). Iodine reactions in ascus plugs and their taxonomic significance. *Transactions of the British Mycological Society*, 67(2), 283-287.
- Palaga, T., Kataoka, T., Woo, J. T., & Nagai, K. (1996). Suppression of Apoptotic Cell Death of IL-3-Dependent Cell Lines by ER/SR Ca²⁺-ATPase Inhibitors upon IL-3 Deprivation. *Experimental cell research*, 228(1), 92-97.
- Pittayakhajonwut, P., Suvannakad, R., Thienhirun, S., Prabpai, S., Kongsaree, P., & Tanticharoen, M. (2005). An anti-herpes simplex virus-type 1 agent from *Xylaria mellisii* (BCC 1005). *Tetrahedron letters*, 46(8), 1341-1344.
- Pongcharoen, W., Rukachaisirikul, V., Phongpaichit, S., Kühn, T., Pelzing, M., Sakayaroj, J., & Taylor, W. C. (2008). Metabolites from the endophytic fungus *Xylaria* sp. PSU-D14. *Phytochemistry*, 69(9), 1900-1902.
- Quang, D. N., Hashimoto, T., Tanaka, M., Baumgartner, M., Stadler, M., & Asakawa, Y. (2002). Chemical constituents of the ascomycete *Daldinia concentrica*. *Journal of Natural Products*, 65(12), 1869-1874.
- Rogers, J., & Callan, B. (1986). *Xylaria poitei*: stromata, cultural description, and structure of conidia and ascospores. *Mycotaxon (USA)*.

- Rogers, J. D. (1979). The Xylariaceae: systematic, biological and evolutionary aspects. *Mycologia*, 71, 1-42.
- Rogers, J. D. (2000). Thoughts and musings on tropical Xylariaceae. *Mycological Research*, 104(12), 1412-1420.
- Shiono, Y., Motoki, S., Koseki, T., Murayama, T., Tojima, M., & Kimura, K. (2009). Isopimarane diterpene glycosides, apoptosis inducers, obtained from fruiting bodies of the ascomycete *Xylaria polymorpha*. *Phytochemistry*, 70(7), 935-939.
- Stadler, M., Baumgartner, M., Wollweber, H., Ju, Y. M., & Rogers, J. D. (2001). *Daldinia decipiens* sp. nov. and notes on some other European *Daldinia* spp. inhabiting Betulaceae. *Mycotaxon*, 80, 167-177.
- Stadler, M., Ju, Y. M., & Rogers, J. D. (2004). Chemotaxonomy of *Entonaema*, *Rhopalostroma* and other Xylariaceae. *Mycological Research*, 108(03), 239-256.
- Suwannasai, N. (2005). *Molecular taxonomic studies of selected members of the Xylariaceae (fungi)*. Doctor dissertation, Department of Microbiology Faculty of Science Suranaree University.
- Suwannasai, N., Whalley, M. A., Whalley, A. J. S., Thienhirun, S., & Sihanonth, P. (2012). Ascus apical apparatus and ascospore characters in Xylariaceae. *IMA fungus*, 3(2), 125-133.
- Thienhirun, S. (1997). *A preliminary account of the Xylariaceae of Thailand*. Ph.D. Thesis. Liverpool John Moores University.
- Thienhirun, S., & Whalley, A. J. S. (2001). *Rosellinia necatrix*: a potential threat in Thailand. *Thai Phytopathology*, 12, 164-168.

- Thienhirun, S., & Whalley, A. J. S. (2004). Paper presented at the In: Thai Fungal Diversity (eds. E.B.G. Jones, M. Tanticharoen and K.D. Hyde), BIOTEC, Thailand: 71-77.
- Wang, X., Tan, R., & Liu, J. (2005). Xylactam, a new nitrogen-containing compound from the fruiting bodies of ascomycete *Xylaria euglossa*. *Journal of Antibiotics*, *58*(4), 268-270.
- Whalley, A. J., Phosri, C., Ruchikachorn, N., Sihanonth, P., Sangvichien, E., Suwannasai, N., Thienhirun, S. Whalley, M. (2014). Interesting or rare Xylariaceae from Thailand. *Rajabhat Journal of Sciences, Humanities & Social Sciences*, *13*(1), 9-19.
- Whalley, A. J. S. (1996). The xylariaceous way of life. *Mycological Research*, *100*(8), 897-922.
- Whalley, A. J. S., & Edwards, R. L. (1995). Secondary metabolites and systematic arrangement within the Xylariaceae. *Canadian Journal of Botany*, *73*(S1), 802-810.
- Whalley, A. J. S., & Edwards, R. L. (1998). The Xylariaceae: a case study in biological and chemical diversity. *Pure Appl. Chem*, *70*(11), 2123-2133.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, *18*, 315-322.
- Yin, W., Lin, Y., She, Z., Vrijmoed, L. L. P., & Jones, E. G. (2008). A new compound: Xyloketal H from mangrove fungus *Xylaria* sp. from the South China Sea Coast. *Chemistry of Natural Compounds*, *44*(1), 3-5



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



ภาคผนวก ก

ข้อมูลด้านเคมี

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

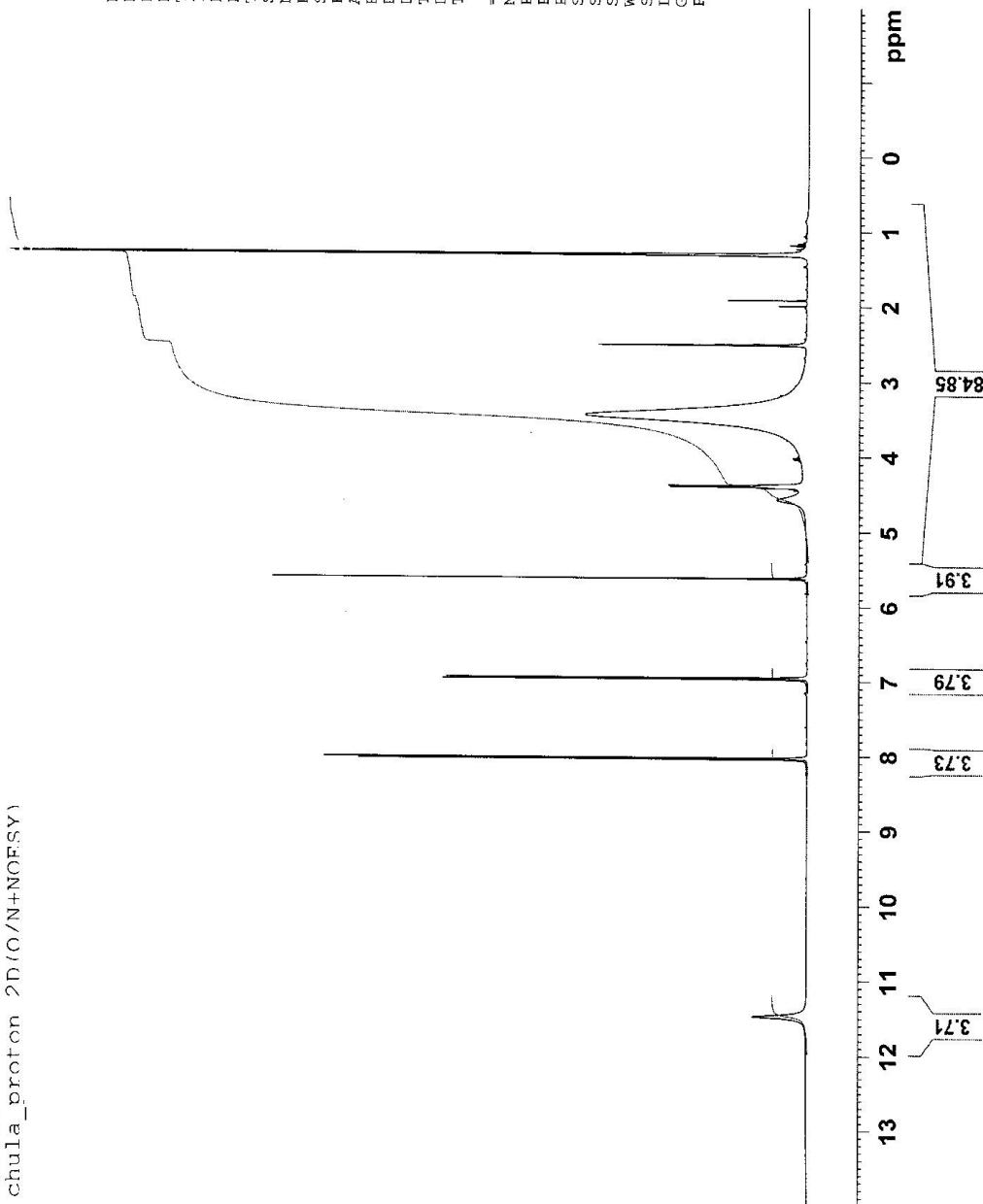
TR30N2
chula_proton 2D(O/N+NOFSY)



NAME Apr08-2014-sss100

EXPNO 1
PROCNO 1
Date_ 20140408
Time_ 19.48
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm PABBO BB-
PULPROG zg
TD 32768
SOLVENT DMSO
NS 1
DS 0
SWH 6393.862 Hz
FIDRES 0.1195125 Hz
AQ 2.5625076 sec
RG 32
DW 78.200 usec
DE 6.00 usec
TE 298.2 K
D1 2.00000000 sec
TD0 1

==== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
PI 10.90 usec
PL1 -4.00 dB
PL1W 24.48114586 W
SF01 400.1324008 MHz
SI 16384
SF 400.1300000 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00



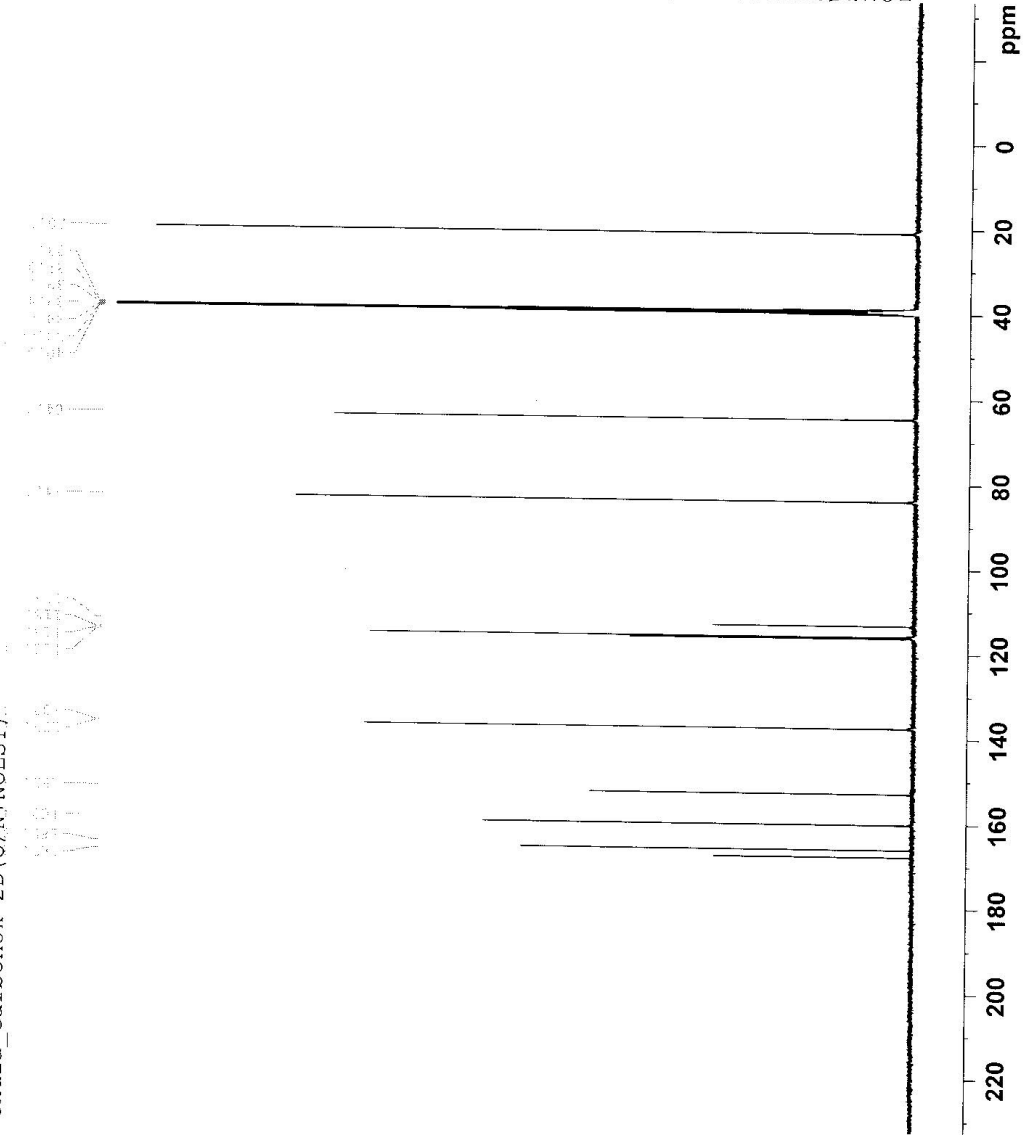
TR30N2
chula_carbon5k 2D(O/N+NOESY)



NAME Apr08-2014-sss100
 EXPNO 1
 PROCNO 2
 Date_ 20140408
 Time_ 19.49
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm PABBO BB-
 PULPROG zgdc
 TD 65536
 SOLVENT DMSO
 NS 5120
 DS 2
 SWH 26785.715 Hz
 FIDRES 0.408718 Hz
 AQ 1.2233887 sec
 RG 57
 DW 18.667 usec
 DE 6.00 usec
 TE 298.2 K
 D1 1.50000000 sec
 D11 0.03000000 sec
 TDO 1

==== CHANNEL f1 =====
 NUC1 13C
 P1 9.00 usec
 PL1 -3.00 dB
 PL1W 66.15671539 W
 SFO1 100.6228303 MHz

==== CHANNEL f2 =====
 CDPFRG2 waltz16
 NUC2 1H
 PCPD2 92.00 usec
 PL2 -4.00 dB
 PL12 14.50 dB
 PL2W 24.48114586 W
 PL12W 0.34580538 W
 SFO2 400.1316005 MHz
 S1 131072
 SF 100.6128193 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 1.00 Hz
 GB 0
 PC 1.40



TR30N2
chula_cosy_2D(O/N+NOESY)

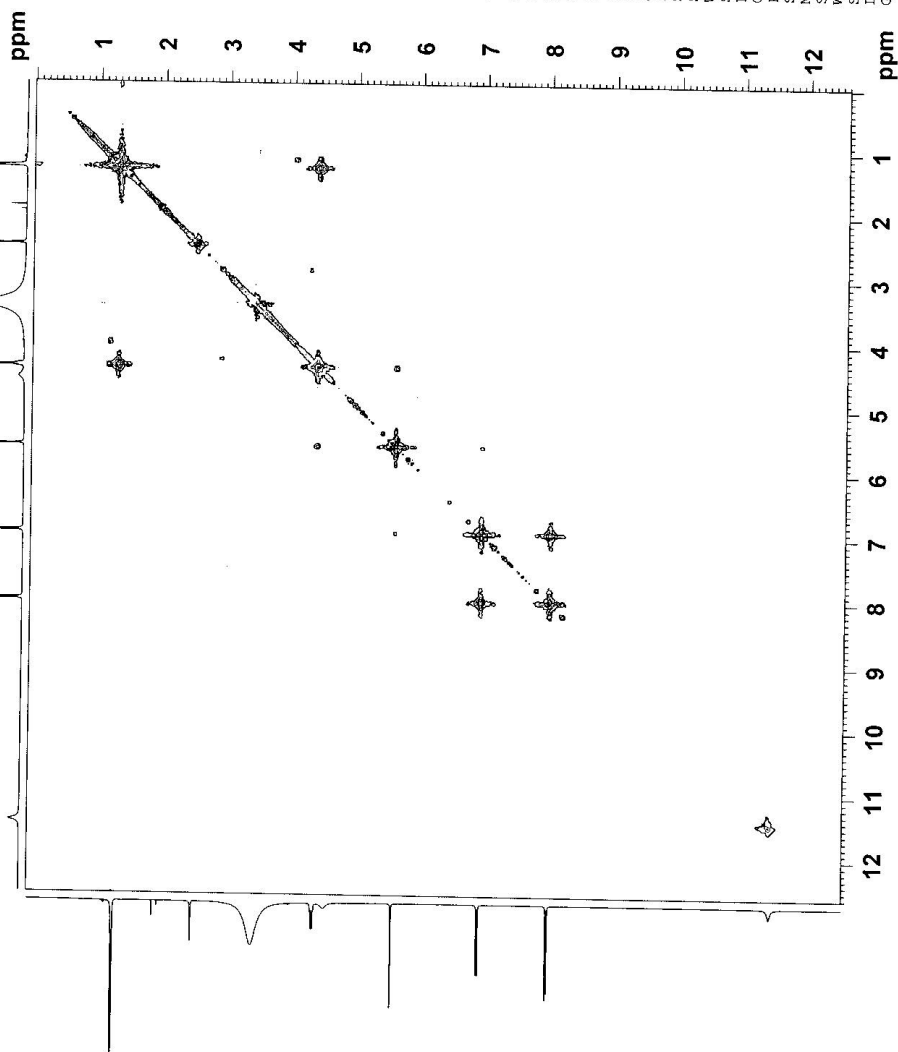


NAME Apr08-2014-sss100

EXPNO 1
PROCNO 3
Date_ 20140408
Time 23.48
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm PABBO BB-
PULPROG cosygpcpf
TD 2048
SOLVENT DMSO
NS 6
DS 8
SWH 5050.505 Hz
FIDRES 2.466067 Hz
AQ 0.2028020 sec
RG 45.2
DW 99.000 usec
DE 8.00 usec
TE 300.1 K
D0 0.0000300 sec
D1 1.16764200 sec
D13 0.00006400 sec
D16 0.00020000 sec
INO 0.00019800 sec

==== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P0 10.90 usec
P1 10.90 usec
PL1 -4.00 dB
PL1W 24.48114586 W
SF01 400.1325184 MHz

==== GRADIENT CHANNEL =====
GPNAM1 SINE_100
GPZ1 10.00 %
PL6 1000.00 usec
ND0 1
TD 128
SF01 400.1325 MHz
FIDRES 39.457060 Hz
SW 12.622 Ppm
FMODE CF
SI 1024
SF 400.13000000 MHz
WDW SINE
SSB 0
LB 0.00 Hz
GB 0
PC 0
SI 1.40
ST 1024
MC2 CF
SF 400.13000000 MHz
WDW SINE
SSB 0
LB 0.00 Hz
GB 0



TR30N2
 chula_hsqc_edited 2D(O/N+NOESY)



NAME Apr-08-2014-ssaj100
 EXPNO 4
 PROCNO 1
 Date_ 20140601
 Time 00:07
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm PABBO BB-
 TD 65536
 TD0PROC hsqcdecouplp
 SOLVENT DMSO
 NS 1
 DS 4
 SWH 5050.405 Hz
 FIDRES 4.9327134 Hz
 AQ 0.1014260 sec
 SFO1 400.1325384 MHz
 DE 6.00 usec
 TE 299.7 K
 DWT2 145.0000000
 D1 1.4838200 sec
 D4 0.03172414 sec
 D13 0.03000000 sec
 D16 0.00020000 sec
 D21 0.00345000 sec
 ZDELTA 0.0002760 sec

===== CHANNEL f1 =====
 NUC1 1H
 P1 10.00 usec
 PL1 21.80 dB
 F28 1000.00 usec
 PL2 4.00 dB
 PL1W 24.4811500 dB
 SFO1 400.1325384 MHz

===== CHANNEL f2 =====
 CPDPRG2 gpc
 NUC2 13C
 E3 9.00 usec
 PL3 18.00 usec
 PL2 23.00 dB
 PL22 14.50 dB
 PL2W 66.15671539 W
 SFO2 100.6213211 MHz

===== GRADIENT CHANNEL =====
 GPCPRG1 sine
 SFO1 100.6213 MHz
 SFO2 100.6213 MHz
 GPCPRG2 sine
 SFO1 100.6213 MHz
 SFO2 100.6213 MHz

===== CHANNEL f3 =====
 NUC3 15N
 P1 10.00 usec
 PL1 21.80 dB
 F28 1000.00 usec
 PL2 4.00 dB
 PL1W 24.4811500 dB
 SFO1 400.1325384 MHz

===== CHANNEL f4 =====
 CPDPRG2 gpc
 NUC2 13C
 E3 9.00 usec
 PL3 18.00 usec
 PL2 23.00 dB
 PL22 14.50 dB
 PL2W 66.15671539 W
 SFO2 100.6213211 MHz

===== GRADIENT CHANNEL =====
 GPCPRG1 sine
 SFO1 100.6213 MHz
 SFO2 100.6213 MHz
 GPCPRG2 sine
 SFO1 100.6213 MHz
 SFO2 100.6213 MHz

===== CHANNEL f5 =====
 NUC5 15N
 P1 10.00 usec
 PL1 21.80 dB
 F28 1000.00 usec
 PL2 4.00 dB
 PL1W 24.4811500 dB
 SFO1 400.1325384 MHz

===== CHANNEL f6 =====
 CPDPRG2 gpc
 NUC2 13C
 E3 9.00 usec
 PL3 18.00 usec
 PL2 23.00 dB
 PL22 14.50 dB
 PL2W 66.15671539 W
 SFO2 100.6213211 MHz

===== GRADIENT CHANNEL =====
 GPCPRG1 sine
 SFO1 100.6213 MHz
 SFO2 100.6213 MHz
 GPCPRG2 sine
 SFO1 100.6213 MHz
 SFO2 100.6213 MHz

===== CHANNEL f7 =====
 NUC7 15N
 P1 10.00 usec
 PL1 21.80 dB
 F28 1000.00 usec
 PL2 4.00 dB
 PL1W 24.4811500 dB
 SFO1 400.1325384 MHz

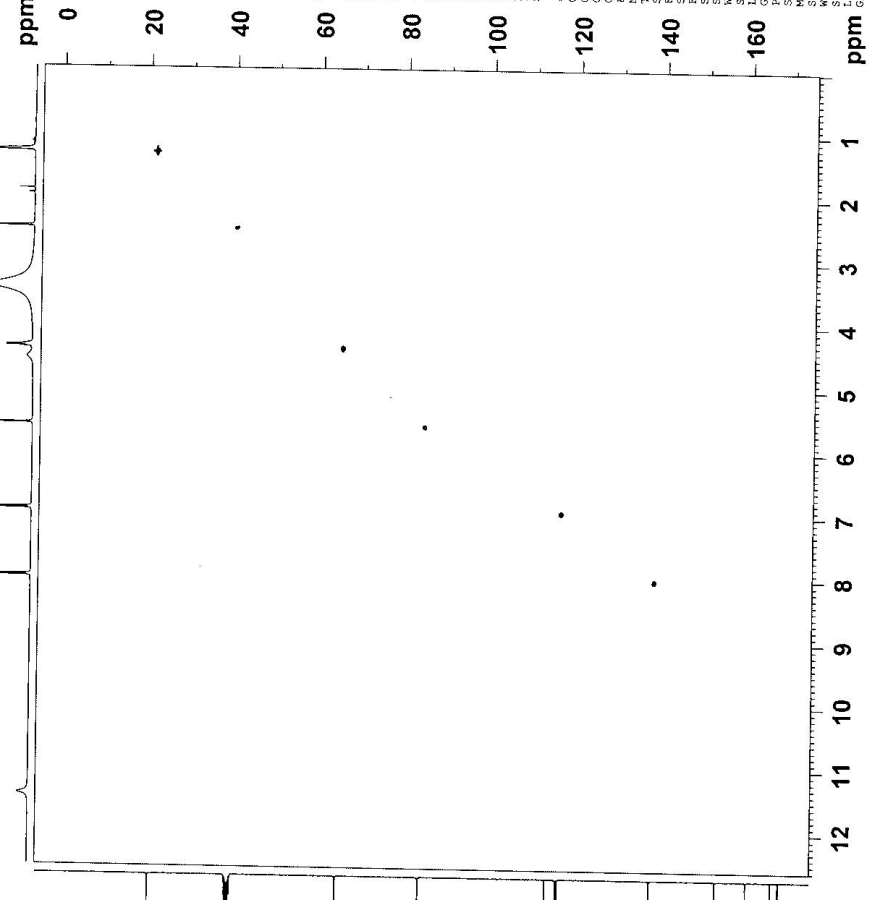
===== CHANNEL f8 =====
 CPDPRG2 gpc
 NUC2 13C
 E3 9.00 usec
 PL3 18.00 usec
 PL2 23.00 dB
 PL22 14.50 dB
 PL2W 66.15671539 W
 SFO2 100.6213211 MHz

===== GRADIENT CHANNEL =====
 GPCPRG1 sine
 SFO1 100.6213 MHz
 SFO2 100.6213 MHz
 GPCPRG2 sine
 SFO1 100.6213 MHz
 SFO2 100.6213 MHz

===== CHANNEL f9 =====
 NUC9 15N
 P1 10.00 usec
 PL1 21.80 dB
 F28 1000.00 usec
 PL2 4.00 dB
 PL1W 24.4811500 dB
 SFO1 400.1325384 MHz

===== CHANNEL f10 =====
 CPDPRG2 gpc
 NUC2 13C
 E3 9.00 usec
 PL3 18.00 usec
 PL2 23.00 dB
 PL22 14.50 dB
 PL2W 66.15671539 W
 SFO2 100.6213211 MHz

===== GRADIENT CHANNEL =====
 GPCPRG1 sine
 SFO1 100.6213 MHz
 SFO2 100.6213 MHz
 GPCPRG2 sine
 SFO1 100.6213 MHz
 SFO2 100.6213 MHz

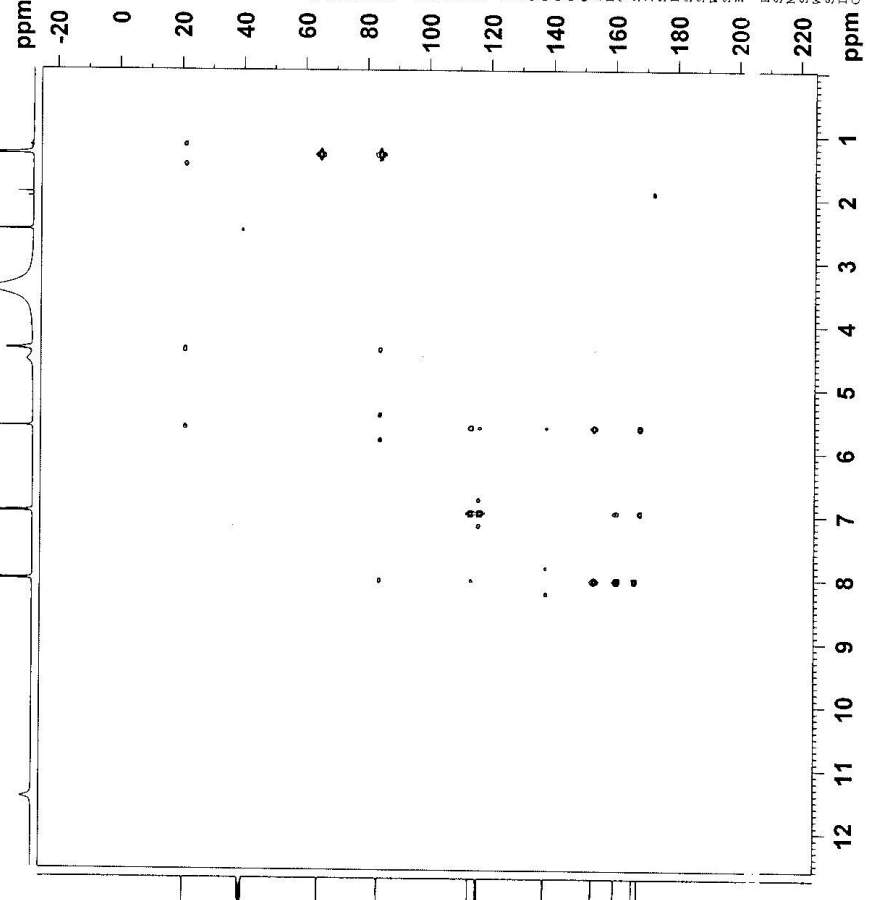


TR30N2
 HMBC_OVN_16Mar12_2D(O/N+NOESY)



```

NAME      Apr08-2014--asali00
EXPNO     5
PROCNO    1
Date_     20140409
Time      0.31
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm PABBO BB-
PULPROG   hmczplpndzf
TD         1024
NS         320
DS         16
SWE        5050.405 Hz
FIDRES    4.932134 Hz
AQ         0.1014250 sec
RG         6.000
DA         99.600 usec
DE         6.000 usec
TE         298.8 K
CNSTF2    145.0000000
INST13    0.0000000
DO         0.0000000 sec
D1         1.18332096 sec
D2         0.00344828 sec
D6         0.06250000 sec
RG         0.0020000 sec
NUC1       13C
NUC2       13C
===== CHANNEL f1 =====
P1         10.90 usec
PL1        -3.00 dB
SFO1       400.1325184 MHz
===== CHANNEL f2 =====
P2         9.00 usec
PL2        -3.00 dB
SFO2       100.6228138 MHz
===== GRADIENT CHANNEL =====
GPNAM1     SINE.100
GPNAM2     SINE.100
GPNAM3     SINE.100
GP1        30.00 %
GP2        30.00 %
GP3        40.10 %
PL6        1000.00 usec
ND0        2
TD01       100.256 MHz
FIDRES     98.264465 Hz
SW         250.000 Ppm
FMODE      CF
SI         2048
SF         400.1300000 MHz
WDW         SINC
SSB         0
LB         9.000 Hz
=====
PC         1.40
GC         100
MC2        100
SF         100.6127650 MHz
WDW         SINE
SSB         0
GB         0.00 Hz
  
```



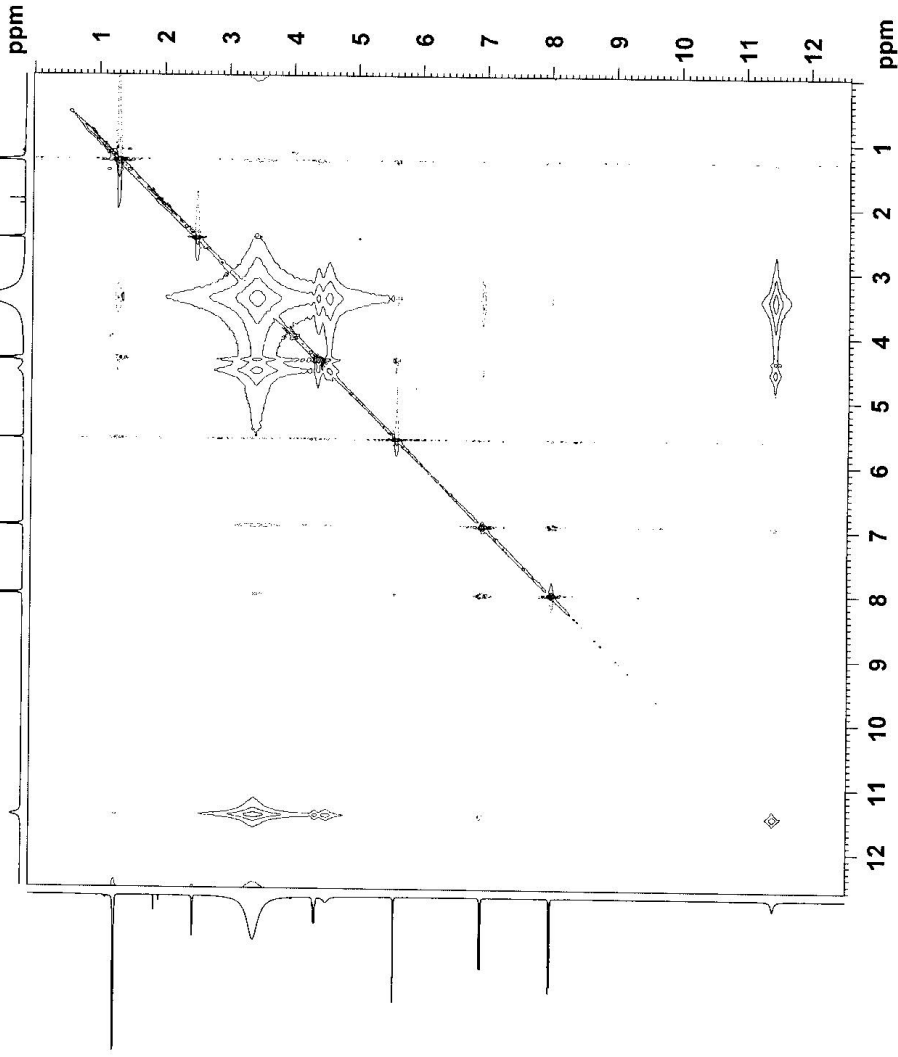
TR30N2
chula_noesy1 2D(O/N+NOESY)



```

NAME          Apr08-2014-sss100
EXPNO         1
PROCNO        6
Date_         20140409
Time          3.45
INSTRUM       spect
PROBHD        5 mm F4BBO BB-
PULPROG       noesygbph
TD            2048
SOLVENT       DMSO
NS            32
DS            16
SWH           5050.505 Hz
FIDRES        2.466067 Hz
AQ            0.2028020 sec
RG            25.4
DE            99.000 usec
TE            300.2 K
D0            0.0008312 sec
D8            0.6995689 sec
D16           0.6995689 sec
IN0           0.00019800 sec
===== CHANNEL f1 =====
NUC1          1H
P1            10.90 usec
P2            21.80 usec
PL1           -4.00 dB
PL1W          24.48114586 W
SFO1          400.1325184 MHz
===== GRADIENT CHANNEL =====
GENAM1        SINE.100
GENAM2        SINE.100
GFZ1          40.00 %
GFZ2          -40.00 %
PL6           1000.00 usec
ND0           1
TD            256
SFO1          400.1325 MHz
FIDRES        19.728535 Hz
SW            12.622 ppm
FMODE         States-TPPI
SI            1024
SF            400.1300000 MHz
QSSINE        2
WDW           0.00 Hz
SSB           0
LB            1.40
GB            1024
PC            1024
MC2           States-TPPI
SF            400.1300000 MHz
QSSINE        2
WDW           0.00 Hz
SSB           0
LB            1.40
GB

```



Mass Spectrum List Report

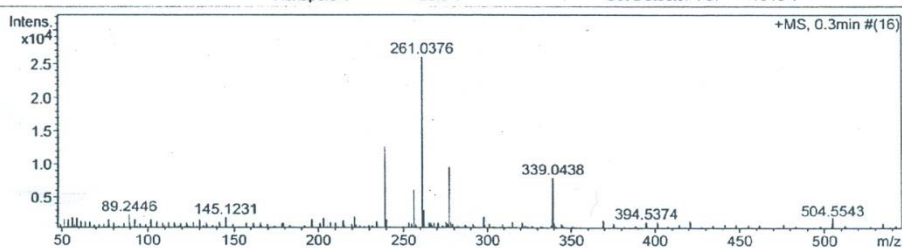
Analysis Info

Analysis Name OSSP570329001.d
Method MKE_tune_low_positive_20130204.m
Sample Name TR30N2
 TR30N2

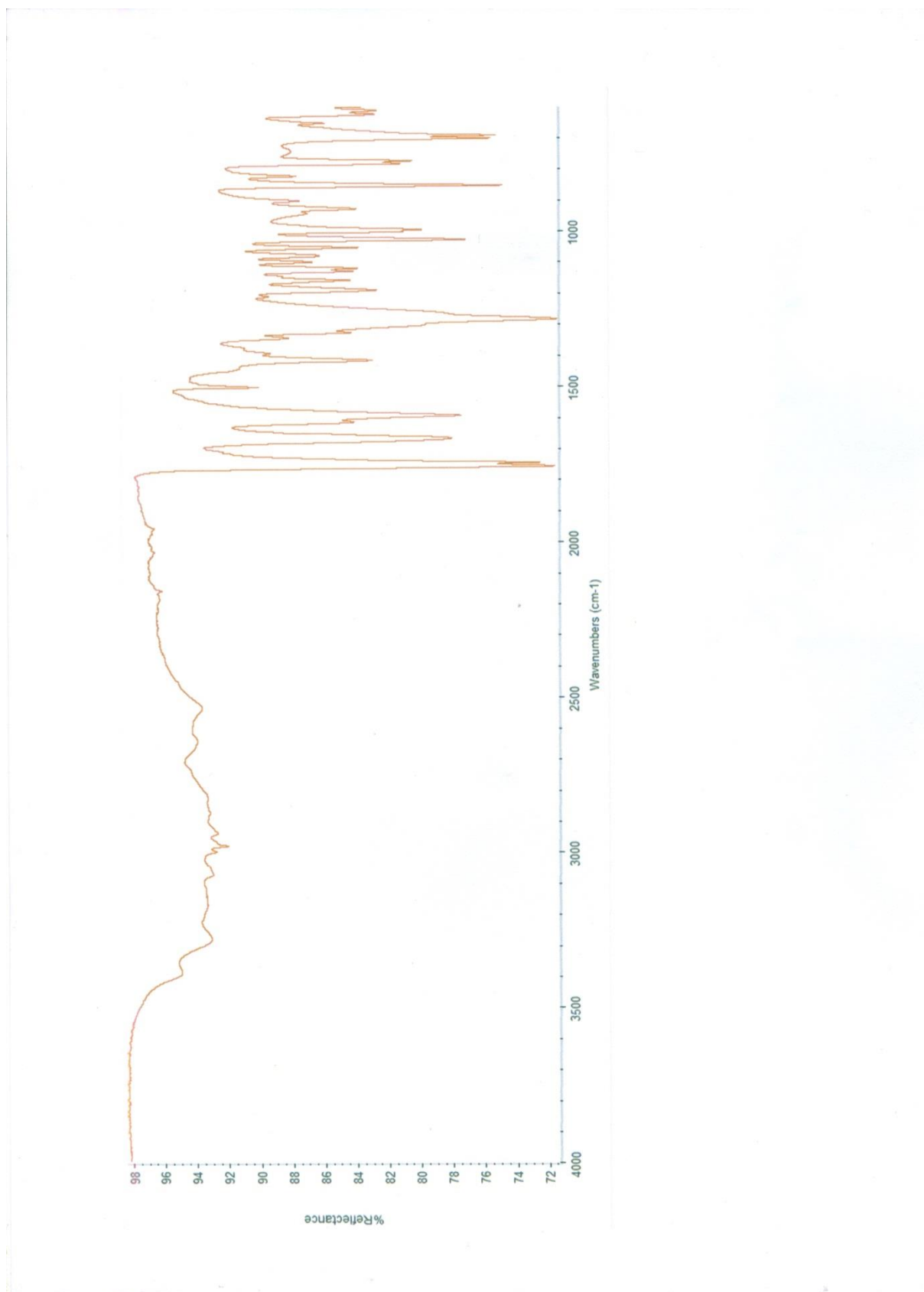
Acquisition Date 3/29/2014 6:15:28 PM
Operator Administrator
Instrument micrOTOF 72

Acquisition Parameter

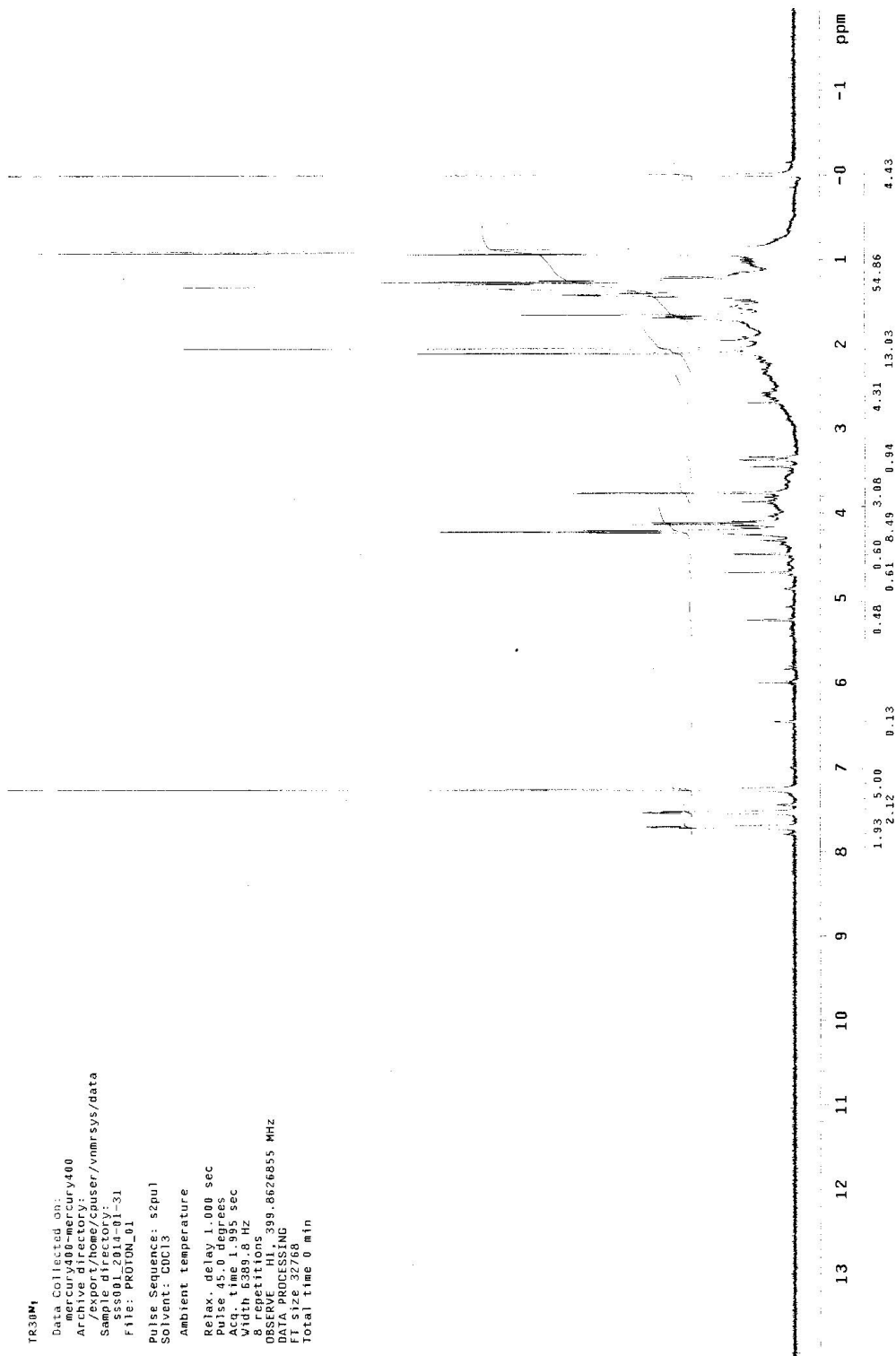
Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Corrector Fill	79 V
Scan Range	n/a	Capillary Exit	90.0 V	Set Pulsar Pull	406 V
Scan Begin	50 m/z	Hexapole RF	90.0 V	Set Pulsar Push	388 V
Scan End	3000 m/z	Skimmer 1	45.5 V	Set Reflector	1300 V
		Hexapole 1	25.0 V	Set Flight Tube	9000 V
				Set Detector TOF	1910 V



#	m/z	I	I%	S/N	FWHM	Res.
1	53.7403	1647	6.3	7.0	0.0054	9931
2	77.3440	1604	6.2	6.8	0.0090	8594
3	89.1475	1893	7.3	8.1	0.0068	13148
4	89.2446	2339	9.0	10.1	0.0094	9537
5	101.8868	1499	5.8	6.4	0.0087	11750
6	101.9520	1641	6.3	7.0	0.0096	10596
7	145.1231	1943	7.5	8.3	0.0092	15704
8	196.1168	1642	6.3	7.2	0.0327	5999
9	203.0530	1775	6.8	7.9	0.0360	5633
10	221.0463	2062	7.9	9.3	0.0340	6494
11	239.0560	12635	48.5	59.1	0.0385	6214
12	240.0612	1625	6.2	7.3	0.0351	6845
13	256.0819	5149	23.6	28.9	0.0390	6562
14	261.0376	25038	100.0	123.8	0.0390	6685
15	262.0405	3064	11.8	14.3	0.0415	6308
16	277.0097	9669	37.1	46.3	0.0420	6589
17	297.6428	1577	6.1	7.4	0.0135	22116
18	297.8588	1619	6.2	7.6	0.0315	9442
19	297.8758	1756	6.7	8.3	0.0221	13479
20	339.0438	7966	30.6	39.8	0.0525	6456
21	504.5543	1742	6.7	9.7	0.0157	32107
22	1080.7765	1760	6.8	10.2	0.0323	33446
23	1212.8544	1641	6.3	9.4	0.0372	32631
24	1449.8106	2093	8.0	12.3	0.0479	30248
25	1499.7983	1535	5.9	9.1	0.0587	25542
26	1872.9372	1500	5.8	8.4	0.0435	43042
27	2045.4969	1549	5.9	8.8	0.0663	30831
28	2104.7067	1855	7.1	10.7	0.0433	48637
29	2349.5326	1927	7.4	11.1	0.0344	68218
30	2349.9297	3002	11.5	17.4	0.0334	70446



TR30M1
 Data Collected on:
 Mercury 400 spectrometer
 A: /export/home/cpuser/vnmrSYS/data
 Sample directory:
 555001_2014-01-31
 File: PROTON_01
 Pulse Sequence: s2pu1
 Solvent: CDCl3
 Ambient temperature
 Relax. delay: 1.000 sec
 Pulse 45.0 degrees
 Acq. time 1.995 sec
 Width 6389.8 Hz
 8 repetitions
 OBSERVE HL: 398.8626855 MHz
 DATA PROCESSING
 File: 205288
 Total time 0 min





ภาคผนวก ข

สูตรอาหาร และวิธีการเตรียมสารเคมี

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

1. Potato dextrose agar (PDA)

Potato	200	กรัม
Glucose	20	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. Potato dextrose broth (PDB)

Potato	200	กรัม
Glucose	20	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. Nutrient agar (NA)

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
NaCl	5	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. Nutrient broth (NB)

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
NaCl	5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

5. Malt extract broth (MEB)

Malt extract	20	กรัม
Peptone	1	กรัม
Glucose	20	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

6. Mueller – Hinton agar (MHA)

Mueller – Hinton Starch	21	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

7. Mueller – Hinton broth (MHB)

Mueller – Hinton Starch	21	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

8. 0.5 McFarland Standard

BaCl ₃	0.048 M	ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร
H ₂ SO ₄	0.36 M	ปริมาตร 99.5 มิลลิลิตร

อ่านค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร ให้อยู่ในช่วง 0.08 – 0.10

9. Completed RPMI 1640 100 มิลลิลิตร

RPMI 1640	90	%
Fetal bovine serum (FBS)	10	%
HEPES	1	%
Sodium pyruvate	1	%
Streptomycin	0.25	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
Penicillin	100	หน่วยต่อมิลลิลิตร

10. Completed DMEM 100 มิลลิลิตร
- | | | |
|--------------------------|------|-----------------------|
| DMEM | 90 | % |
| Fetal bovine serum (FBS) | 10 | % |
| HEPES | 1 | % |
| Sodium pyruvate | 1 | % |
| Streptomycin | 0.25 | มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร |
| Penicillin | 100 | หน่วยต่อมิลลิลิตร |
11. FBS inactivation
- ก่อนนำ FBS ไปใช้ในการเตรียมอาหารต้องนำไปอุ่นในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที
12. Freezing media
- | | | |
|----------------|----|---|
| Complete media | 90 | % |
| DMSO | 10 | % |
13. 1X PBS ปริมาตร 1 ลิตร
- | | | |
|----------------------------------|------|------|
| NaCl | 8 | กรัม |
| KCl | 0.2 | กรัม |
| Na ₂ HPO ₄ | 1.44 | กรัม |
| KH ₂ PO ₄ | 0.24 | กรัม |
- เติมน้ำกลั่น 1 ลิตร ละลายให้เข้ากัน ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.4 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

14. MTT solution

MTT	50	มิลลิกรัม
PBS (สำหรับทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เท่านั้น)	10	มิลลิลิตร

ละลาย MTT ใน PBS ใส่ในหลอดฝาเกลียวขนาด 15 มิลลิลิตร ที่ปลอดเชื้อผสมให้เข้ากัน กรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปปราศจากเชื้อขนาด 0.22 ไมโครเมตร (ทำในตู้ปลอดเชื้อ) แบ่งใส่หลอด ไมโครเซนติฟิวจ์ที่ปลอดเชื้อขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 1 มิลลิลิตร หุ้มด้วยแผ่นพอยด์ เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

หมายเหตุ MTT เป็นสารก่อมะเร็ง ต้องสวมถุงมือก่อนชั่งหรือเตรียมสารทุกครั้ง

15. 0.04 N HCl ใน isopropanol ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ตวง isopropanol 80 มิลลิลิตร ในกระบอกตวงขนาด 100 มิลลิลิตร เติม HCl 0.331 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml ด้วย isopropanol ปิดฝา และเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

16. Streptomycin

ละลาย Streptomycin ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 500 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร แล้วกรองผ่านหัวกรองปราศจากเชื้อขนาด 0.22 ไมโครเมตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

17. Penicillin

ละลาย Penicillin ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้มีความเข้มข้น 10^6 หน่วยต่อมิลลิลิตร แล้ว กรองผ่านหัวกรองปราศจากเชื้อขนาด 0.22 ไมโครเมตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

18. 0.5 M EDTA (Ethylenediamine tetraacetic acid) ปริมาตร 1 ลิตร

EDTA	186.10	กรัม
น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร

ละลาย EDTA ให้เข้ากัน ปรับ pH ให้เท่ากับ 8 จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร
นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที
เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

19. 1.5% Agarose gel (w/w)

Agarose	1.65	กรัม
0.5 X TBE (pH 8)	110	มิลลิลิตร (ภาคผนวก ค หมายเลข 2)
Ethidium bromide	4	ไมโครลิตร

ผสมให้เข้ากันแล้วหลอมโดยใช้ความร้อนจนใสเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

20. 0.5X TBE

TBE	18.5	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

นำมาผสมกัน คนจน TBE ละลายจนหมด

21. Ethidium Bromide Solution

Ethidium Bromide	1	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ethidium bromide เป็นสารก่อมะเร็ง ดังนั้นเวลาเตรียมควรสวมถุงมือ และห่อขวดด้วย
aluminum foil เพื่อป้องกันแสง เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวศิริประภา ประพานศรี เกิดเมื่อวันที่ 7 พฤษภาคม พ.ศ. 2529 ภูมิลำเนาเดิมเป็นคนจังหวัดสุรินทร์ สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี สาขาวิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เมื่อปีการศึกษา 2552 จากนั้นสอบเข้าศึกษาต่อในระดับบัณฑิตศึกษา หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยในปีพ.ศ.2553 ได้เผยแพร่ผลงานวิจัยบางส่วนในการประชุมวิชาการด้านเทคโนโลยีชีวภาพระดับชาติ ในงาน The 24th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology “Renewable Energy and Global Care” (TSB 2012) ที่โรงแรมสุนีย์แกรนด์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี จังหวัดอุบลราชธานี ระหว่างวันที่ 29 -30 พฤศจิกายน พ.ศ. 2555



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY