ราเอนโดไฟต์จากใบพืชในป่าเต็งรัง อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน

นายธนวัช สุจริตวรกุล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2551
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ENDOPHYTIC FUNGI FROM PLANT LEAVES IN DIPTEROCARP FOREST AT VIENGSA DISTRICT, NAN PROVINCE

Mr.Thanawat Sutjaritvorakul

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 2008

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ราเอนโดไฟต์ที่แยกจากใบพืชในป่าเต็งรัง อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน
โดย	นายธนวัช สุจริตวรกุล
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	ศาสตราจารย์ ดร.โสภณ เรืองสำราญ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม (ถ้ามี)	รองศาสตราจารย์ ดร.ประกิตติ์สิน สีหนนทน์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ ก๊กผล)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
(ศาสตราจารย์ ดร.โสภณ เรืองสำราญ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร.ประกิตติ์สิน สีหนนทน์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.ธีรวัฒน์ มงคลอัศวรัตน์)

ธนวัช สุจริตวรกุล : ราเอนโดไฟต์จากใบพืชในป่าเต็งรัง อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน. (ENDOPHYTIC FUNGI FROM PLANT LEAVES IN DIPTEROCARP FOREST AT VIENGSA DISTRICT, NAN PROVINCE) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ศ. ดร.โสภณ เริงสำราญ, อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : รศ. ดร.ประกิตติ์สิน สีหนนท์, 124 หน้า.

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์ในการตรวจสอบความหลากหลายทางชีวภาพของราเอนโดไฟต์ในป่าเต็งรัง อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน ประเทศไทย โดยเป็นการรายงานครั้งแรกที่เกี่ยวกับความหลากหลายทางชีวภาพของราเอนโดไฟต์ในพื้นที่นี้ นอกจากนี้ยังศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้ ได้แก่ การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ คือ *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aerogenosa*, *Escherichia coli* และ *Candida albicans* โดยวิธี paper disk susceptibility test และการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง 5 ชนิด ได้แก่ เซลล์มะเร็งเต้านม (BT474), เซลล์มะเร็งตับ (HEP-G2), เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO III), เซลล์มะเร็งปอด (CHAGO) และเซลล์มะเร็งลำไส้ (SW 620) โดยวิธี MTT assay ได้ราเอนโดไฟต์ 18 สกุล ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันจากเชื้อราทั้งหมด 302ไอโซเลต ซึ่งแยกได้จากชิ้นตัวอย่างใบพืช 400 ชิ้น ผลการทดลองพบว่าราเอนโดไฟต์ที่แยกจากพืชในฤดูฝนมีจำนวน colonization frequency สูงกว่าราเอนโดไฟต์ที่แยกจากพืชในฤดูแล้ง โดยราเอนโดไฟต์ที่พบมากที่สุด 3 ชนิดแรกคือ *Phyllosticta* sp.1 (60 ไอโซเลต), *Phomopsis* sp.1 (54 ไอโซเลต) และ *Xylaria* sp.1 (44 ไอโซเลต) เมื่อทำการจัดจำแนกเป็นกลุ่มพบว่าราเอนโดไฟต์ในกลุ่ม celomycetes มีจำนวนมากที่สุด ตามด้วยกลุ่ม ascomycetes และพบกลุ่ม hyphomycetes น้อยที่สุดตามลำดับ และ ราเอนโดไฟต์ที่แยกได้สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบได้ โดยพบว่าส่วนสกัดที่ได้มีฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกมากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ และ ส่วนสกัดจากราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ DTD 6 และ FID 15 ที่แยกได้จากต้นยางพลวง (*Dipterocarpus tuberculatus* Roxb.) และต้นตะขบป่า (*Flacourtia indica* Merr.) สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง กระเพาะอาหาร (KATO III) ได้อย่างจำเพาะ นำอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวของราทั้ง 2 สายพันธุ์มาสกัดด้วยเอทิลแอซิเตต จากนั้นแยกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีและการตกผลึกได้สาร 2 ชนิดคือ 4-ethylmethoxybenzene และ cytochalasin D พบว่า cytochalasin D มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้แก่ SW620, KATO III และ Hep-G2 โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 4.66, 5.84 และ4.79 µg/ml ตามลำดับ

สาขาวิชา……เทคโนโลยีชีวภาพ.....ลายมือชื่อนิสิต.....

ปีการศึกษา…….2551…….....ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

4972590723 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORDS: ENDOPHYTIC FUNGI / DIPTEROCARP FOREST / BIODIVERSITY

THANAWAT SUTJARITVORAKUL: ENDOPHYTIC FUNGI FROM PLANT LEAVES IN DIPTEROCARP FOREST AT VIENGSA DISTRICT, NAN PROVINCE. THESIS ADVISOR : PROF. SOPHON ROENGSUMRAN, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR : ASSOC. PROF. PRAKITSIN SIHANONTH, Ph.D. , 124 pp.

The objective of this research is to examine the endophytic fungi biodiversity in Dipterocarp forest at Viengsa district Nan province, Thailand.This is the first report about biodiversity of endophytic fungi for this area. We also tested for antimicrobial activity against reference microorganisms such as *Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, Pseudomonas aerogenosa, Escherichia coli and Candida albicans* by paper disk susceptibility test, and anticancer activity against reference human cancer cell line including breast (BT 474), hepatoma (HEP-G2), gastric (KATO III), lung (CHAGO) and colon (SW620) by MTT assay. Eighteen fungi morphotaxa were selected and characterized from 302 cultures, which were isolated from 400 samples. The colonization frequency of endophytic fungi in wet season are higher than dry season. Species of *Phyllosticta* sp.1 (60 isolates), *Phomopsis* sp.1 (54 isolates) and *Xylaria* sp.1 (44 isolates) were the most frequently found. Endophytic fungi from different groups mainly belonged to coelomycetes, followed by ascomycetes and hyphomycetes respectively. The crude extract of endophytic fungi showed antimicrobial activity against tested microorganisms. They inhibited Gram positive bacteria more than Gram negative bacteria. The crude extract of endophytic fungi strain DTD 6 and FID 15 which were isolated from *Dipetrocarpus tuberculatus* Roxb. and *Flacourtia indic* Merr. inhibited specifically on gastric cancer cell line (KATO III). The ethyl acetate extract of 2 cultures broth were isolated by extraction, chromatographic technique and crystallization to give 2 compounds. On basic of physical properties and spectroscopic data, they were elucidated as 4-ethylmethoxybenzene and cytochalasin D. cytochalasin D showed activities against SW620, KATO III and Hep- G2 with IC_{50} value of 4.66, 5.84 and 4.79 µg/ml, respectively.

Field of study :….Biotechnology……..Student's signature……...……

Academic year :……2008.....Advisor's signature……..……...

Co-Advisor's signature…..……..…

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.โสภณ เริงสำราญ อาจารย์ที่ปรึกษาและ รองศาสตราจารย์ ดร.ประกิตติ์สิน สีหนนทน์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ให้คำแนะนำในการทำวิจัย ช่วยตรวจและแก้วิทยานิพนธ์เล่มนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ ก๊กผล ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ และรองศาสตราจารย์ ดร.ธีรวัฒน์ มงคลอัศวรัตน์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำแก่ผู้เขียน และช่วยตรวจและแก้วิทยานิพนธ์เล่มนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.นาตยา งามโรจนวณิชย์ รองศาสตราจารย์ ดร.สุรชัย พรภคกุล และ คุณทรงจันทร์ ภู่ทอง ที่ช่วยเหลือในการทำวิจัย รวมทั้ง ขอขอบคุณ คุณสุกัญญานี แซ่ประเสริฐ คุณจตุพล เหลี่ยงสกุล คุณธีระพงษ์ โห คุณสุปรานี แสงทอง เพื่อนๆ และเจ้าหน้าที่หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ

ขอขอบคุณ หน่วยวิจัยพรรณไม้ประเทศไทย ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยและ พิพิธภัณฑ์พืชสิรินธร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ช่วยพิสูจน์ชนิดพรรณไม้ที่ใช้ในงานวิจัยนี้

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ขอบคุณพี่ชาย น้องสาว และน้องชาย ที่ให้การสนับสนุนในการศึกษา และความช่วยเหลือในทุกๆเรื่อง เป็นแรงผลักดันและเป็นกำลังใจที่ดีที่สุดให้แก่ผู้เขียนจนสำเร็จการศึกษา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ
กิตติกรรมประกาศ..... ฉ
สารบัญ..... ช
สารบัญตาราง..... ฌ
สารบัญภาพ..... ฎ
บทที่
1. บทนำ..... 1
2. เอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 4
2.1 เชื้อรา..... 4
2.2 ราเอนโดไฟต์..... 13
2.3 การจัดกลุ่มราเอนโดไฟต์ในทางนิเวศวิทยา..... 15
2.4 ความจำเพาะต่อพืชให้อาศัยของเอนโดไฟต์..... 16
2.5 ความจำเพาะของเอนโดไฟต์ในแง่การสร้างเอนไซม์..... 17
2.6 ประโยชน์ที่พืชได้รับจากราเอนโดไฟต์..... 17
2.7 ป่าเต็งรัง..... 18
2.8 ตัวอย่างพืชในป่าเต็งรังที่ใช้ในการศึกษา..... 21
2.9 การศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของราเอนโดไฟต์ ในประเทศไทย..... 24
2.10 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพสารทุติยภูมิที่ผลิตจากราเอนโดไฟต์..... 26
2.11 อะพ็อบโทซิส..... 32
3 วิธีการดำเนินงานวิจัย..... 35
3.1 อุปกรณ์..... 35
3.2 สารเคมี..... 37
3.3 เก็บตัวอย่าง แยกราเอนโดไฟต์ และการเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์..... 38
3.4 จำแนกชนิดและศึกษาความหลากหลายของราเอนโดไฟต์..... 39
3.5 สกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ..... 39
3.6 ทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ..... 39
3.7 พิสูจน์เอกลักษณ์ทางอณูชีววิทยาของราเอนโดไฟต์ที่คัดเลือกได้..... 42
3.8 การแยกองค์ประกอบทางเคมีของส่วนสกัดและการทำให้บริสุทธิ์..... 43

บทที่ หน้า

3.9 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ 46
3.10 การพิสูจน์เอกลักษณ์สารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปี 46
4 ผลการทดลอง และวิจารณ์ผลการทดลอง 47
4.1 การเก็บตัวอย่างใบพืช 47
4.2 ราเอนโดไฟต์ที่แยกจากใบพืชในป่าเต็งรังทั้ง 10 ชนิด 48
4.3 การศึกษาความหลากหลายของราเอนโดไฟต์ ที่แยกจากพืชในป่าเต็งรัง ทั้ง 10 ชนิด 70
4.4 การทดสอบการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ 78
4.5 ราเอนโดไฟต์ที่คัดเลือกได้ 90
4.6 การพิสูจน์เอกลักษณ์ทางอณูชีววิทยา 90
4.7 การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ ที่แยกได้จากราเอนโดไฟต์ที่คัดเลือกได้ 94
4.8 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ 98
5 สรุปผลการทดลอง 99
รายการอ้างอิง 100
ภาคผนวก
ภาคผนวก ก สูตรอาหาร สารเคมี และการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ 109
ภาคผนวก ข อาหาร สารเคมี และวิธีเตรียมที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ 111
ภาคผนวก ค สารเคมี และวิธีการเตรียมที่ใช้ในเทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์ 113
ภาคผนวก ง ข้อมูลสเปกโทรสโกปี 115
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 124

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	พอลิเมอร์ที่สำคัญที่อยู่ในผนังเซลล์รา และใช้ในการจัอนุกรมวิธาน.....	8
2.2	โรคที่มีผลต่อการเพิ่มหรือลดของปรากฏการณ์อะพ็อบโทซิส.....	33
2.3	สารหรือปรากฏการณ์ที่กระตุ้นให้เกิดอะพ็อบโทซิส.....	34
3.1	การแยกส่วนสกัดจากราเอนโดไฟต์ สายพันธุ์ FID 15…….....	45
4.1	ตัวอย่างพืชในป่าเต็งรังที่นำมาใช้แยกราเอนโดไฟต์…….....	47
4.2	ราเอนโดไฟต์ที่แยกจากใบยางพลวง (*Dipterocarpus tuberculatus* Roxb).....	50
4.3	จำนวนราเอนโดไฟต์ที่แยกจากใบยางพลวง (*Dipterocarpus tuberculatus* Roxb.) เปรียบเทียบระหว่างฤดูแล้งและฤดูฝน.....	51
4.4	ราเอนโดไฟต์ที่แยกจากใบส้านหิ่ง (*Dillenia parviflora* Griff.).....	52
4.5	จำนวนราเอนโดไฟต์ที่แยกจากใบส้านหิ่ง (*Dillenia parviflora* Griff.) เปรียบเทียบ ระหว่างฤดูแล้งและฤดูฝน…….....	53
4.6	ราเอนโดไฟต์ที่แยกจากใบรัง (*Shorea siamensis* Miq.)…….....	54
4.7	จำนวนราเอนโดไฟต์ที่แยกจากใบรัง (*Shorea siamensis* Miq.) เปรียบเทียบระหว่างฤดูแล้งและฤดูฝน.....	55
4.8	ราเอนโดไฟต์ที่แยกจากใบชะมวง (*Garcinia nigrolineata* Planch.)……...	56
4.9	จำนวนราเอนโดไฟต์ที่แยกจากใบชะมวง (*Garcinia nigrolineata* Planch.) เปรียบเทียบ ระหว่างฤดูแล้งและฤดูฝน.....	56
4.10	ราเอนโดไฟต์ที่แยกจากใบเต็ง (*Shorea obtusa* Wall.).....	58
4.11	จำนวนราเอนโดไต์ที่แยกจากใบเต็ง (*Shorea obtusa* Wall.) เปรียบเทียบ ระหว่างฤดูแล้งและฤดูฝน…….....	58
4.12	ราเอนโดไฟต์ที่แยกจากใบไผ่ (*Bambusa arundinacea* Willd.).....	60
4.13	จำนวนราเอนโดไฟต์ที่แยกจากใบไผ่ (*Bambusa arundinacea* Willd.) เปรียบเทียบระหว่างฤดูแล้งและฤดูฝน.....	61
4.14	ราเอนโดไฟต์ที่แยกจากใบโมกเครือ (*Aganosma marginata* G. Don)…….....	62
4.15	จำนวนราเอนโดไฟต์ที่แยกจากใบโมกเครือ (*Aganosma marginata* G. Don) เปรียบเทียบระหว่างฤดูแล้งและฤดูฝน.....	63

ตารางที่ หน้า

4.16 ราเอนโดไฟต์ที่แยกใบส้านใบเล็ก (*Dillenia ovata* Wall. ex Hook. f. & Th.)..... 64
4.17 จำนวนราเอนโดไฟต์ที่แยกจากใบส้านใบเล็ก(*Dillenia ovata* Wall.ex Hook. f.& Th.) เปรียบเทียบระหว่างฤดูแล้งและฤดูฝน..... 65
4.18 ราเอนโดไฟต์ที่แยกจากใบตะขบป่า (*Flacourtia indic* Merr)..... 66
4.19 จำนวนราเอนโดไฟต์ที่แยกจากใบตะขบป่า (*Flacourtia indic* Merr) เปรียบเทียบระหว่างฤดูแล้งและฤดูฝน..... 67
4.20 ราเอนโดไฟต์ที่แยกจากใบชิงชัน (*Dalbergia oliveri* Gamble.)..... 68
4.21 จำนวนราเอนโดไฟต์ที่แยกจากใบชิงชัน (*Dalbergia oliveri* Gamble.) เปรียบเทียบระหว่างฤดูแล้งและฤดูฝน..... 69
4.22 จำนวนราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากพืชแต่ละชนิด..... 71
4.23 colonization frequency (CF%) ของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากใบพืชแต่ละชนิด..... 72
4.24 จำแนกกลุ่มของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้..... 73
4.25 ผลการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบโดยสารสกัดจากราเอนโดไฟต์..... 79
4.26 จำนวนราเอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ..... 83
4.27 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง..... 84
4.28 ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆของสารบริสุทธิ์..... 98
4.29 การกระตุ้นการตายแบบอะพ็อบโทซิสของมะเร็งชนิดต่างๆของสารบริสุทธิ์..... 98

สารบัญภาพ

ภาพประกอบ		หน้า
2.1	โครงสร้างและองค์ประกอบภายในเส้นใยรา.....	5
2.2	ลักษณะการเจริญของเส้นใยราที่มีผนังกั้น.....	7
2.3	ลักษณะผนังกั้นของเซลล์ราแบบต่างๆ.....	9
2.4	สปอร์ที่สร้างขึ้นจากกระบวนการที่ไม่อาศัยเพศ.....	10
2.5	แอสโคสปอร์แบบต่างๆที่สร้างขึ้นจากกระบวนการที่อาศัยเพศ.....	11
2.6	ลักษณะภาพตัดขวางของแอสโคคาร์ปหรือแอสโคมา (ascoma) แบบต่างๆ.....	12
2.7	การพัฒนาแคลมพ์คอนเนคชัน และการเกิดเบสิดิโอสปอร์บนเบสิเดียม.....	12
2.8	ลักษณะโครงสร้างสืบพันธุ์แบบไม่อาศัย (conidial fructification) ชนิดต่างๆ.....	13
2.9	ราเอนโดไฟต์ที่อาศัยในเนื้อเยื่อพืช.....	13
2.10	วงชีวิตของราเอนโดไฟต์ที่อยู่ในหญ้า	15
2.11	ตัวอย่างพืชในป่าเต็งรังที่ใช้ในการศึกษา.....	22
2.12	โครงสร้างทางเคมีของ Taxol, Sequoiatones A, Sequoiatones B และBrefeldin A……..….....	29
2.13	โครงสร้างทางเคมีของ Cytonic acid A และ Cytonic acid B , โครงสร้างทางเคมีของ Subglutinol A, โครงสร้างทางเคมีของ Isopestacin , โครงสร้างทางเคมีของ Ergot alkaloid…….....	31
4.1	ปริมาณน้ำฝนและระดับความชื้นสัมพัทธ์…….....	48
4.2	ราเอนโดไฟต์ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกัน จากพืชในป่าเต็งรัง จ.น่านทั้ง 2 ฤดู…….....	49
4.3	เปอร์เซ็นต์ราเอนโดไฟต์จากใบพลวงเปรียบเทียบระหว่างฤดูแล้งและฤดูฝน.....	51
4.4	เปอร์เซ็นต์ราเอนโดไฟต์จากใบส้านหิ่งเปรียบเทียบระหว่างฤดูแล้งและฤดูฝน.....	53
4.5	เปอร์เซ็นต์ราเอนโดไฟต์จากใบรังเปรียบเทียบระหว่างฤดูแล้งและฤดูฝน.....	55
4.6	เปอร์เซ็นต์ราเอนโดไฟต์จากใบชะมวงเปรียบเทียบระหว่างฤดูแล้งและฤดูฝน……..	57
4.7	เปอร์เซ็นต์ราเอนโดไฟต์จากใบเต็งเปรียบเทียบระหว่างฤดูแล้งและฤดูฝน.....	59
4.8	เปอร์เซ็นต์ราเอนโดไฟต์จากใบไผ่เปรียบเทียบระหว่างฤดูแล้งและฤดูฝน.....	61
4.9	เปอร์เซ็นต์ราเอนโดไฟต์จากใบโมกเครือเปรียบเทียบระหว่างฤดูแล้งและฤดูฝน.....	63
4.10	เปอร์เซ็นต์ราเอนโดไฟต์จากใบส้านใบเล็กเปรียบเทียบระหว่างฤดูแล้งและฤดูฝน...	65

ภาพประกอบ หน้า

4.11 เปอร์เซ็นต์ราเอนโดไฟต์จากใบตะขบป่าเปรียบเทียบระหว่างฤดูแล้งและฤดูฝน..... 67

4.12 เปอร์เซ็นต์ราเอนโดไฟต์จากใบชิงชันเปรียบเทียบระหว่างฤดูแล้งและฤดูฝน..... 69

4.13 จำนวนราเอนโดไฟต์กลุ่มต่างๆเปรียบเทียบระหว่างฤดูแล้งและฤดูฝน..... 74

4.14 ราเอนโดไฟต์ในกลุ่ม Coelomycetes..... …. 75

4.15 ราเอนโดไฟต์ในกลุ่ม Hyphomycetes..... 76

4.16 ราเอนโดไฟต์ในตระกูล Xylariaceae……..……... 77

4.17 แสดงการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบ..... 78

4.18 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ไอโซเลตที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 5 ชนิด..... 83

4.19 จำนวนส่วนสกัดที่มีการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ……..... 87

4.20 การเกิดอะพ็อบโทซิสของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO III)..... 88

4.21 เปอร์เซ็นการตายแบบอะพ็อบโทซิสสูงสุดของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร..... 89

4.22 PCR product บนอะกาโรสเจลของราเอนโดไฟต์..... 90

4.23 เปรียบเทียบลำดับเบสของราเอนโดไฟต์ DTD 6 กับฐานข้อมูล Genbank…… 91

4.24 แผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ของ *Nodulisporium* sp. JP807
กับสายพันธุ์ใกล้เคียง……..... 92

4.25 เปรียบเทียบลำดับเบสของราเอนโดไฟต์ FID 15 กับฐานข้อมูล Genbank..... 92

4.26 แผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ของ *Xylaria* sp. I1070911
กับสายพันธุ์ใกล้เคียง..... 93

4.27 โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ 1..... 94

4.28 4-allylanisole (estragole)..... 95

4.29 โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ 2..... 97

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันมีความต้องการจัดหาตัวยาชนิดใหม่มาแก้ไขปัญหาสุขภาพ โดยการใช้ประโยชน์จากยา หรือสารประกอบต่างๆ เพื่อช่วยในการรักษาหรือบรรเทาอาการเจ็บป่วยของมนุษย์ เช่น ยาที่ใช้ต้านแบคทีเรีย โรคที่เกี่ยวกับไวรัส โรคติดเชื้อต่างๆ ยาต้านมะเร็ง เป็นต้น

ราเอนโดไฟต์ (Endophytic fungi) เป็นราที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อของพืชได้แก่ ราก ใบ ลำต้น และกิ่งโดยไม่ทำลายเซลล์พืช และไม่ก่อให้เกิดอาการของโรค นอกจากนี้ยังมีบทบาทสำคัญในการช่วยป้องกันพืชจากโรคอีกด้วย ราเอนโดไฟต์ถูกค้นพบครั้งแรกในพืชตระกูลหญ้า (Breen, 1994) และพบว่ามีความสามรถสร้างสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ได้หลากหลาย ราเอนโดไฟต์ชนิดหนึ่งสามารถอาศัยอยู่ในพืชได้ในหลายๆชนิด โดยราเอนโดไฟต์แต่ละชนิดจะมีลักษณะเฉพาะที่แตกต่างกันออกไปเมื่ออยู่ในสภาวะแวดล้อมหรือภูมิประเทศที่แตกต่างกัน โดยในปัจจุบันมีการศึกษาพบว่าราเอนโดไฟต์มีความสัมพันธ์กับการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในพืช ซึ่งเป็นแหล่งผลิตที่แปลกใหม่ของธรรมชาติ สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ในหลายๆด้านเช่น การแพทย์ ด้านเกษตรกรรม และด้านอุตสาหกรรม สารต้านจุลินทรีย์ก่อโรค (antibiotics) ที่ผลิตจากราเอนโดไฟต์มีความเป็นพิษต่ำ ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมน้อย ในปัจจุบันได้มีการผลักดันให้มีการพัฒนาสารต้านจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อในมนุษย์ ได้แก่ *Staphylococcus* sp. *Mycobacterium* sp. *Streptococcus* sp. เป็นต้น นอกจากนี้ยังถูกนำมาใช้ในการลดความเสี่ยงจากเชื้อฉวยโอกาสเช่น *Aspergillus* spp. *Cryptococcus* spp. *Candida* spp. และใช้ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งอีกด้วย (Strobel และ Daisy, 2003) ปัจจุบันได้มีผู้ศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอนโดไฟต์ และนำสารที่ค้นพบชนิดใหม่มาประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ เช่น

Strobel et.al (1996) สามารถสกัด Taxol จาก *Pestalotiopsis microspor*a ราเอนโดไฟต์ภายในเปลือกของก้าน Himalayan yew (*Taxus wallachiana*) ซึ่งเป็นสารที่พบได้จากพืชในสปีชีส์ Taxus และเป็นการค้นพบสารชนิดใหม่ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง

Isaka และคณะ(2001) ได้พบ xanthone dimers ใหม่ ที่สกัดได้จากราเอนโดไฟต์ *Phomopsis* sp. BCC 1323 จากการทดลองในหลอดทดลองพบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อมาลาเรีย และมีฤทธิ์ยับยั้งวัณโรคและมีฤทธิ์ทำลายเซลล์มะเร็งได้อีกด้วย

นอกจากนี้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอนโดไฟต์ ยังสามารถนมาประยุกต์ทางการเกษตรได้ เช่นการศึกษาของ J. Hallmann และคณะ(1996) พบ gliotoxin จากราเอนโดไฟต์ได้แก

Fusarium oxysporum ที่แยกจากรากของมะเขือเทศ โดยสามารถยับยั้งและทำลายไส้เดือนฝอย (*Meloidogyne incognita*) ซึ่งเป็นสาเหตุของโรครากปม (Root Knot Disease)

ราเอนโดไฟต์ยังได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในแง่ของการเป็นจุลินทรีย์ชนิดใหม่ที่ยังไม่เคยมีการค้นพบมาก่อน (new species) โดยพืชในท้องถิ่นต่างได้รับความสนใจที่จะใช้เป็นแหล่งศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพ และแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากนักวิทยาศาสตร์ในท้องถิ่นนั้นๆ (Azevedo และคณะ, 2000) ปัจจุบันเชื่อว่ามีราอยู่มากกว่าหนึ่งล้านชนิด แต่มีค้นพบเพียงหนึ่งแสนชนิดเท่านั้น (Hawkswort และ Rosman, 1987) ดังนั้นราเอนโดไฟต์จึงยังอาจจะมีอย่างน้อยที่สุดถึงหนึ่งล้านชนิด (Dreyfuss และ Chapela, 1994)

ราเอนโดไฟต์ในบริเวณป่าเขตร้อนจะมีความหลากหลายมาก และพบว่าสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดได้มีประสิทธิภาพที่สูง (Bill และคณะ, 2002) จากการศึกษาพบว่าความหลากหลายทางชีวภาพจะสอดคล้องกับความหลากหลายทางเคมี เพราะสารประกอบทางเคมีมีคุณสมบัติในการเปลี่ยนแปลงสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในระบบนิเวศ โดยกระตุ้นให้สิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีวิวัฒนาการเพื่อให้สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ จะสังเกตได้ว่าในบริเวณป่าเขตร้อนเป็นสภาพแวดล้อมที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูงจึงเป็นที่น่าสนใจ และมีความเป็นไปได้สูงที่บริเวณป่าเขตร้อนจะเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ๆ (Redell และคณะ, 2002)

ป่าเต็งรัง (Dipterocarp forest) เป็นป่าในเขตร้อนซึ่งพบในประเทศในแถบเอเชีย โดยเฉพาะประเทศไทย ลาว กัมพูชา พม่า สำหรับในประเทศไทยพบมากบริเวณภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มีปรากฏตั้งแต่ความสูงจากระดับน้ำทะเล 50 เมตร ขึ้นไปจนถึง 1,000 เมตร ขึ้นได้ในที่ดินค่อนข้างแห้งแล้งเป็นดินทรายหรือดินลูกรัง ในฤดูแล้งถ้าเป็นดินลูกรังดินจะตื้นมีสีค่อนไปทางแดงคล้ำ บางแห่ง จึงเรียกป่าชนิดนี้ว่า “ป่าแดง” ลักษณะของป่าเต็งรังเป็นป่าโปร่ง ประกอบด้วยต้นไม้ผลัดใบขนาดกลาง และขนาดเล็กขึ้นห่างๆ กระจัดกระจายไม่ค่อยแน่นทึบ พรรณไม้เด่นในป่าเต็งรัง ได้แก่ พลวง (*Dipterocarpus tuberculatus*), เต็ง (*Shorea obtusa*), รัง (*Shorea siamensis*), กระโดน (*Careya sphaerica*), ยอป่า (*Morinda pubescens*), ประดู่ป่า (*Pterocarpus macrocarpus*), โมกใหญ่ (*Holarrhena pubescens*) เป็นต้น

ป่าเต็งรังในเขตจังหวัดน่านเป็นจุดที่น่าสนใจในการเข้าไปศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของราเอนโดไฟต์ เนื่องจากยังไม่เคยมีการเข้าไปศึกษาในเรื่องความหลากหลายทางชีวภาพของราเอนโดไฟต์ อีกทั้งป่าเต็งรังอุดมไปด้วยพืชที่มีใบขนาดใหญ่ จึงน่าจะพบราเอนโดไฟต์เป็นจำนวนมาก ทำให้มีโอกาสในการพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ได้มากยิ่งขึ้น

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นในการแยกราเอนโดไฟต์จากพืชในป่าเต็งรังจังหวัดน่าน โดยจะใช้ตัวอย่างพืช 10 ชนิดได้แก่ พลวง (*Dipterocarpus tuberculatus*), ส้าน (*Dillenia parviflora*), ชะมวง (*Garcinia nigrolineata*), ตะขบป่า (*Flacouratia indica*), โมกเครือ (*Aganosma marginate*), เต็ง (*Shorea obtusa*), เหมือด (*Aporusa ficifolia*), ไผ่, ชิงชัน (*Dalbergia oliveri*), รัง

(*Shorea siamensis*) ซึ่งจะเก็บตัวอย่าง 2 ครั้ง ครั้งแรกในฤดูแล้งโดยเก็บในช่วงเดือนมกราคม พ.ศ. 2550 ครั้งที่สองในช่วงฤดูฝนโดยเก็บในช่วงเดือนตุลาคม พ.ศ. 2550 เนื่องจากชนิด และจำนวนของราเอนโดไฟต์ในพืชตัวอย่างเดียวกันจะแตกต่างกันเมื่อเปลี่ยนฤดูกาล จากนั้นทำการทดสอบความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เพื่อหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ที่มีประสิทธิภาพสูงในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค และยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของราเอนโดไฟต์ในป่าเต็งรัง อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน
2. จำแนกชนิดของราเอนโดไฟต์
3. ทดสอบความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

ขอบเขตของการวิจัย

1. ศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพเอนโดไฟต์ที่แยกจากใบพืชในป่าเต็งรัง อำเภอเวียงสา จังหวัด น่าน

2. ศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอนโดไฟต์ ในการต้านจุลินทรีย์ก่อโรค และยับยั้งเซลล์มะเร็ง

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ราเอนโดไฟต์ ที่มีความสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค และเซลล์มะเร็ง

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

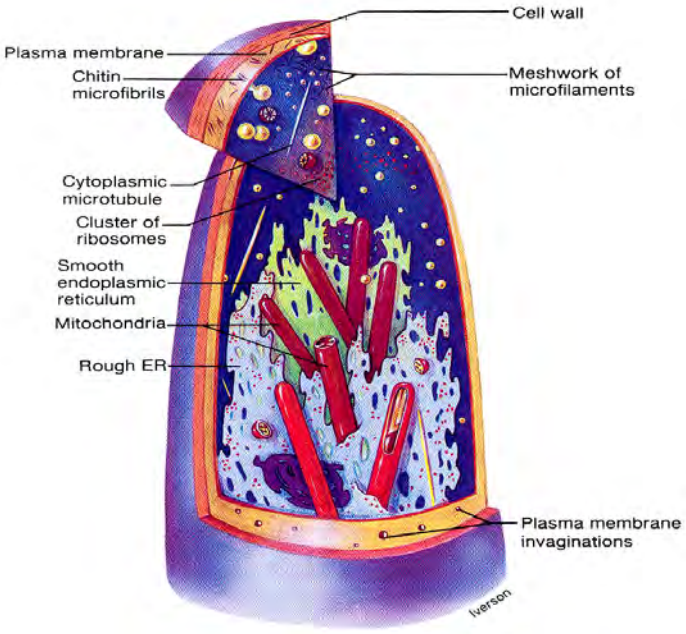
2.1 เชื้อรา

รา (fungi) เป็นจุลินทรีย์ประเภท eukaryotic จึงไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส (nuclear membrane) ไม่มี chlorophyll โครงสร้างของราส่วนใหญ่เป็นเส้นสาย (filament) นอกจากนี้ยังมีราที่มีลักษณะการเจริญเป็นเซลล์เดี่ยว (unicellular cell) ได้แก่ยีสต์ (yeast) (รูปที่ 2.1) เส้นใยถ้าอยู่รวมกันเรียกว่า mycelium ภายในเส้นใยมีผนังกั้นตามขวาง (septate hypha) ยกเว้นราชั้นต่ำจะสร้างเส้นใยที่ไม่มีผนังกั้น (coenocytic hypha) (รูปที่ 2.2) ซึ่งลักษณะของผนังกั้นเซลล์รามีหลายแบบ (รูปที่ 2.3) แม้ว่ายีสต์บางชนิดมีสามารถสร้างเส้นใยได้เหมือนราแต่ก็ไม่เด่นชัด เหมือนเชื้อราทั่วไป โดยปกติยีสต์เพิ่มจำนวนเซลล์โดยการแตกหน่อ (budding)

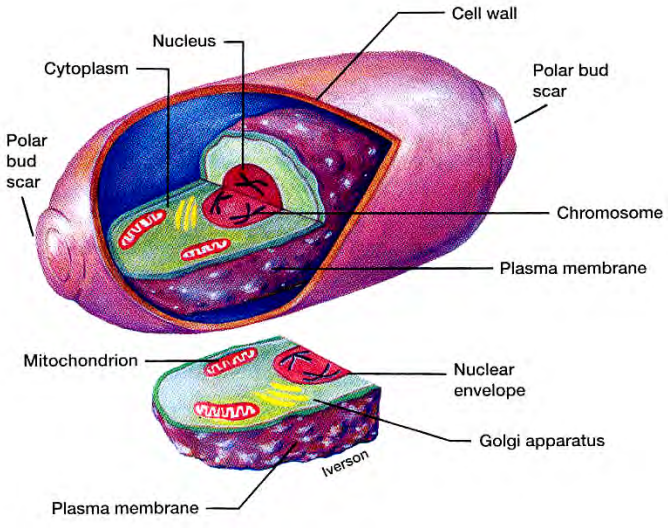
ราสามารถสร้างสปอร์เพื่อใช้ในการสืบพันธุ์ ซึ่งมีทั้งแบบอาศัยเพศ (sexual) และไม่อาศัยเพศ (asexual) (รูปที่ 2.4 และ 2.5 ตามลำดับ)ทำให้สามารถจัดจำแนกราเป็นกลุ่มใหญ่ๆได้ ลักษณะโครงสร้างก็สามารถใช้แบ่งได้เช่นกัน เช่น ผนังเซลล์ของราประกอบด้วยพอลิเมอร์ที่สำคัญได้แก่ ไคติน (chitin) ยกเว้นราในกลุ่ม Hyphochytridiomycetes และ Oomycetes ที่ผนังเซลล์เป็นเซลลูโลส (cellulose) (ตารางที่2.1) ราสะสมอาหารในรูปแบบของ glycogen ซึ่งต่างจากพืชที่สะสมอาหารในรูปของแป้ง (starch) ในระบบนิเวศราสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ในหลายรูปแบบ เช่น เชื้อราที่ดำรงชีวิตอยู่ในสภาวะย่อยสลาย (saprophyte) สภาวะปรสิต (parasite) และสภาวะที่ต้องพึ่งพาอาศัยกัน (mutualism) ราเป็นจุลินทรีย์ไม่มี chlorophyll จึงไม่สามารถสังเคราะห์ด้วยแสงได้ ราจะสร้างเอนไซม์ (extracllular enzyme) ออกมาย่อยสลายอินทรีย์สารแล้วจึงดูดซึมเข้าสู่เซลล์ เซลล์เชื้อราเป็นแบบ eukaryotic ต่างจากแบคทีเรียที่เป็นแบบ prokaryotic ราจะมี nuclear membrane, mitochondria, endoplasmic reticulum การเจริญของเส้นใยของราเจริญมาจากส่วนปลาย (hyphal tip) ซึ่งเป็นส่วนที่ active ที่สุด บริเวณที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเรียกว่า apical growth region มีขอบเขตประมาณ 100 ไมครอน จากส่วนปลายเข้าไปบริเวณนี้ไม่มี vacuole ภายใน cytoplasm ส่วนใหญ่เป็น RNA และโปรตีน พบว่ามี mitochondria อยู่เป็นจำนวนมากบริเวณ 3.0-7.5 ไมครอน บริเวณส่วนปลายพบว่ามี vesicle จำนวนมาก จากการศึกษาพบว่า vesicle ไปรวมรวมกับเซลล์ เมมเบรนบริเวณส่วนปลายเส้นใย

ราบางชนิดมีความสำคัญ โดยราที่จะสร้างสารปฏิชีวนะเอนไซม์, กรดอินทรีย์ และสารสีที่มีประโยชน์ต่ออุตสาหกรรม ราบางชนิดเป็นราก่อโรคในสัตว์และพืช แต่สารจากเชื้อราบางอย่างถูกสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ เช่น gibberelin จากเชื้อรา *Gibberella fugikuroi* นำมาใช้ในการส่งเสริมการเจริญของพืช และสาร alkaloid (ergot) จากรา *Claviceps purpurea* สามารถ

นำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์รวมทั้ง cyclosporine แยกได้จากราในดิน *Tolypocladium* ใช้กดภูมิคุ้มกันของร่างกาย ซึ่งช่วยป้องกันการปฏิเสธการเปลี่ยนถ่ายอวัยวะในมนุษย์ จากการค้นพบสารที่มีประโยชน์จากราดังกล่าวทำให้ในปัจจุบันมีการศึกษาวิจัยค้นคว้าเชื้อรา ที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดต่างๆ เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในด้านการแพทย์ และอุตสาหกรรม



(A)



(B)

รูปที่ 2.1 โครงสร้างและองค์ประกอบภายในเส้นใยรา (A), โครงสร้างและองค์ประกอบภายในเซลล์ยีสต์ (B)

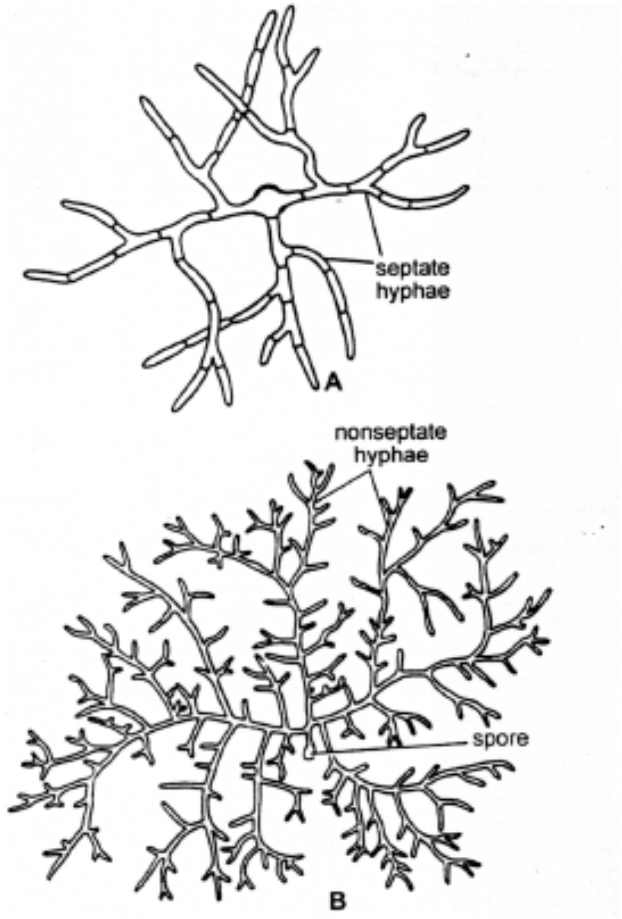
นักราวิทยาได้จัดจำแนกราที่แท้จริง (true fungi) ออกเป็น 4 ไฟลัม (Phylum) โดยอาศัยโครงสร้างสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศเป็นหลัก (Alexopoulos และคณะ , 1996) ดังนี้

1. Zygomycota เป็นไฟลัมของเชื้อราที่มีการสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศที่เรียกว่า สปอร์แรงจิโอสปอร์ ภายในสปอร์แรงเจียม และสร้างสปอร์แบบอาศัยเพศเรียกว่า ไซโกสปอร์ โดยทั่วไปเส้นใยของราเหล่านี้เป็นเส้นใยแบบไม่มีผนังกั้น และอาจมีจำนวนนิวเคลียสภายในแต่ละเซลล์พียงหนึ่ง (uninucleate) หรือหลายนิวเคลียส (multinucleate)

2. Ascomycota เป็นเชื้อราคลาสใหญ่ที่สุด ซึ่งมีคุณสมบัติสำคัญคือ สร้างแอสโคสปอร์ ที่ได้มาจากการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ ภายในถุงห่อหุ้มที่เรียกว่า แอสคัส แอสโคสปอร์มาจากกระบวนการไมโอซิส จัดเป็น meiotic products ชนิดหนึ่งในกลุ่มราชั้นสูง โดยทั่วไปหากไม่เกิดการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสต่อไป ก็จะมีจำนวนสี่แอสโคสปอร์ต่อถุงแอสคัสแต่เชื้อราหลายชนิดในคลาสนี้ มีแอสโคสปอร์ที่เกิดการเรียงลำดับเป็นแถวเรียงสี่(tetrad order) อยู่ภายในถุง โดยแต่ละแอสโคสปอร์จะมีการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสเพิ่มขึ้นอีกครั้งหนึ่ง จึงมีจำนวนสปอร์ทั้งหมดแปดแอสโคสปอร์ต่อถุงแอสคัส และแอสโคสปอร์เหล่านี้มีจีโนไทป์เหมือนกัน ราในไฟลัมนี้ยังแบ่งได้ออกเป็นสองคลาสย่อยคือ คลาส Hemiascomycetes ได้แก่ ยีสต์ และคลาสย่อยของราเส้นสายชั้นสูงที่แท้จริง (Euascomycetes) ซึ่งในคลาสหลังนี้ มีการสร้างโครงสร้างที่เรียกว่า ฟรุ้ตติ้งบอดี้ หรือแอสโคคาร์ป แอสโคคาร์ปทำหน้าที่ห่อหุ้มถุงแอสไซจำนวนมาก โดยมีจำนวนตั้งแต่หลายร้อยไปจนถึงหลายพันแอสไซ ลักษณะที่พบทั่วไปมี 3 แบบ คือ cleistothecium , perithecium และapothecium (รูปที่ 2.6)

3. Basidiomycota เป็นราชั้นสูงอีกคลาสหนึ่ง นอกเหนือจากแอสโคไมซิสที่กล่าวมาแล้ว ราในไฟลัมนี้รวมถึงเห็ดต่างๆที่มีขนาดใหญ่ (mushroom) และเห็ดขนาดเล็ก เบสิดิโอสปอร์เกิดขึ้นจากการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส เกิดขึ้นบนโครงสร้างที่มีลักษณะคล้ายกระบองเรียกว่า เบสิเดียม (basidium) (รูปที่ 2.7) ซึ่งจัดเป็นการแบ่งเซลล์แบบ meiotic ราในไฟลัมนี้ยังแบ่งได้อีก 2 คลาสย่อยได้แก่ Holobasidiomycetes ซึ่งเป็นราที่สร้างเบสิเดียมที่มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยวๆไม่มีผนังกั้น ได้แก่เห็ดต่างๆเช่น *Agaricus bissporus* , *Volvariella volvacea* เป็นต้น ส่วนอีกคลาสหนึ่งได้แก่ Heterobasidiomycetes เป็นเชื้อราที่สร้างเบสิเดียมที่มีลักษณะเป็นมีผนังกั้นแบ่งตามยาว หรือตามขวางของเส้นใย ได้แก่ราสนิม และราเขม่าดำ เป็นต้น

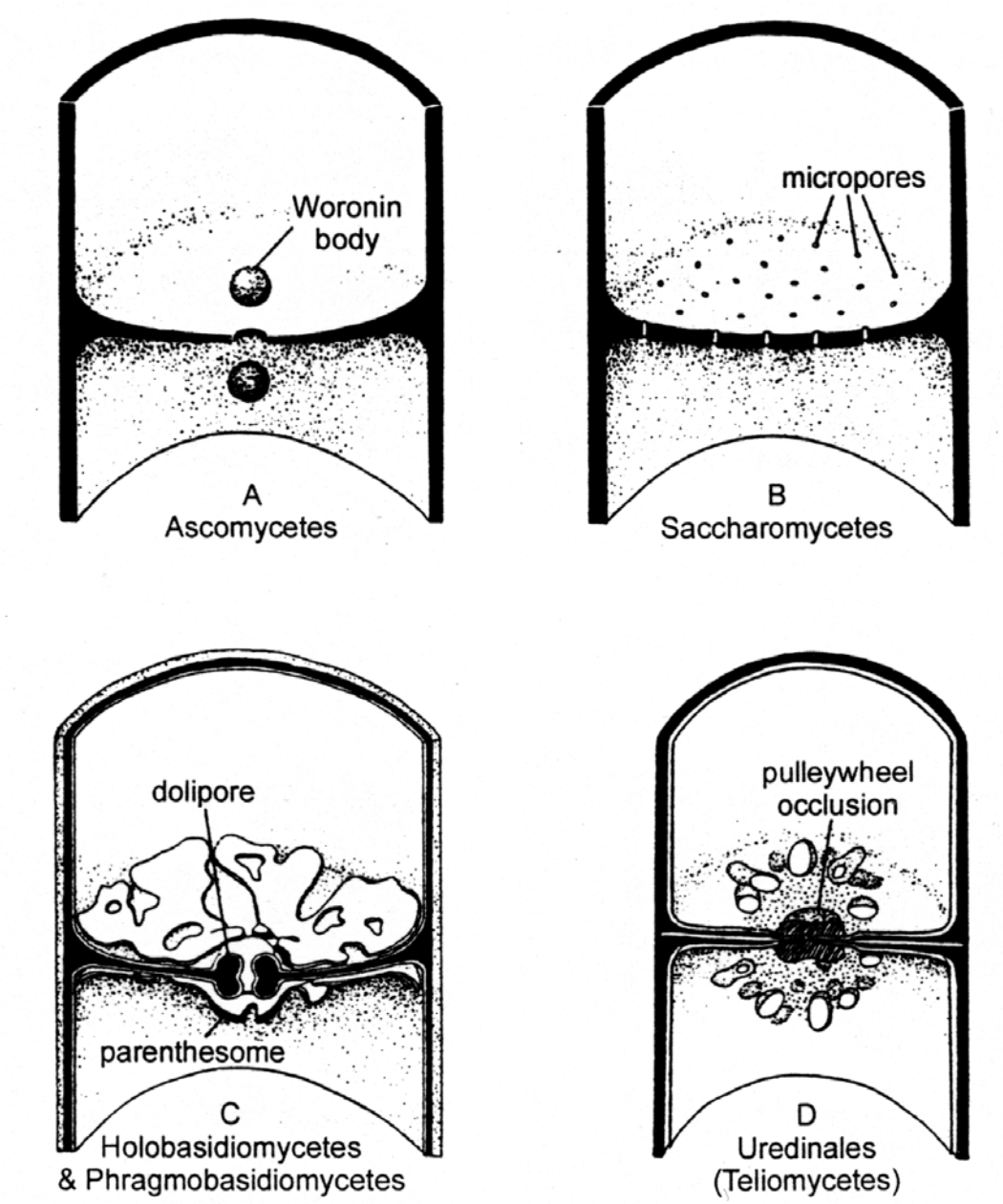
4. Fungi Imperfecti (Imperfect fungi) เป็นกลุ่มของราที่มารวมกลุ่มกันอยู่ชั่วคราว เพราะยังไม่ทราบระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ รากลุ่มนี้ส่วนใหญ่รวมกันอยู่ในลักษณะเป็นจีนัส (genus) ชั่วคราวที่เรียกว่า form genera และมีการจัดกลุ่มราโดยอาศัยลักษณะโครงสร้างการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ได้แก่ อะเซอวูลัส (acervulus) ,พิกนิเดีย (pycnidia) และโคนิเดียที่เกิดขึ้นในลักษณะต่างๆ (conidiogenesis) รวมทั้งรูปแบบของวิธีการสร้างโคนิเดีย (conidia) (รูปที่ 2.8) ได้แก่ arthrospore, blastospore, porospore เป็นต้น ราในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่มีความใกล้ชิด หรือเกี่ยวข้องกับราชั้นสูงในไฟลัมแอสโคไมโคตา และเบสิดิโอไมโคตา กล่าวคือราในกลุ่ม Imperfect fungi เมื่อมีการสร้างโครงสร้างสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศจะจัดให้มาอยู่ในไฟลัมของราชั้นสูง ซึ่งอาจจัดอยู่ในไฟลัมแอสโคไมซิส หรือเบสิดิโอไมซิส กล่าวคือ จะมีการสร้างเทเลโอมอร์ฟ (teleomorph) เป็นโครงสร้างของการสืบพันธุ์โดยอาศัยเพศของราที่อยู่ในไฟลัมแอสโคไมซิส หรือเบสิดิโอไมซิสนั่นเอง



รูปที่ 2.2 ลักษณะการเจริญของเส้นใยราที่มีผนังกั้น (A) และลักษณะการเจริญของเส้นใยราที่ไม่มีผนังกั้น (B) (Alexopoulos และคณะ , 1996)

ตารางที่ 2.1 พอลิเมอร์ที่สำคัญที่พบในผนังเซลล์รา และใช้ในการจัดอนุกรมวิธาน

กลุ่มอนุกรมวิธาน	พอลิเมอร์จำพวกเส้นใย (fibrous polymer)	พอลิเมอร์ที่คล้ายเจล (gel-like polymer)
Basidiomycetes	chitin	xylomannoproteins
	β-(1-3),β-(1-6)-Glucan	α-(1-3)-Glucan
Ascomycetes	chitin	galactomanoproteins
	β-(1-3),β-(1-6)-Glucan	α-(1-3)-Glucan
Zygomycetes	chitin	pologlucuronic acid
	chitosan	glucuronomanoproteins
Chytridiomycetes	chitin	glucan
Hyphochytridiomycetes	chitin	glucan
	cellulose	
Oomycetes	β-(1-3),β-(1-6)-Glucan	glucan
		cellulose



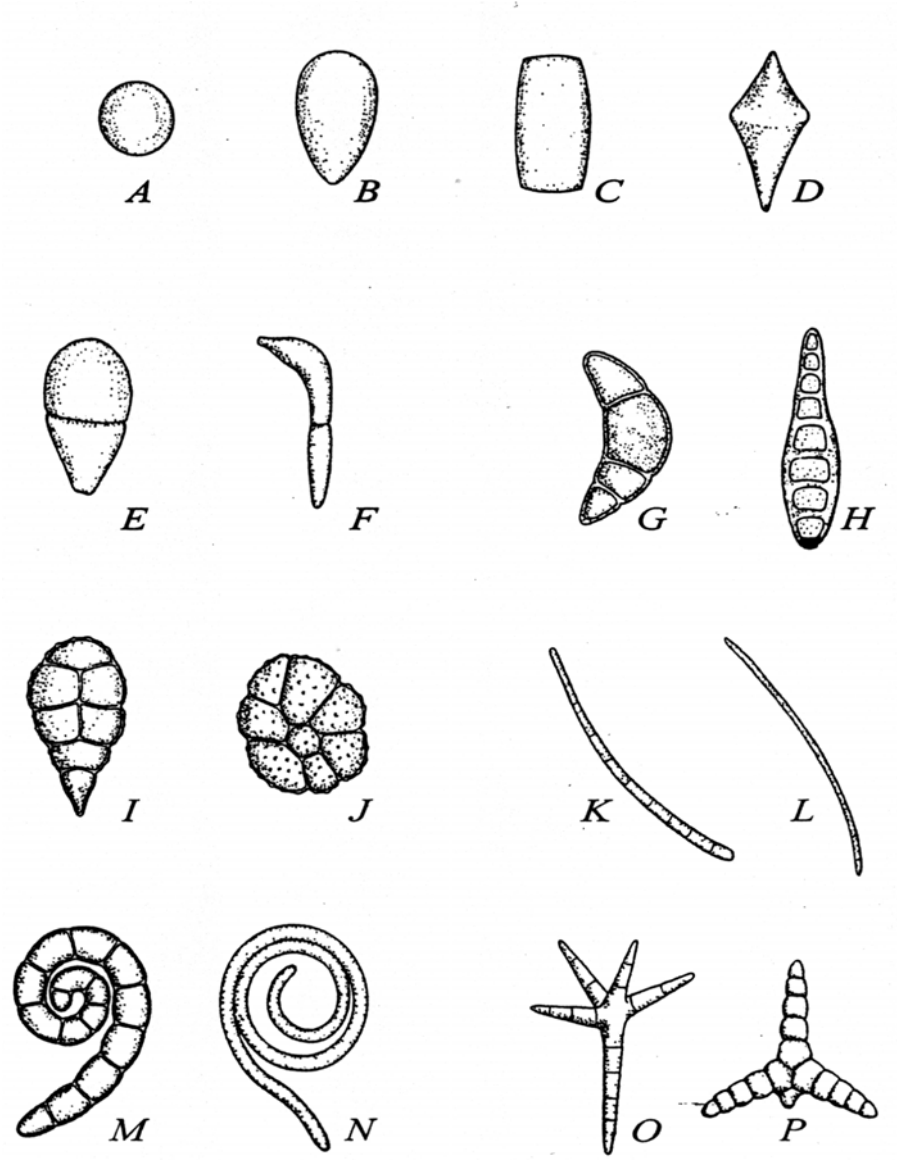
รูปที่ 2.3 ลักษณะของผนังกั้นเซลล์ราแบบต่างๆ (Alexopoulos และคณะ , 1996)

(A) ผนังกั้นแบบง่ายๆมีรูเปิดเพียงช่องเดียว (a simple pore) มี Woronon bodies อุดช่องได้

(B) ผนังมีรูเปิดเล็กๆหลายช่อง (micropores) พบในยีสต์กลุ่ม Saccharomycetes

(C) ผนังกั้นแบบ doliopore septum เกิดจากปลายของผนังแต่ละด้านยื่นมาพบกัน

(D) ผนังที่มีโครงสร้างคล้ายปลายลูกรอก (pulleywheel occlusion) พบในคลาสย่อยของเบสิดิโอไมซิส คือ Teliomycete



รูปที่ 2.4 สปอร์ที่สร้างขึ้นจากการกระบวนการแบบไม่อาศัยเพศแบบต่างๆ

(A-D) สปอร์ที่มีเซลล์เดี่ยวเรียกว่า amerospore

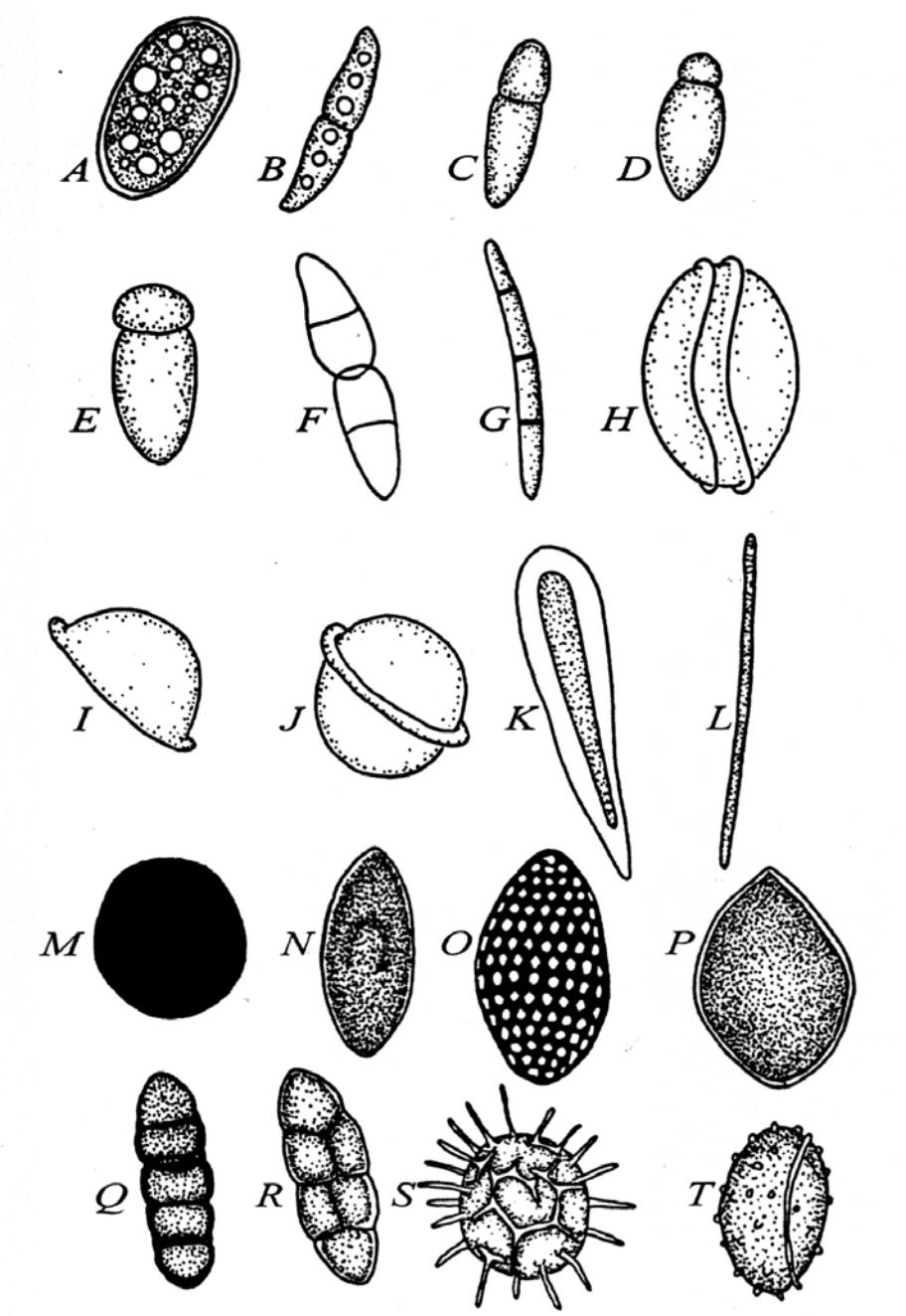
(E-F) สปอร์ที่มีสองเซลล์เรียกว่า didymospore

(G-H) สปอร์ที่มีมากกว่าสองเซลล์มีผนังกั้นตามขวาง เรียกว่า phragmospore

(I-J) สปอร์ที่มีผนังกั้นตามขวาง และตามยาว เรียกว่า dictyospore

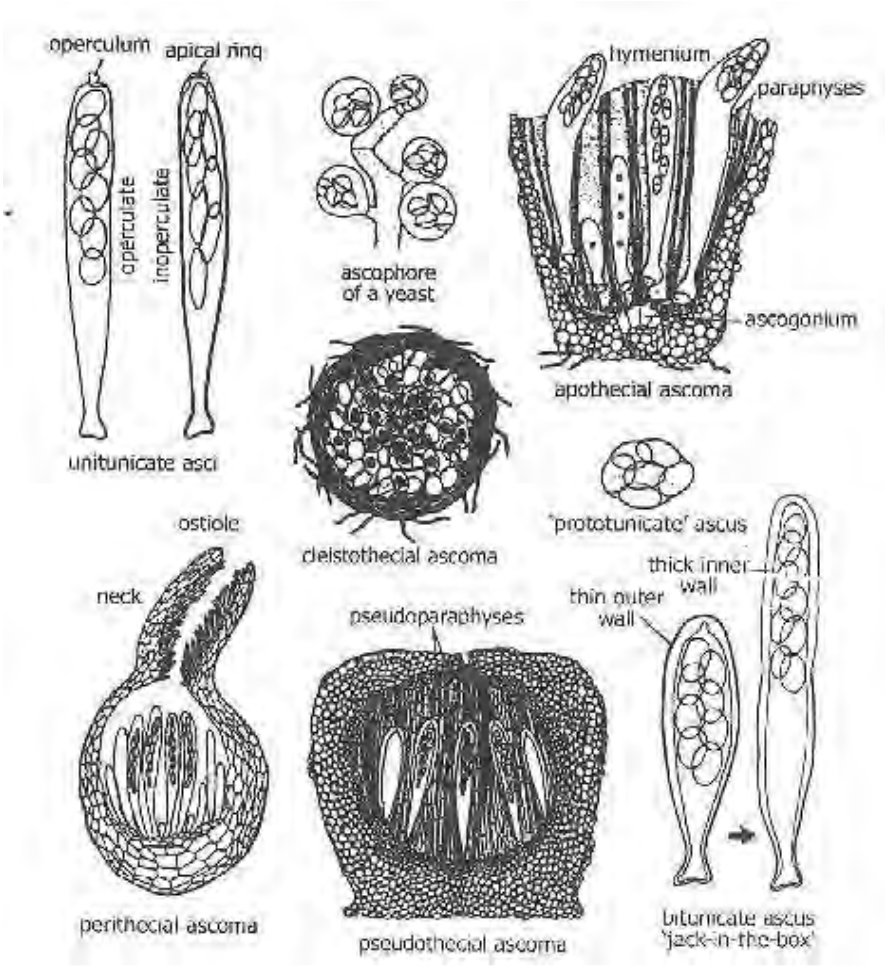
(M-N) สปอร์ที่มีรูปร่างม้วนงอ อาจมีหรือไม่มีผนังกั้นก็ได้ เรียกว่า helicospore

(O-P) สปอร์ที่มีรูปร่างเป็นแฉก อาจมีหรือไม่มีผนังกั้นก็ได้ เรียกว่า staurospore

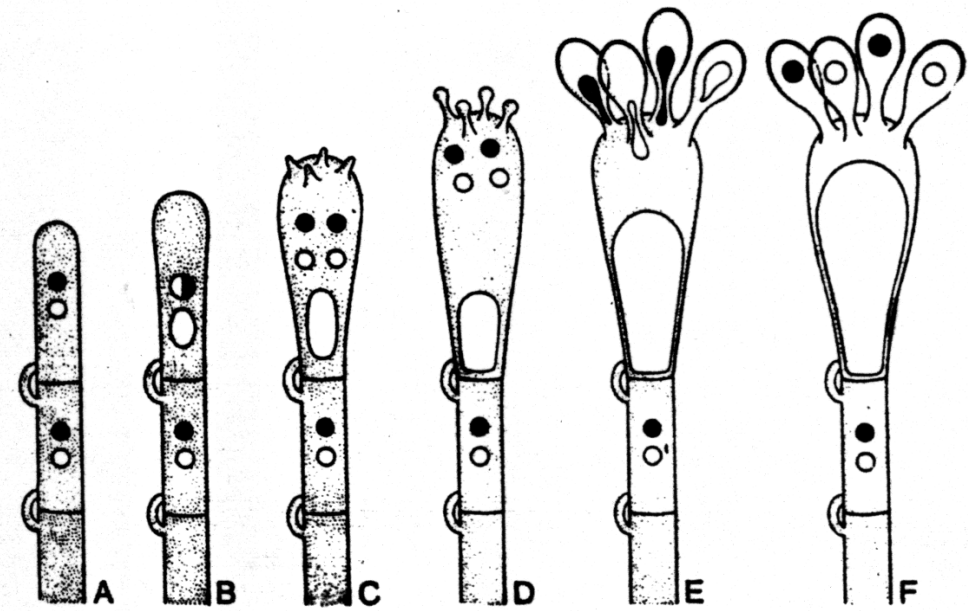


รูปที่ 2.5 แอสโคสปอร์แบบต่างๆ ของราที่สร้างขึ้นโดยกระบวนการที่อาศัยเพศ

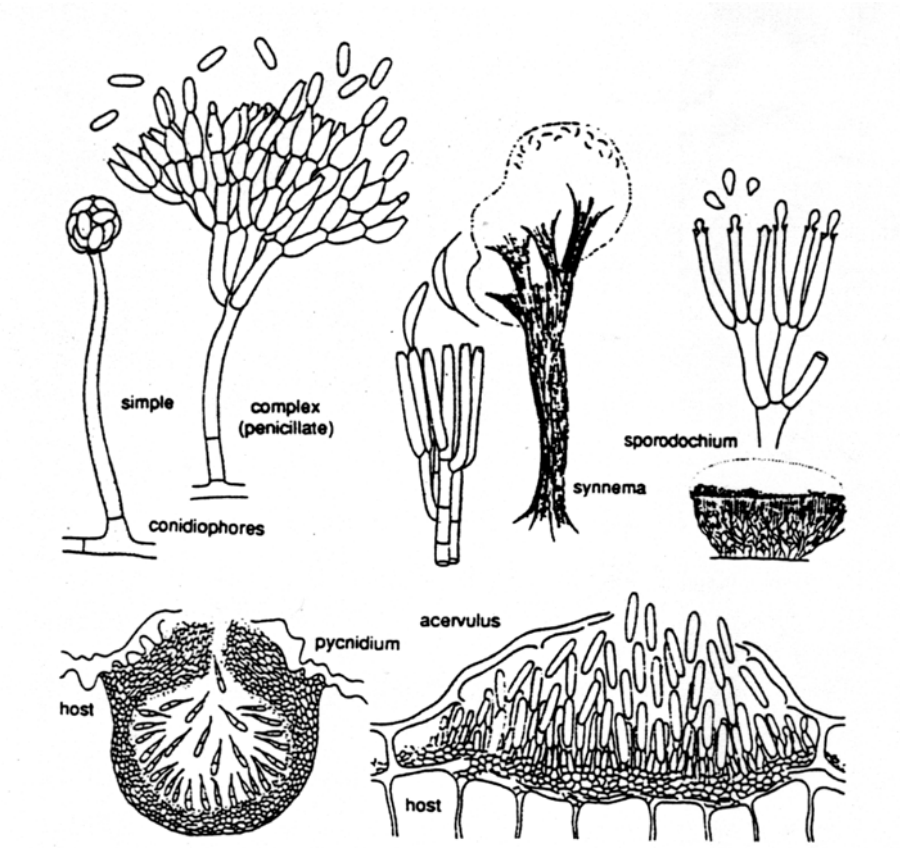
(A) สปอร์ที่มีเซลล์เดียว, (B-E) สปอร์ที่มีสองเซลล์, (F-G) สปอร์ที่มีจำนวนเซลล์มากกว่าสองเซลล์ มีผนังกั้นทางขวาง, (H) สปอร์ที่มีร่องอยู่ตรงกลาง รูปร่างคล้ายลูกรอก, (I) สปอร์รูปร่างคล้ายหมวก , (J) สปอร์ที่มีรูปร่างคล้ายดาวเสาร์ มีโครงสร้างรูปวงแหวนล้อมรอบ, (K) สปอร์ที่มีโครงสร้างใสคล้ายเมือกล้อมรอบ, (L) สปอร์เรียวยาวคล้ายเส้นด้าย, (M-T) สปอร์สีเข้ม ผนังเรียบหรือขรุขระเป็นรู (pitted) หรือมีโครงสร้างยื่นออกมาคล้ายหนาม อาจมีผนังกั้นทั้งตามยาว และตามขวาง



รูปที่ 2.6 ลักษณะภาพตัดทางขวางของแอสโคคาร์ป หรือแอสโคมา (ascoma) แบบต่างๆ



รูปที่ 2.7 การพัฒนาแคลมพ์คอนเนคชัน และการเกิดเบสิดิโอสปอร์บนเบสิเดียม (A-F)

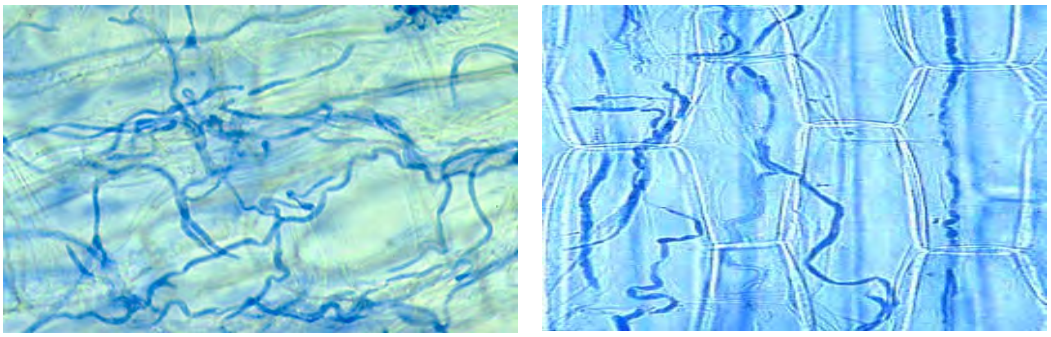


รูปที่ 2.8 ลักษณะโครงสร้างสืบพันธุ์แบบไม่อาศัย (conidial fructification) ชนิดต่างๆ ซึ่งพบในราที่ไม่สมบูรณ์ (Imperfect fungi)

2.2 ราเอนโดไฟต์

ราเอนโดไฟต์ (endophytic fungi) หมายถึง ราที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อของพืช ซึ่งอาจอยู่ทั้งวงจรชีวิตหรือบางส่วนของวงจรชีวิตก็ได้ โดยไม่ทำอันตรายต่อเนื้อเยื่อพืช การอาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชอาจมีความสัมพันธ์กับพืชอาศัยหลายแบบ เช่น พึ่งพาซึ่งกันและกัน (mutualism), natural symbiont และ pathogen ถึงแม้ว่า ราเอนโดไฟต์บางชนิดเป็นราที่ก่อให้เกิดโรคพืชแต่ในบางช่วงจะพักตัวในเนื้อเยื่อของพืชอาศัยโดยไม่ทำให้แสดงอาการของโรค แต่เมื่อพืชอ่อนแอจะแสดงให้เกิดอาการของโรค (Peteini, 1986) ราเอนโดไฟต์ส่วนใหญ่จัดอยู่ในไฟลัม Acomycota และ Deuteromycota วิธีการแยกเชื้อจะมีผลต่อชนิดของราเอนโดไฟต์ที่มีอยู่ในพืชอาศัยแต่จะมีจำนวนน้อยที่จำเพาะต่อพืชอาศัยซึ่งมักจะเป็นdominantในพืชชนิดนั้น ราเอนโดไฟต์จะจำเพาะในระดับ species ของพืชอาศัย แต่ส่วนประกอบและความถี่ที่พบราจะเปลี่ยนแปลงไปตามสภาวะอากาศ และความจำเพาะของแหล่งที่อยู่

จากการศึกษาพบว่าราเอนโดไฟต์มักจะสร้างเอนไซม์ที่จำเป็นใน การรวมกลุ่มในเนื้อเยื่อพืชจากการศึกษาด้วยเทคนิคไอโซไซม์ (isozyme) พบว่าราเอนโดไฟต์ส่วน ใหญ่จะสามารถใช้ส่วนประกอบของเซลล์พืชและสามารถสร้างสารที่มีประโยชน์ในทางเภสัชกรรม และอุตสาหกรรม (Petrini และคณะ, 1991)



รูปที่ 2.9 ราเอนโดไฟต์ที่อาศัยในเนื้อเยื่อพืช

ในปี 1988 Bacon ได้รวบรวมรายงานถึงธรรมชาติและแนวทางที่จะใช้เอนโดไฟต์ในการปรับปรุงคุณภาพของหญ้า ในแง่การใช้เป็นตัวควบคุมโรคและแมลงทางชีวภาพเป็นแบบในการศึกษากลไกในการก่อให้เกิดความเครียด (stress) เช่นทนแล้ง ทนร้อนหรือทนต่อการเข้าทำลายของโรค เช่น *Acremonium coenophilium* เป็นราเอนโดไฟต์ในพืช tall fescue จะทำให้พืชนี้ทนต่อการกัดกินของแมลงและสัตว์ ราเอนโดไฟต์ที่สร้างสารที่มีผลทางเภสัชกรรมกลุ่ม ergot alkaloid เช่น *Balansia cyperi* อยู่กับพืชพวก *Cyperus* sp. ราที่ทำให้พืชมีการเติบโตดี ทรงพุ่มแน่นและเขียว เช่น เชื้อ *Aremonium lolii* กับพืชล้มลุก ryegrass ราที่ทำให้พืชทนแล้งและร้อน เช่น *A. lolii* กับหญ้าเป็นต้น (Bacon, 1988)

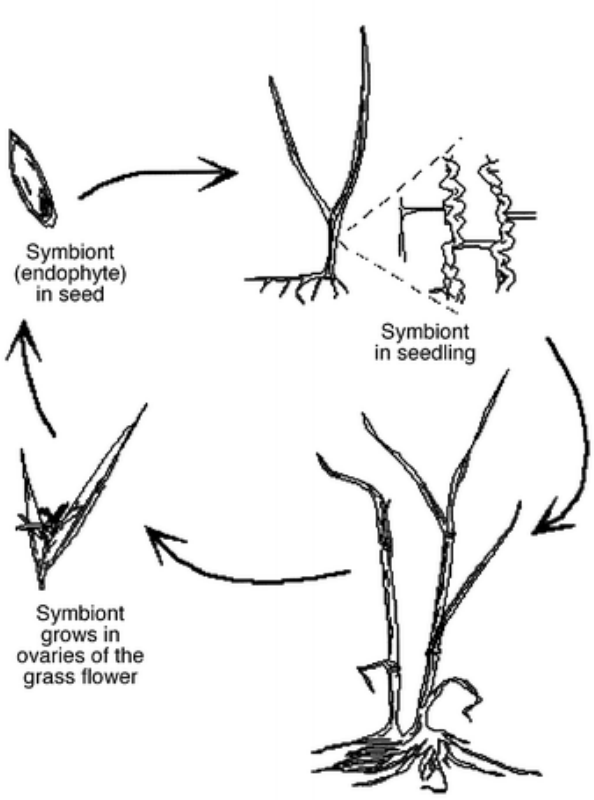
ในปี 1977 Bacon ได้รายงานถึง ราเอนโดไฟต์ *Fusarium monniliforme* ในข้าวโพดและเป็นราเอนโดไฟต์ในพืชตระกูลหญ้าที่ใช้เลี้ยงสัตว์ได้แก่ tall fescue (*Festuca arundinacea*) ซึ่งพบว่าหญ้าที่มีเอนโดไฟต์จะทนต่อการทำลายของแมลง (Johnson และคณะ, 1985) นอกจากนี้ยังทนต่อความแห้งแล้งแข่งขันกับพืชอื่นได้ดีและมีการเจริญเติบโตดี โดยจะให้น้ำหนักแห้งมากกว่าหญ้าที่ไม่มีราเอนโดไฟต์ (Clay และคณะ, 1987)

2.3 การจัดกลุ่มราเอนโดไฟต์ในทางนิเวศวิทยา

เมื่อกล่าวถึงราเอนโดไฟต์โดยพื้นฐานแล้วหมายถึง ราเอนโดไฟต์ของพืชตระกูลหญ้าซึ่งได้แก่ *Clavicep* โดยมีความสัมพันธ์แบบ mutualism นอกจากนั้นยังสามารถแยกราเอนโดไฟต์ได้จากไม้ยืนต้น ไม้พุ่มและไม้ล้มลุก ดังนั้นในปี 1996 Strobel และคณะ จึงแบ่งราเอนโดไฟต์ในทางนิเวศวิทยาแบ่งเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่

2.3.1 Clavicipitaceous grass endophyte

ราเอนโดไฟต์ที่อาศัยอยู่ในหญ้า จัดเป็นราในตระกูล (family) Clavicipitaceae โดยการค้นพบราเอนโดไฟต์ในกลุ่มนี้ เริ่มต้นจากการที่ในปี 1999 Strobel (Strobel และคณะ, 1999) พบราเอนโดไฟต์ในเมล็ดของหญ้าชนิดหนึ่ง (*Lolium tumulentum* L.) ซึ่งเป็นวัชพืชที่เกิดในแปลงธัญพืช จากนั้นจึงมีรายงานการศึกษาอีกมากมายที่แสดงให้เห็นว่ารากลุ่มนี้มีแหล่งที่อยู่อาศัยในพืชอีกหลายชนิด ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นหญ้า ได้แก่ หญ้าตระกูล Poaceae หญ้าจำพวกหญ้าแห้วหมู (Sedge) ตระกูล Cyperaceae และหญ้าทรงสูงชนิดหนึ่ง (Rush) ตระกูล Jancaceae โดยมีหญ้ากว่า 80 สกุลและอีกหลาย ร้อยชนิดที่ราเอนโดไฟต์อาศัยอยู่



รูปที่ 2.10 วงชีวิตของราเอนโดไฟต์ที่อาศัยอยู่ในหญ้า

2.3.2 Non-Clavicipitaceous grass endophyte

ราเอนโดไฟต์ที่อาศัยอยู่ในไม้ยืนต้นหรือไม้พุ่ม แต่รวมราเอนโดไฟต์ในหญ้าที่ไม่ใช่ตระกูล Clavicipitaceae ราเอนโดไฟต์ในกลุ่มนี้ได้แก่ ราในไฟลัมย่อย Ascomycota, Deuteromycota, Zygomycota และ Basidiomycota

ราเอนโดไฟต์ของพืชตระกูลหญ้าเป็นที่รู้จักกันมานานกว่า 70 ปีแล้ว แต่การศึกษาราเอนโดไฟต์ของไม้ยืนต้นและไม้พุ่มเพิ่งเริ่มเมื่อ 15 ปีที่ผ่านมา โดยเริ่มศึกษาจากต้นสนพันธุ์ยุโรป หลังจากนั้นมีรายงานที่รวบรวมรายชื่อของพืชที่มีราเอนโดไฟต์เพื่อสรุปถึงการกระจายของราเอนโดไฟต์ในอาณาจักรพืชและพบว่าพืชที่มีเนื้อไม้ (woody plant) ได้แก่ พวกจิมโนสเปิร์ม (สน) และแองจิโดสเปิร์ม (พืชดอก) ทั้งหมดที่ถูกตรวจสอบมีราเอนโดไฟต์อาศัยอยู่ และพบว่าราเอนโดไฟต์เหล่านี้มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง

2.4 ความจำเพาะต่อพืชให้อาศัยของเอนโดไฟต์

ราเอนโดไฟต์จะจำเพาะต่อเนื้อเยื่อบางชนิด จากการศึกษาพบว่าสามารถแยกราเอนโดไฟต์ได้หลายชนิดจากก้านของสนยุโรป(Europeanconifer)ซึ่งในส่วนของใบจะไม่ค่อยพบราเหล่านั้นเลย จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างพืชอาศัยและราเอนโดไฟต์ได้แสดงให้เห็นว่าราเอนโดไฟต์มักจะจำเพาะที่ระดับ species จากการศึกษาราเอนโดไฟต์ของกิ่งสน *Pinus sylvestris* และ *Fagus sylvatica* (Carrol และคณะ, 1988)

Petrini และ Fisher ได้ศึกษาเกี่ยวกับเอนโดไฟต์ของไซเลมและเปลือกของต้น *Quercus rober* และ *Salix fragilis* โดยเปรียบเทียบดูความจำเพาะของเชื้อรากับชนิดของพืชและตำแหน่งเนื้อเยื่อในแต่ละ communities พบว่าราใน *Salix* ส่วนใหญ่เกือบทั้งหมดจะเป็นราเอนโดไฟต์ที่พบทั่วๆไปในพืชอื่น ยกเว้นเชื้อ *Phomopsis salicira* จากต้น *Quercus* ที่มีความจำเพาะต่อพืชให้อาศัยมากกว่า เชื้อราที่พบจะมีการกระจายสม่ำเสมอ (homologus) ในตัวอย่างที่นำมาศึกษา กลุ่มของราในกิ่งของ *Quercus* และ *S. fragilis* ชนิดที่เด่นมีน้อยมักจะพบทั้ง 2 พืช ผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่า ในกิ่งที่แตกออกไปนั้นมีกลุ่มของเอนโดไฟต์ต่างชนิดกัน แขนงของต้น *Quercus rober* ที่เก็บจากตำแหน่งที่ออกในทิศตรงกันข้ามจะมีเอนโดไฟต์ที่เหมือนกัน ราเอนโดไฟต์มีความจำเพาะต่ออวัยวะของพืชให้อาศัย ขึ้นกับการปรับตัวของราเอนโดไฟต์เอง ต่อนิเวศวิทยาของจุลินทรีย์บริเวณนั้น และสภาวะทางสรีระวิทยาบางอย่างของอวัยวะนั้น (Petrini และ Fisher, 1990)

การพัฒนาของเอนโดไฟต์ที่มีความจำเพาะสูงกับพืชให้อาศัย โดยในพืชให้อาศัยหนึ่งแยกได้เอนโดไฟต์หลายสปีชีส์แต่มีไม่กี่สปีชีส์ที่พบจำนวนมากพอ (จากจำนวนที่ taxa ทั้งหมดที่พบได้จากแบคทีเรียกับจำนวนสปีชีส์ของเชื้อรา 50%) จะไม่พบรูปแบบที่แสดงว่าชนิดของเนื้อเยื่อหรือ

ตำแหน่งที่แยกเชื้อราจะคงที่ (consistant) ประมาณ 10% ของ taxa จะเป็นชนิดที่พบเสมอ (dominant) (Kolattukudy, 1985)

2.5 ความจำเพาะของเอนโดไฟต์ในแง่การสร้างเอนไซม์

ราเอนโดไฟต์สามารถผลิตเอนไซม์ได้หลายชนิด เช่น เอนไซม์ที่ย่อยสลายผนังเซลล์พืช เนื่องจากต้องอาศัยวิธีการเดียวกับราก่อโรคพืชในการเข้าสู่เซลล์ของพืชอาศัย นอกจากนี้ยังพบว่า *Melanconium spp.*สามารถผลิตเอนไซม์ที่มีความจำเพาะสูง ซึ่งทำให้เป็นที่สนใจในแง่การผลิตพวก non- specific C_4 esterase และ C_8 esterase lipase ทั้งนี้จะพบใน *Melanconium* มากกว่า 88% และใน *Apiognomonia errabunda* ทุกไอโซเลต (Kolattukudy, 1985)

จากรายงานการศึกษาเอนโดไฟต์ส่วนใหญ่ พบว่ารากลุ่มนี้จะสร้าง pectinase, xylanase, lipolytic enzyme, non-specific peroxidase และ laccasees นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถสร้างเอนไซม์ cellulase, hemicellulase ทั้งนี้จะจำเพาะกับพืชให้อาศัยบางชนิดหรือเฉพาะเนื้อเยื่อ การใช้แป้งจะจำกัดในไม่กี่ชนิด (Petrini และคณะ, 1991) รวมทั้งราเอนโดไฟต์ *Atkinsonella hypoxylan* และ *Balansia epichloe* สามารถเจริญในหยดขี้ผึ้งได้และมีการทำงานของ protenase (White และคณะ, 1991) นอกจากนั้นยังมีการศึกษาชีววิทยาของราเอนโดไฟต์ *Apiognomonia errbunda* และ *Melanconium* sp. ที่คัดเลือกโดย Seiber ได้แสดงหลักฐานว่าเอนโดไฟต์นั้นมีความจำเพาะสูงต่อการการทำงานของเอนไซม์ (Sieber และคณะ, 1991)

นอกจากนี้ยังพบว่าเอนโดไฟต์ที่แยกได้จาดพืชให้อาศัยเดียวกันจะมีการทำงานของเอนไซม์เหมือนกัน (Leuchtmann และ คณะ, 1992) ดังนั้นจึงเป็นการยืนยันว่าในราชนิดเดียวกันจะมีสายพันธุ์ที่จำเพาะต่อพืชให้อาศัย

2.6 ประโยชน์ที่พืชได้รับจากราเอนโดไฟต์

Carroll (1988) ได้ทำการศึกษาและรวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับประโยชน์ของพืชที่ได้รับจากราเอนโดไฟต์ไว้ดังนี้

1. สร้างสารที่เป็นพิษในพืชเพื่อป้องกันการเข้าทำลายของแมลง
2. ช่วยให้พืชสังเคราะห์แสงได้มากขึ้น โดยหญ้าที่มีราเอนโดไฟต์จะยังคงมีการสังเคราะห์แสงได้มากที่อุณหภูมิสูงเมื่อเปรียบเทียบกับหญ้าที่ไม่มีราเอนโดไฟต์
3. ลดการเกิดราที่ทำให้เกิดโรคเน่าหลังการเก็บเกี่ยว
4. ป้องกันการก่อโรคในพืช เช่นราเอนโดไฟต์ที่พบในใบยาสูบไม่สามารถทำให้เกิดอาการโรคจุดสีน้ำตาล และยังพบอีกว่าในต้นกล้าของยาสูบที่เพาะในเรือนเพาะชำจะไม่พบราเอนโดไฟต์ แต่เมื่อนำไปปลูกในไร่จะพบราเอนโดไฟต์ในใบยาสูบ

5. ช่วยยับยั้งการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอย และทำให้พืชสามารถเจริญในระยะที่นานกว่า และไม่ต้องใช้ปุ๋ยมาก
6. การสร้างฮอร์โมนเร่งการเจริญเติบโต เช่น indo-3-acetic acid (IAA) และ cytokinin ซึ่งเร่งกระบวนการออกดอกของพืชให้อาศัย
7. การสร้างสารปฏิชีวนะ เชื้อราเอนโดไฟต์หลายชนิดสร้างสารปฏิชีวนะในขณะเพาะเลี้ยง ซึ่งมีผลต่อต้านแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุให้เกิดโรคในคนและพืช

2.7 ป่าเต็งรัง

ป่าเต็งรัง (Dipterocarp forest) คือป่าผลัดใบประเภทหนึ่งที่ขึ้นได้ดีทั้งในพื้นที่ที่เป็นที่ราบต่ำและจะพบที่มีความสูงจากระดับน้ำทะเลไม่เกิน 1,000 เมตร โดยมีป่าอีกชนิดหนึ่งที่มีลักษณะคล้ายกัน หรือบางครั้งอาจพบว่าขึ้นอยู่รวมกันเรียกว่า ป่าเบญจพรรณ(Deciduous forest) มีลักษณะเป็นป่าดิบแล้งที่ผลัดใบคล้ายป่าเต็งรังแต่โดยส่วนใหญ่ป่าเบญจพรรณจะพบอยู่ที่ในระดับความสูงไม่เกิน 800 เมตร จากระดับน้ำทะเล ป่าเต็งรังที่ขึ้นอยู่ในพื้นที่ที่ฤดูกาลแบ่งแยกค่อนข้างชัดเจน ระหว่างฤดูฝนกับฤดูแล้ง ปกติต้องมีช่วงแห้งแล้งจัดเกินกว่า 4 เดือนต่อปี ดินตื้นกักเก็บน้ำได้เลวมาก ปริมาณน้ำฝนอยู่ในช่วง 900 - 1,200 มิลลิเมตรต่อปี และเกิดไฟป่าเกิดขึ้นเป็นประจำ สังคมป่าชนิดนี้เป็นสังคมถาวรที่มีไฟป่าเป็นตัวกำหนด (pyric climax community) หากไม่มีไฟป่าจะคงอยู่ไม่ได้ ปกติไฟป่ามักเกิดขึ้นช่วงเดือนธันวาคมไปจนถึงเดือนมีนาคม ไฟเป็นปัจจัยสำคัญต่อการจัดโครงสร้าง การคงชนิดพันธุ์ในสังคมและการสืบพันธุ์ของไม้ในพื้นที่

2.7.1 แหล่งที่พบและการกระจาย

ป่าเต็งรังเป็นป่าผลัดใบ ฉะนั้นลักษณะสำคัญในอันดับแรกของการจำแนกคือ การผลัดใบของไม้ส่วนใหญ่ในทุกระดับชั้นเรือนยอด ลำดับต่อไปในการจำแนก ป่าเต็งรังมีถิ่นกระจายโดยกว้าง ซ้อนทับกันอยู่กับป่าผสมผลัดใบแต่อาจแคบกว่าเล็กน้อย ทั้งนี้เนื่องจากปัจจัยกำหนดที่เกี่ยวข้องกับความแห้งแล้ง สังคมพืชชนิดนี้แท้จริงแล้วมีพบในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยเฉพาะประเทศไทย ลาว กัมพูชา พม่า และบางส่วนของประเทศเวียดนามเท่านั้น ในประเทศอินเดียอาจมีป่าซาลที่มีลักษณะคล้ายคลึงกันกระจายอยู่ในบางส่วน เฉพาะประเทศไทย มีปรากฏตั้งแต่จังหวัดเพชรบุรีขึ้นไปจนถึงเหนือสุดในจังหวัดเชียงราย ป่าชนิดนี้เป็นสังคมพืชเด่นในทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ส่วนใหญ่ปรากฏสลับกันไปกับป่าผสมผลัดใบคือยึดครองในส่วนที่พื้นที่มีความแห้งแล้งจัด กักเก็บน้ำได้ไม่ดี เช่น บนสันเนิน พื้นที่ราบที่เป็นทรายจัด มีหินบนผิวดินมาก หรือ บนดินลูกรังที่มีชั้นของลูกรังตื้น มีปรากฏตั้งแต่ความสูงจากระดับน้ำทะเล 50 เมตร ขึ้นไปจนถึง 1,000 เมตร

2.7.2 ระบบนิเวศของป่าเต็งรัง

ระบบนิเวศของป่าชนิดนี้มีลักษณะเด่น เช่นเดียวกับป่าผลัดใบในเขตร้อนทั่วไป คือ มีพลังงานจากดวงอาทิตย์พอเพียงสำหรับพืชในการสร้างอินทรียวัตถุ แต่การสังเคราะห์แสงและการหลั่งไหลของพลังงานมักถูกจำกัดในช่วงฤดูแล้ง ผลผลิตในขั้นมูลฐาน และความหลากหลายของชนิดพันธุ์ อาจน้อยกว่าสังคมพืชอื่นอยู่บ้างเนื่องจากช่วงฤดูการเติบโตค่อนข้างสั้น สาเหตุจากความแห้งแล้ง ความสมบูรณ์ของดินค่อนข้างต่ำ แต่ก็มิได้เป็นปัญหาที่สำคัญต่อความสมบูรณ์ของสังคม ผลผลิตส่วนใหญ่เกิดขึ้นในช่วงฤดูฝนเมื่อความชื้นในดินมีเพียงพอ การพักตัวของพืชสีเขียวเกิดขึ้นในฤดูแล้งเมื่อน้ำในดินขาดแคลน พันธุ์ไม้ทุกชนิดผลัดใบทิ้งเพื่อลดการคายน้ำและหยุดการเจริญเติบโต การเจริญเติบโตและการสืบพันธุ์ของไม้ส่วนใหญ่ในสังคมนี้ขึ้นอยู่กับความชื้น และคุณภาพของดิน ป่าชนิดนี้จะสมบูรณ์สุดเมื่อขึ้นอยู่บนดินประเภท sandy clay loam ที่ค่อนข้างเป็นกรด จากรายงานมักปรากฏว่าป่าเต็งรังในลุ่มน้ำพองของภาคตะวันออกเฉียงเหนือ หมู่ไม้ทั่วไปมีลักษณะโปร่ง มีเรือนยอดปกคลุมประมาณร้อยละ 60 มีความหนาแน่นเฉลี่ยของต้นประมาณ 496 ต้นต่อเฮกแตร์ มีพื้นที่หน้าตัดประมาณ 15.78 ตารางเมตรต่อเฮกแตร์ จากการวิเคราะห์ข้อมูลป่าเต็งรังที่กระจายอยู่ในทางภาคเหนือของประเทศในสังคมย่อยต่างๆ ความหนาแน่นตั้งแต่ 410 ต้นต่อเฮกแตร์ขึ้นไปจนถึง 602.50 ต้นต่อเฮกแตร์ พื้นที่หน้าตัดตั้งแต่ 10 -23.87 ตารางเมตรต่อเฮกแตร์ ค่าที่ประเมินได้จากต้นไม้ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางเพียงอก เกินกว่า 4.5 เซนติเมตรขึ้นไปซึ่งถือว่าผ่านพ้นการทำลายของไฟป่า

พันธุ์ไม้ในป่าเต็งรังมีสภาพเช่นเดียวกับป่าผสมผลัดใบ ในการทดแทนขั้นทุติยภูมิที่เกิดขึ้นเมื่อป่าชนิดนี้ถูกทำลายลงเป็นได้หลายรูปแบบแล้วแต่กรณี หากการทำลายที่เกิดจากการตัดไม้ขนาดใหญ่ออกแต่มิได้กระทำต่อเนื่องจนไม้เล็กและตอไม้หมดไป จากพื้นที่ป่าชนิดนี้อาจฟื้นกลับได้โดยง่ายแต่ต้องใช้เวลาอันยาวนานจึงจะถึงสังคมถาวร ส่วนใหญ่มักมีลักษณะเป็นป่าชั้นที่สอง (secondary forest) คล้ายป่าเต็งรังแคระอยู่นาน ไม้ส่วนใหญ่ในสังคมนี้มีการแตกหน่อได้ดีและปรับตัวเพื่อการอยู่รอดภายใต้อิทธิพลของไฟป่าได้ดี โดยเฉพาะเหียง รัง พลวง และเต็ง รวมถึงไม้อื่น ๆ เกือบทุกชนิด ผลจากการทดลองตัดหมดและปล่อยให้ทดแทนตามธรรมชาติปรากฏว่าป่าชนิดนี้มีการฟื้นตัวได้ดี

ในพื้นที่ที่ถูกทำลายอย่างหนักและต่อเนื่องเป็นเวลานาน มีไฟป่าเกิดขึ้นอย่างรุนแรงทุกปี สังคมป่าชนิดนี้อาจเปลี่ยนรูปไปจนมีลักษณะที่คล้ายป่าทุ่ง คือมีต้นไม้ขึ้นห่าง ๆ ผสมด้วยหญ้าและพืชล้มลุกที่ค่อนข้างสูง ไม่ที่หลงเหลือและที่รุกล้ำเข้ามาส่วนใหญ่เป็นไม้หนามแสดงให้เห็นถึงสภาพดินที่เลวลงแบะขาดน้ำ ไม้ที่พบเห็นได้เด่นชัดเช่น หนามเค็ด ตะขบป่า ตะขบไทย และเล็บเหยี่ยว ป่าเต็งรังคงสภาพอยู่ได้เนื่องจากไฟป่า คือ เป็นสังคมถาวรที่มีไฟป่าเป็นปัจจัยกำหนด หากมีการป้องกันไฟป่าติดต่อกันเป็นเวลายาวนาน สังคมนี้จะเปลี่ยนไปสู่สังคมพืชที่ชื้นกว่า คือสังคมป่าผสมผลัดใบหรือต่อไปถึงป่าดงดิบแล้ง โดยเริ่มต้นด้วยการลดประสิทธิภาพการสืบพันธุ์ของไม้

ดัชนีโดยเฉพาะเหียง พลวง เต็ง รัง ทั้งนี้เนื่องจากเมล็ดของไม้เหล่านี้ไม่สามารถตกถึงพื้นดินได้ การงอกของเมล็ดเป็นไปอย่างรวดเร็วหลังการตกและรากมักแห้งตาย กล้าไม้และไม้ขนาดกลางมักอ่อนแอลงและเมื่อได้รับแสงน้อย เนื่องจากไม้อื่นที่ขึ้นหนาแน่นก็ตายไป สภาพดินที่ชื้นขึ้นอาจเป็นสาเหตุให้ไม้ดัชนีดังกล่าวล้มตายลงในที่สุดไม้ป่าที่ชอบสภาพแวดล้อมแบบใหม่ก็จะเข้ามาทดแทน

การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของพันธุ์ไม้พบเห็นได้เด่นชัดในรอบปี หากพิจารณาตั้งแต่ปลายฤดูฝนจากเดือนพฤศจิกายน พันธุ์ไม้เกือบทุกชนิด ไม่ว่าไม้ขนาดเล็กหรือขนาดใหญ่เริ่มมีการผลัดใบทิ้งเพื่อเตรียมตัวรับความแห้งแล้ง ใบที่เคยเขียวสดก็เปลี่ยนเป็นสีเหลือง แดง น้ำตาล แล้วแต่ชนิดพันธุ์ ประมาณเดือนธันวาคมก็เริ่มร่วงหล่นลงสู่ดินพืชล้มลุกบนพื้นป่าแห้งตาย การเปลี่ยนสีใบค่อนข้างเด่นชัดมาก หากความหนาวเย็นของอากาศเคลื่อนตัวลงมาอย่างฉับพลัน ในช่วงนี้ป่าเต็งรังจะมีความงามเป็นพิเศษ และสามารถแยกได้อย่างเด่นชัดจากป่าชนิดอื่น ประมาณเดือนมกราคม ถึงกุมภาพันธ์ ไฟป่าก็เริ่มขึ้น ความรุนแรงของไฟขึ้นอยู่กับความหนาแน่นของใบไม้และหญ้าบนพื้นป่า หลังจากช่วงนี้เรือนยอดป่าคงเหลือแต่กิ่งก้านและพื้นป่าโล่งเตียน ประมาณกลางเดือนมีนาคมเป็นต้นไปพันธุ์ไม้ในป่าเต็งรังเริ่มออกดอกผลเพื่อการโปรยเมล็ดให้ทันต้นฤดูฝนในช่วงกลางเดือนพฤษภาคม

ประมาณต้นเดือนพฤษภาคมอันเป็นการเริ่มต้นของฤดูกาลเจริญเติบโตของสังคมนี้ การโปรยเมล็ดของไม้ใหญ่เริ่มขึ้นในต้นฤดูฝน ก่อนพื้นป่าจะรกทึบด้วยพืชคลุมดิน พืชเหล่านี้ทยอยกันงอกตั้งแต่ฝนแรกของฤดูกาล พืชคลุมดินที่ต้องการแสงมากมักปรากฏก่อนที่ใบไม้ในชั้นเรือนยอดจะแตกใบอ่อนและการเจริญเติบโตแผ่คลุมพื้นที่เต็มที่ พืชเหล่านี้มีการพัฒนาวงจรชีวิตให้สั้น มีการเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วและถึงช่วงการออกดอกผลได้ในระยะสั้น บางชนิดที่โปรยเมล็ดอาจต้องรอเวลานานก่อนที่จะสมบูรณ์และงอกได้ บางชนิดมีเมล็ดคาอยู่บนต้นจนสิ้นฤดูฝน ชนิดที่ชอบแสงมากขึ้นเด่นนำก่อนส่วนชนิดที่ต้องการแสงน้อยจะทยอยขึ้นติดตามมาเป็นลำดับ ก่อให้เกิดฉากสลับกันไป (alternative phase) ในพื้นป่า การเจริญเติบโตของไม้ใหญ่ค่อนข้างมีอัตราที่สูงในช่วงหลังจากใบเจริญเติบโตเต็มที่ อัตราการเติบโตลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อใกล้สิ้นฤดูฝนและมีการปรับสภาพทางสรีระวิทยาเพื่อเตรียมพร้อมในการพักตัวต่อไป โดยการผันแปรในรูปของวัฏจักรเช่นนี้เกิดขึ้นเป็นประจำทุกปี

การปรับตัวเพื่อความสัมพันธ์กับสภาวะการเกิดไฟป่าของพันธุ์ไม้ในป่าเต็งรัง จะเห็นได้ค่อนข้างชัดเจนในหลายประการ โดยเฉพาะการจัดช่วงเวลาของการโปรยเมล็ดให้สัมพันธ์กับไฟป่า พันธุ์ไม้ที่มีเมล็ดบอบบางไม่ทนไฟมักเลือกช่วงโปรยเมล็ดพันธุ์ในช่วงต้นฤดูฝนหลังฤดูกาลของไฟป่า เมล็ดสามารถตกต้องผิวดิน รากที่งอกมาใหม่ ๆ สามารถหยั่งลงดินเพื่อรับความชื้นป้องกันการแห้งตาย ส่วนเมล็ดไม้บางชนิดปรับตัวเพื่อผ่านฤดูไฟป่าด้วยมีเปลือกแข็งป้องกันความร้อนได้ดี ไฟป่าอาจมีส่วนช่วยในการทำให้เปลือกสามารถดูดซับน้ำได้ดีขึ้นในช่วงการงอก เมล็ดไม้กลุ่มนี้มักโปรยเมล็ดในช่วงปลายฤดูฝนและต้นฤดูร้อน กล้าของพันธุ์ไม้ในป่าเต็งรังส่วนใหญ่มีความสามารถ

ในการแตกหน่อหลังไฟป่าได้ดี (burned back phenomena) บางชนิดมีช่วงแตกหน่อเพื่อสร้างความแข็งแรงของรากยาวนานถึง 15 ปี การป้องกันเนื้อเยื่อเจริญ (cambium) ด้วยวิธีการมีเปลือกที่หนาพร้อมทั้งส่วนนอกที่แข็งทนไฟและกันความร้อนได้ดีปรากฏในทุกชนิด ส่วนพืชล้มลุกอาศัยการตายของลำต้นแต่ฝังหัวและรากที่มีตาเจริญเพื่อการแตกหน่อกลับขึ้นมาใหม่ในช่วงฤดูฝน

2.8 ตัวอย่างพืชในป่าเต็งรังที่ใช้ในการศึกษา

2.8.1 ยางพลวง (*Dipterocarpus tuberculatus* Lin.) (รูปที่ 2.11(1))

ไม้ต้น สูงถึง 40 เมตร เป็นไม้ผลัดใบเปลือกหนา ร่องลึก ใบใหญ่ ประมาณ 30-45 ×12-35 เซนติเมตร ใบรูปไข่ โคนใบหยักเว้าลึก แผ่นใบหนาเกลี้ยง ขอบใบเรียบหรือเป็นคลื่น ตามธรรมชาติพบตามป่าเต็งรัง และป่าเบญจพรรณทั่วไป

2.8.2 ส้านหิ่ง (*Dillenia parviflora* Griff) (รูปที่ 2.11.(2))

ไม้ผลัดใบสูง 10 - 30 เมตร เรือนยอดโปร่ง กิ่งห้อยไม่เป็นระเบียบ ใบยาวได้ถึง 15– 25 เซนติเมตร แต่ใบอ่อนมักมีขนาดใหญ่มากอาจยาวถึง 100 เซนติเมตร รูปไข่กลับ โคนใบแคบปลายใบป้าน ใบแก่มีขนหยาบๆเส้นใบข้างมี 22 – 35 คู่ ก้านใบยาว 1- 3.5 เซนติเมตร พองและแผ่ออกโอบฐานของกิ่ง ดอกสีเหลือง ช่อละ 2 – 7 ดอก

2.8.3 ตะขบป่า (*Flacourtia indic* Merr.) (รูปที่ 2.11.(3))

ไม้พุ่ม สูงประมาณ 12 เมตร เรือนยอดระเกะระกะ กิ่งก้านจะอ่อนห้อยลู่ลง เปลือกไม้สีน้ำตาลอ่อนมีหนามคมยาวออกเป็นคู่ๆ ใบมีขนาดเล็ก ประมาณ 2.5 × 1.5 – 3 เซนติเมตร ในระนาบ ใบอ่อนมักมีสีแดง และเปลี่ยนเป็นสีเขียวสด ใบเป็นใบเดี่ยวออกจากกิ่งแบบสลับ โดยใบมีรูปร่างหลายแบบ ทั้งรูปขอบขนานรี รูปไข่ หรือรูป ไข่กลับ มีดอกย่อย 4 - 6 ดอก ดอกเล็กมีสีเขียวอ่อนเป็นช่อแบบกระจะ raceme ดอกจะออกที่ปลายยอด ดอกเพศผู้และเพศเมียแยกกันอยู่คนละต้น เกสรตัวผู้มีจำนวนมาก ดอกเพศเมียมีกลีบเลี้ยงคล้ายดอกเพศผู้ ออกดอก เดือนมีนาคม – เมษายน ผลแบบ berry รูปกลมรี ผลสุกมีสีดำ – แดง พบกระจายทั่วไปตามป่าดิบแล้ง และป่าเบญจพรรณ

2.8.4 ชะมวง (*Garcinia nigrolineata* Planch.) (รูปที่ 2.11(4))

เป็นต้นไม้ ขนาดกลาง สูง 15 - 20 เมตร เรือนยอด เป็นพุ่มรูปกรวยคว่ำ ทรงสูง แตกกิ่งชั้นเดียว เปลือกนอก เรียบ สีน้ำตาลเข้มเกือบดำ เปลือกใน สีชมพูถึงแดง มีน้ำยางสีเหลืองขุ่นไหลเยิ้มออกมาจากเปลือกต้น ใบเดี่ยว ออกตรงกันข้ามเป็นคู่ ๆ แต่ละคู่เรียงตรงกันข้ามเป็นมุมฉากซึ่งกันและกัน ใบรูปไข่ขอบขนาน ปลายใบและโคนใบแหลม ผิวใบเป็นมัน เนื้อใบหนา ดอกเป็นช่อขนาดเล็ก กลีบดอกแข็ง หนา ขนาด 10 – 15 มิลลิเมตร แตกออกจากโคนใบและปลายกิ่ง ผลสดทรงกลม ผิวเรียบมีร่องรอยเป็นพูบาง ๆ รอบผล ขนาดผล 2.5 - 3.0 เซนติเมตร

รูปที่ 2.11 ตัวอย่างพืชในป่าเต็งรังที่ใช้ในการศึกษา

(1) ยางพลวง (*Dipterocarpus tuberculatus* Roxb)

(2) ส้านหิ่ง (*Dillenia parviflora* Griff.)

(3) ตะขบป่า (*Flacourtia indic* Merr.)

(4) ชะมวง (*Garcinia nigrolineata* Planch.)

(5) ชิงชัน (*Dalbergia oliveri* Gamble.)

(6) รัง (*Shorea siamensis* Miq.)

(7) ส้านใบเล็ก (*Dillenia ovata* Wall. ex Hook. f. & Th..)

(8) โมกเครือ (*Aganosma marginata* G. Don.)

(9) ไผ่ (*Bambusa arundinacea* Willd.)

(10) เต็ง (*Shorea obtusa* Wall.)

2.8.5 ชิงชัน (*Dalbergia oliveri* Gamble.) (รูปที่ 2.11(5))

ไม้ผลัดใบ สูง 20 เมตร ใบเล็กบาง แต่มีเปลือกไม้หนาสีน้ำตาลอมเทา ล่อนเป็นแว่น ๆ ใบประกอบรูปขนนก เรียง สลับ ใบย่อย 11 - 17 ใบ รูปรีแกมรูปไข่ หรือเรียงเป็นรูปขอบขนานแกมรูปหอก กว้าง 1 - 4 เซนติเมตร ยาว 4 - 8 เซนติเมตร โคนใบมนกลมหรือสอบเป็นรูปลิ่มกว้าง ๆ และปลายมนทู่ และหยักเว้าเล็กน้อย ท้องใบสีจางกว่าหลังใบ ดอกเล็กสีขาวแกมม่วง เกิดบนช่อดอกเชิงประกอบตามปลายกิ่ง ดอกจะเกิดพร้อมกับการผลิใบใหม่ ผลเป็นฝักแบน ๆ ยาวรี รูปขอบขนาน หัวท้ายแหลม กว้าง 3 - 3.5 เซนติเมตร ยาว 8 - 17 เซนติเมตร แต่ละฝักมี 3 เมล็ด ขึ้นอยู่ตามป่าเบญจพรรณทั่วไป ในพื้นที่ที่มีความสูงใกล้กับระดับน้ำทะเล จนถึง 500 เมตร

2.8.6 รัง (*Shorea siamensis* Miq.) (รูปที่ 2.11(6))

ผลัดใบ สูง 15 - 20 เมตร เปลือกลำต้นสีเทา แตกเป็นร่องลึกตามความยาวลำต้น ใบเดี่ยวเรียงสลับ แผ่นใบ รูปไข่ กว้าง 7 - 12 เซนติเมตร ยาว10 - 20 เซนติเมตร ปลายใบมนโคนใบหยักเว้า ดอกสีเหลือง กลิ่นหอมอ่อน ออกรวมกันเป็นช่อ ผลแหลมรูปกระสวย มีปีกยาว 3 ปีก ปีกสั้น 2 ปีก ขึ้นในป่าเบญจพรรณแล้ง และป่าเต็งรังทั่วไป ขึ้นปะปนกับไม้เต็งอยู่ในพื้นที่สูงจากระดับน้ำทะเล 500 - 1,000 เมตร มีความ ทนทานต่อความแห้งแล้ง ทนไฟได้ดีมาก

2.8.7 ส้านใบเล็ก (*Dillenia ovata* Wall. ex Hook. f. & Th.) (รูปที่ 2.11(7))

ไม้ต้น ผลัดใบ สูง 8–30 เมตร เปลือกสีน้ำตาลเทา ถึงสีน้ำตาลแกมแดง เรียบ หรือแตกเป็นสะเก็ด เปลือกในสีชมพู ใบเดี่ยว เรียงเวียนสลับ แผ่นใบรูปไข่ถึงรูปขอบขนานแกมรูปไข่ กว้าง 7 – 11.5 เซนติเมตร ยาว 11.5 – 18.5 เซนติเมตร ปลายใบมนหรือเว้าเล็กน้อย โคนใบมนกว้าง บางครั้งเบี้ยว ขอบใบหยัก หลังใบมีขนนุ่ม ท้องใบมีขนสาก เส้นแขนงใบ 17 – 21 คู่ ปลายเส้นคล้ายกับโผล่พ้นขอบใบ ก้านใบยาว 2.5 – 3 เซนติเมตร มีขนนุ่ม ดอกสีเหลืองสด ออกเป็นช่อตามปลายกิ่ง เส้นผ่านศูนย์กลาง 5 – 6 เซนติเมตร ผลค่อนข้างกลม มีกลีบเลี้ยงหนาอุ้มน้ำซ้อนทับหุ้มผล ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 – 6 เซนติเมตร เมื่อแก่สุกสีเหลือง เมล็ดขนาดเล็ก มีจำนวนมาก มีการกระจายพันธุ์ทั่วไปในป่าดิบแล้ง ป่าเบญจพรรณ ป่าเต็งรัง และทุ่งหญ้า ทั่วทุกภาคของประเทศ และภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ที่ความสูงตั้งแต่ระดับทะเลปานกลางถึง 1,200 เมตรเนื้อไม้ใช้ทำกระดาน เครื่องตกแต่งบ้าน ผลสุกรับประทานได้ น้ำต้มเปลือกต้นปรุงเป็นยาฝาดสมานและแก้ท้องเสีย กลีบเลี้ยงผลมีรสเปรี้ยว ใช้ปรุงรสอาหาร

2.8.8 โมกเครือ (*Aganosma marginata* G. Don) (รูปที่ 2.11(8))

ไม้เถาเลื้อย เนื้อแข็ง มีน้ำยางขาว ใบเดี่ยวออกตรงข้าม ตัวใบรูปขอบขนาน ผิวใบด้านบนเกลี้ยงมัน หรือมีขนประปราย ด้านล่างมีขนสั้นๆ ช่อดอกออกตามปลายยอด หรือตามซอกใบ ดอกรูปกรวย ปลายแยก 5 แฉก สีขาว ผลเป็นฝักยาว ออกเป็นคู่ ฝักแก่จะแตก 2 ซีก มีเมล็ดรูปขอบขนาน ปลายด้านหนึ่งมีขนยาวมีขาว จำนวนมาก พบตามป่าละเมาะ ป่าเบญจพรรณ เรือกสวน ชอบที่ร่มชุ่มชื้น เป็นพืชสมุนไพรที่มีคุณสมบัติเป็นยาระบายอ่อนๆ และขับปัสสาวะ

2.8.9 ไผ่ (*Bambusa arundinacea* Willd.) (รูปที่ 2.11(9))

ไผ่ป่าเป็นไผ่ขนาดใหญ่ กอแน่น มีหนาม และมีแขนงรกแน่น โดยเฉพาะตรงบริเวณโคนลำ สูงประมาณ 10-24 เซนติเมตร มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 15 - 18 เซนติเมตร ปล้องยาวประมาณ 20 - 40 เซนติเมตร เนื้อหนา 1 - 5 เซนติเมตร ลำอ่อนมีสีเขียว ลำแก่จะมีสีเขียวเหลือง ข้อมีลักษณะบวมเล็กน้อย รูกระบอกเล็ก กาบหุ้มลำลักษณะแข็งเหมือนหนัง ร่วงหลุดได้ง่าย ยาว 30 - 40 เซนติเมตร กว้าง 20 -30 เซนติเมตร ตอนปลายกลม ขอบเรียบและมีขนสีทอง ลำใหญ่กว้าง กระจับกาบหุ้มลำแคบ ใบยอดกาบเป็นรูปสามเหลี่ยม

2.8.10 เต็ง (*Shorea obtusa* Wall.) (รูปที่ 2.11(10))

เต็งเป็นไม้ต้น ผลัดใบ สูง 15 – 30 เมตร เรือนยอดเป็นพุ่มกว้าง ลำต้นมักไม่ค่อยตรง เปลือกสีน้ำตาลเทา แตกร่องและเป็นสะเก็ดหนา มักตกชันสีเหลืองขุ่น เปลือกในสีน้ำตาลแกมเหลือง ใบ เดี่ยว เรียงสลับ รูปขอบขนาน แผ่นใบรูปรีแกมรูปขอบขนาน ถึงรูปไข่กลับ กว้าง 5 – 7 เซนติเมตร ยาว 10 – 16 เซนติเมตร โคนใบและปลายใบมน ผิวใบมีขนสั้นสากมือ ถึงค่อนข้างเกลี้ยง เส้นแขนงใบ 15 – 20 คู่ ก้านใบยาว 1 – 1.5 เซนติเมตร ดอกสีขาวนวล ออกเป็นช่อตามปลายกิ่ง ผล กลมรี ถึงรูปไข่ กว้างประมาณ 0.8 เซนติเมตร ยาวประมาณ 1 เซนติเมตร มีปีกยาว 3 ปีก และปีกสั้น 2 ปีก เต็งมีการกระจายพันธุ์เป็นกลุ่มใหญ่ ในป่าเต็งรัง และป่าเบญจพรรณ ดินลูกรัง และเขาหินทรายทั่วทุกภาคของประเทศ ที่ความสูงจากระดับทะเลปานกลาง 150 – 1,300 เมตร ในต่างประเทศพบที่พม่า ลาว กัมพูชา และเวียดนาม ออกดอกเดือนกุมภาพันธ์ – พฤษภาคม ผลแก่เดือนเมษายน – กรกฎาคม เนื้อไม้สีน้ำตาลอ่อนถึงน้ำตาลแกมแดง ใช้ก่อสร้างได้แข็งแรงทนทาน เช่น เสา รอด ตง ขื่อ กระดานพื้น ไม้หมอนรถไฟ เปลือกใช้เป็นยาสมานแผล ห้ามเลือด รักษาแผลเรื้อรัง แผลพุพอง ชันใช้ผสมน้ำมันทาไม้ และยาแนวเรือ

2.9 การศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของราเอนโดไฟต์ในประเทศไทย

ในปี 1999 Rarunee และคณะ ได้ศึกษาพืชพื้นบ้านของประเทศไทย พบราเอนโดไฟต์ 200 ชนิด โดยราส่วนใหญ่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Shellfish Waste Agar ได้ดี มีเพียง 15 เปอร์เซ็นต์เท่านั้นที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวได้ อาหารเลี้ยงเชื้อนี้เหมาะต่อการเจริญของ และการสร้างเส้นใยของราเอนโดไฟต์ โดยเฉพาะกลุ่ม Xylariaceous และ *Collectotricum* spp. พบการสร้าง anamorph บนอาหารดังกล่าว

Chareprasert และคณะ (2006) ศึกษาราเอนโดไฟต์ราเอนโดไฟต์จากต้นสัก และจามจุรี โดย พบ *Phomopsis* sp. มากที่สุดนอกจากนี้ยังพบ *Schizophyllum commune* ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม Basidiomycetes ด้วย

Photita และคณะ (2001) ศึกษาราเอนโดไฟต์ในกล้วยป่า (*Musa acuminata*) ที่อุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ-ปุย พบรา 61 ชนิดในส่วนต่างๆของพืช ราที่พบได้แก่ ราในกลุ่ม Xylariaceous,

Dactrylaria sp., *Collectotricum* spp. ส่วนราที่พบมากที่สุดในการศึกษาครั้งนี้คือ *Deightoneilla torulosa*

Lumyong และคณะ (2000) ใช้เทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลในการจำแนกราเอนโดไฟต์ *Guignardia* sp.MK 3 พบว่ามีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Guignardia atmcola* โดยดูจากการเรียงตัวของ 18s rDNA

Mekkamol และคณะ (2000) ศึกษาการจำแนกและระบบนิเวศของเชื้อราเอนโดไฟต์ของต้นสัก *Tectona grandis* L. ที่จังหวัดเชียงใหม่ ราเอนโดไฟต์ที่พบในใบแก่ที่ได้จากป่าธรรมชาติและป่าปลูกไม่มีความแตกต่างกัน จากการเปรียบเทียบ

Cheeptham และคณะ (1999) แยกราเอนโดไฟต์จากไม้พื้นบ้านเพื่อหาสารปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อรา (antifungal antibiotic) โดยนำราที่แยกได้ 108 สายพันธุ์ เลี้ยงในอาหาร 4 ชนิด จากนั้นจึงนำมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* จำนวน 3 สายพันธุ์

Pongputthachart และคณะ (1999) ได้ศึกษาเชื้อราเอนโดไฟต์จากใบ และกิ่งของต้นก่อ *Castanopsis acuminatissima* โดยเก็บตัวอย่าง 5 บริเวณจากอุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ-ปุย จังหวัดเชียงใหม่จำนวน 4,500 ตัวอย่าง ตัวอย่างต้นก่อ 50 ต้น ผลการทดลองพบเชื้อราเอนโดไฟต์ 38 สกุล 68 ชนิด ส่วนใหญ่เป็นราในกลุ่ม Xylariaceae, Coelomycetes, Hyphomycetes และ Mycelia Sterilia

Lumyong และ Lumyong (1999) ศึกษาราเอนโดไฟต์ที่แยกจากใบ และกิ่งของต้นอบเชย *Cinnamomum iners* จำนวน 6 ต้น บนดอยสุเทพ จังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งสูงกว่าระดับน้ำทะเล 1,000 เมตรโดยทำการเปรียบเทียบระหว่าง 2 ฤดูในปี ค.ศ. 1998 พบราทั้งหมด 20 ชนิด ส่วนใหญ่เป็น Ascomycotina และ Deuteromycotina เชื้อราที่พบเป็นจำนวนมาก ได้แก่ Xylariaceous, *Collectotricum* spp., Mycelia sterilia และ *Phomopsis* spp. ส่วนเชื้อราชนิดอื่นที่พบได้แก่ *Guignardia* sp., *Thermomyces*, *Sporomella* และ *Beltramia* sp.

Norkeaw และ Lumyong (1999) ศึกษาประสิทธิภาพของเอนไซม์ xylanase, cellulase และ mannaase จากราเอนโดไฟต์ที่แยกพืชสมุนไพร 6 ชนิด ได้แก่ *Hibicus sabdariffa*, *Barleria luputinia*, *Rhinacanthus nasutus*, *Vitex trifolia*, *Cinchona succirubra* ที่อุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ-ปุย จังหวัดเชียงใหม่ สามารถแยกเชื้อราจากพืชทั้ง 6 ชนิดได้จำนวน 13, 8, 8, 10, 11 และ 7 ตามลำดับ

Pimolsri และ Lumyong (1999) ตรวจสอบหาสารยับยั้งเชื้อรา (antifungal activity) จากราเอนโดไฟต์จำนวน 148 สายพันธุ์ พบรา 25 สายพันธุ์สามารถยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคพืช ราดังกล่าวจำแนกเป็น *Xylaria* sp. และ *Fusarium* sp. จำนวน 23 และ 2 สายพันธุ์ ตามลำดับ

Techa และคณะ (1999) แยกเชื้อราเอนโดไฟต์จากใบและกิ่งของปาล์ม 2 ชนิด ได้แก่ *Calamus kerrianus* และ *Wallihia caryotoides* ราที่พบส่วนใหญ่ ได้แก่ *Phomopsis* sp., *Xylaria* sp., *Collectotrichum* sp., *Pestalotiosis* sp., *Guignardia* sp. และ Mycelia sterilia

2.10 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพสารทุติยภูมิที่ผลิตจากราเอนโดไฟต์

ราเอนโดไฟต์สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลากหลาย จากงานวิจัยต่างๆฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีการศึกษากันมากสามารถแยกได้ 3 ประเภทได้ ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์, ฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง และฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ เช่น ยับยั้งการเจริญของไวรัส, ยับยั้งการเจริญของไส้เดือนฝอย, ฤทธิ์ในการฆ่าแมลงได้

2.10.1 ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ (antimicrobial agents)

Wang และคณะ (2007) ศึกษาราเอนโดไฟต์ *Cladosporium* sp. ที่แยกได้จาก *Quercus variabilis* สามารถสาร Brefeldin A ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้ง *Candida albicans* ได้สูง

Chareprasert และคณะ (2006) ศึกษาราเอนโดไฟต์ราเอนโดไฟต์จากต้นสัก และจามจุรีโดยมีราเอนโดไฟต์ 37 ไอโซเลตสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ ได้แก่ *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* และ *Candida albicans*

Li และคณะ (2005) ได้แยกราเอนโดไฟต์จากพืชสมุนไพรของจีนทั้งหมด 12 ชนิด ได้ราเอนโดไฟต์ทั้งหมด 130 ไอโซเลต โดยเชื้อราส่วนใหญ่สามารถยับยั้งการเจริญของราก่อโรคในคนได้

Liu และคณะ (2004) ได้แยกราเอนโดไฟต์ *Aspergillus fumigatus* CY018 ซึ่งสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ 2 ชนิด ได้แก่ Asperfumoid (1) และ Asperfumin (2) โดยได้แยกราดังกล่าวจาก *Cynodon dactylon* สารทั้ง 2 ชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของราก่อโรคในคน *Candida albicans* ได้

Isaka และคณะ (2001) ได้พบ xanthone dimers ใหม่ ที่สกัดได้จากราเอนโดไฟต์ *Phomopsis* sp. BCC 1323 จากการทดลองในหลอดทดลองพบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อมาลาเรีย และมีฤทธิ์ยับยั้งวัณโรคและมีฤทธิ์ทำลายเซลล์มะเร็งได้อีกด้วย

Zou และคณะ (2000) ได้แยกราเอนโดไฟต์ *Colletotrichum gloeosporioides* จากต้น *Artemisia mongolica* ซึ่งสามารถผลิตสาร collectotric acid ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Bacillus subtilis*, *Staphyllococcus aureus*, *Sarcina lutea* และ *Helminthosporium sativum* และ *Chlorella fusca* ด้วยวิธี agar diffusion

Brandy และคณะ (2000) ได้แยกราเอนโดไฟต์ *Fusarium* sp. จากต้น *Selaginella pallescens* ซึ่งสามารถผลิตสารในกลุ่ม Pentaketide ชนิดใหม่ ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญ *Candida albicans* โดยเกิดวงใสขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 19-24 มิลลิเมตร

Strobel และคณะ (1999) ได้แยกราเอนโดไฟต์ *Cryptosporiopsis* cf. *quercina* จาก Tripterigeum wilfordii ซึ่งสามารถผลิตสาร Crytocandin ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญ*Candida albicans* โดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.03-0.07 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสามารถยับยั้งการเจริญของราโรคพืชหลายชนิด

Munday-Finch และคณะ (1998) ได้แยกราเอนโดไฟต์ *Neotyphodium lolli* จากใบ *Lotium perenne* ซึ่งสามารถผลิต indole-diterpenoids ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์หลายชนิด

Horn และคณะ (1995) ได้แยกราเอนโดไฟต์ *Phomopsis* sp. จากใบของ *Salix gracilostyla* var. *melanostachys* ซึ่งสามารถผลิต Phomopsichalasin จากการศึกษาโครงสร้างสารด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี พบว่าอยู่ในกลุ่มของ Cytochalasin ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ*Bacillus subtilis*, *Salmonella gallinarum*, *Staphylococcus aureus* และ*Candida tropicalis*ได้

2.10.2 ฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง (anticancer agents)

ปัจจุบันการศึกษาสารออกฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งกำลังเป็นที่น่าสนใจ เนื่องจากสถิติผู้ป่วยโรคมะเร็งชนิดต่างๆของประชากรโลกมีมากขึ้นทุกปี ยาที่ใช้ในการรักษามีราคาสูง และมีผลข้างเคียงต่อผู้ป่วย ดังนั้นสารสกัดจากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งจึงเป็นสิ่งที่ถูกให้ความสนใจมากขึ้น สำหรับรายงานการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเซลล์มะเร็งผลิตโดยราเอนโดไฟต์มีดังนี้

Kasettrathat และคณะ (2008) ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งจากราเอนโดไฟต์ *Nodulisporium* sp. พบว่าสามารถผลิต Nodulisporacid A ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ถึง หลายชนิด ได้แก่ HuCCA-1, KB, HeLa, T47D, HCC-S102 และ HL-60

Amal และคณะ (2008) ได้ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอนโดไฟต์ Ampelomyces sp. ซึ่งแยกได้จากต้น *Urospermum picroides* มีฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็งต่อมน้ำเหลืองของหนู โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 0.2–7.3 µg/ml.

Yoshihito และคณะ (2008) ศึกษาราเอนโดไฟต์ *Neonectria ramulariae* Wollenw KS-246 ซึ่งสามารถผลิตสาร Pyrrospirones A and B ซึ่งมีฤทธิ์ในการชักนำให้เกิดอะพอบโทซิสกับเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (Promyelocytic leukemia HL-60 cells)

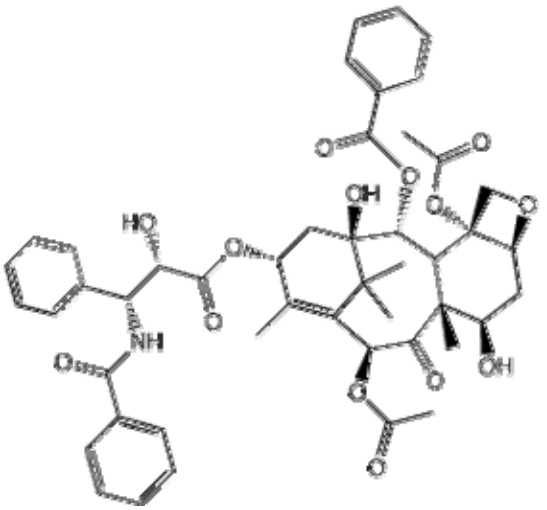
Li และคณะ (2005) แยกราเอนโดไฟต์จากพืชสมุนไพรในประเทศจีน จากนั้นนำส่วนสกัดมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (BGC - 823) พบว่าเชื้อรา 9.2 เปอร์เซ็นต์สามารถสร้างสารยับยั้งเซลล์มะเร็งดังกล่าวได้

Wang และคณะ (2002) แยกราเอนโดไฟต์ 2 ชนิดได้แก่ *Paecilomyces* sp. และ *Aspergillus clavatus* จากต้น *Taxus mairei* สามารถสร้างสาร Brefeldin A ซึ่งมีคุณสมบัติในการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้หลายชนิด

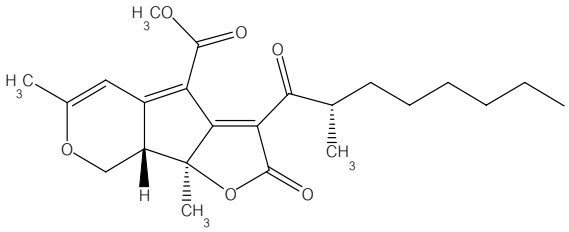
Wagenaar และคณะ (2001) ศึกษาราเอนโดไฟต์ *Phomopsis longicola* จากต้น *Dicerandra frutescens* ซึ่งสามารถผลิต Dicerandrols A, Dicerandrols B และ Dicerandrols C ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Staphyllococcus aureus* และ *Bacillus subtilis* และยังมีผลยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง 2 ชนิด ได้แก่ A549 และ HCT-116

Stierle และคณะ (1999) แยกราเอนโดไฟต์ *Aspergillus parasiticus* จากต้น *Sequoia sempavirens* ซึ่งสามารถผลิตสาร Sequoiatones A และ Sequoiatones B (รูปที่ 2..6)

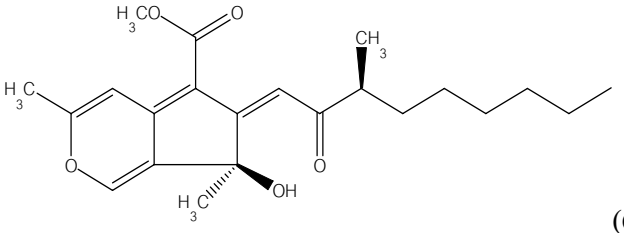
Strobel และคณะ (1996) สามารถสกัด Taxol (รูปที่ 2..6) จาก *Pestalotiopsis microspor*a ราเอนโดไฟต์ภายในเปลือกของก้าน Himalayan yew (*Taxus wallachiana*) ซึ่งเป็นสารที่พบได้จากพืชในสปีชีส์ Taxus และเป็นการค้นพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง



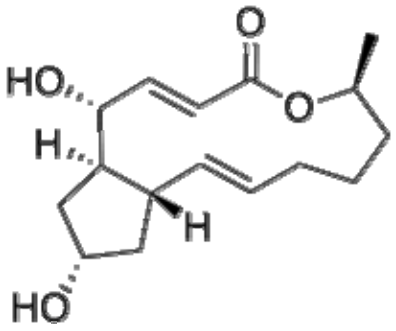
(A)



(B)



(C)

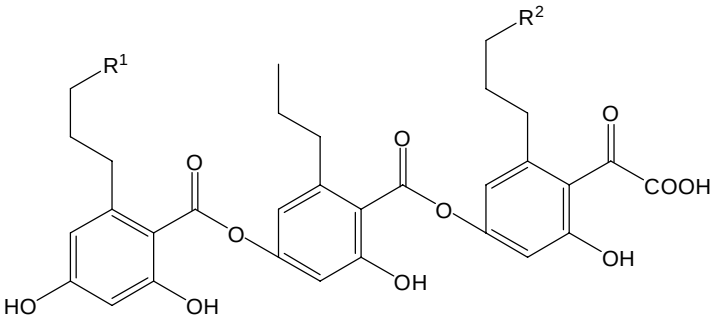


(D)

รูปที่ 2.12 โครงสร้างทางเคมีของ Taxol (A), โครงสร้างทางเคมีของ Sequoiatones A (C), โครงสร้างทางเคมีของ Sequoiatones B (B), โครงสร้างทางเคมีของ Brefeldin A (D)

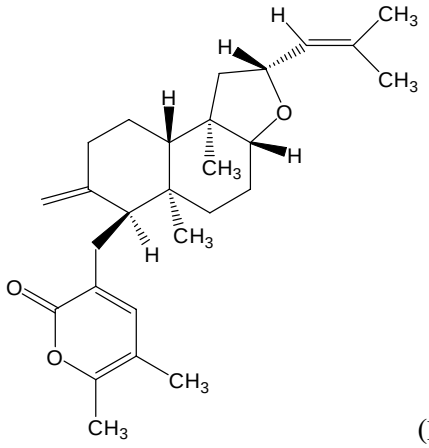
2.10.3 ฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ

ราเอนโดไฟต์สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลากหลาย นอกจากฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ และยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งแล้ว ยังสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของไวรัส, ฤทธิ์ในการกดภูมิคุ้มกัน, สารต้านอนุมูลอิสระ โดย Rukachaisirikul และคณะ (2007) ได้ศึกษาราเอนโดไฟต์ *Phomopsis* sp. PSU-D15 ซึ่งสามารถผลิตสาร phomoenamide (1) และ phomonitroester (2) ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุวัณโรค Mycobacterium tuberculosis H37Ra. ในปี 2000 Guo และคณะ แยกราเอนโดไฟต์ *Cytonaema* sp. ได้จากต้นโอ๊ค (*Quercus* sp.) สารที่ได้คือ Cytonic acids A และ Cytonic acids B (รูปที่ 2.13) จะมีฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัส human cytomegalovirus (hCMV) ที่เป็นเชื้อไวรัสที่ก่อโรคในคนได้ โดยเป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่สกัดได้มาจากการหมักแบบอาหารแข็ง (solid - state) และ ในปี 2002 Strobel และคณะ แยก ราเอนโดไฟต์ *Pestalotiopsis microspora* ที่แยกได้จากต้น *Terminalia morobensis* ซึ่งเป็นพืชที่อยู่ในป่าฝนเขตร้อน ทางตอนเหนือของประเทศปาปัวนิวกินีสามารถสร้างสารในกลุ่ม Isobensofuranone คือ Isopestacin (รูปที่ 2.13) โดยสารนี้นอกจากจะมีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์จำพวกราและแบคทีเรียแล้ว ยังพบว่ามีฤทธิ์ต้านการเกิดกระบวนการออกซิเดชัน โดยจะไปจับกับอนุมูลอิสระซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดเซลล์มะเร็งได้อีกด้วย ในปี 1995 Lee และคณะ ได้แยกราเอนโดไฟต์ *Fusarium subglutinans* จากไม้เถาของต้น *Taxus wifordii* ซึ่งสามารถผลิต Subglutinol A และ Subglutinol B (รูปที่ 2.13) ที่มีฤทธิ์ในการทำให้เกิด Immunosuppression หรือการป้องกันหรือลดผลตอบภูมิคุ้มกัน เช่น antimetabolites, antitymphocyteserum และ specific antibody ในปี 1992 Powell และ Petroski ได้ศึกษาราเอนโดไฟต์ *Neotyphodium coenophialum* และ *Clavicaeps purpurea* ที่อาศัยอยู่ในต้น *Festusa arundinacea* และ *Zizinia aquqtica* สามารถสร้างสารในกลุ่มของอัลคาลอยด์ เช่น Ergot alkaloid (รูปที่ 2.13) โดยสารชนิดนี้จะมีฤทธิ์เป็นพิษต่อเนื้อเยื่อประสาทของแมลงและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

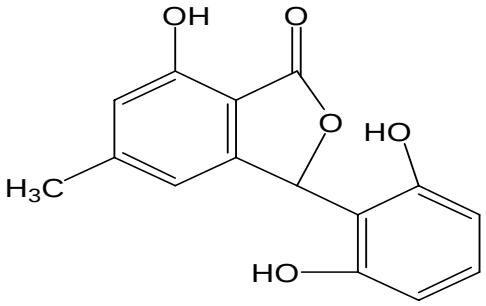


cytonic acid A R^1 = Et, R^2 = H
cytonic acid B R^1 = H, R^2 = Et

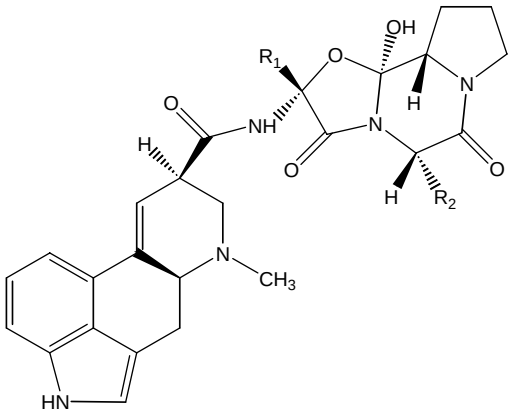
(A)



(B)



(C)



(D)

รูปที่ 2.13 โครงสร้างทางเคมีของ Cytonic acid A และ Cytonic acid B (A),โครงสร้างทางเคมีของ Subglutinol A (B), โครงสร้างทางเคมีของ Isopestacin (C), โครงสร้างทางเคมีของ Ergot alkaloid (D)

2.11 อะพ็อบโทซิส

Kerr JER (1965) ได้สังเกตปฏิกิริยาของเซลล์ตับหนูที่เกิด isochemic injury และพบปรากฏการณ์จบชีวิตหรือตายของเซลล์ที่มีความแตกต่างกัน 2 ลักษณะ คือ necrosis และ apoptosis ปรากฏการณ์ necrosis นั้นเซลล์จะบวมขึ้น ผนังเซลล์จะสูญเสียหน้าที่ และ นิวเคลียสบวมขึ้น เซลล์จะเกิดการแตกสลายทำให้เอนไซม์ภายในเซลล์ไหลออกมาจากเซลล์ และมีปฏิกิริยาทำอันตรายกับเซลล์ และเนื้อเยื่อข้างเคียง ก่อให้เกิดการอักเสบบริเวณ ส่วนปรากฏการณ์ apoptosis นั้นเซลล์จะเหี่ยวฝ่อ นิวเคลียสจะหดและฝ่อลง และถูกจับกินโดย phagocytes ซึ่งไม่ทำปฏิกิริยาที่เป็นอันตรายกับเซลล์ และเนื้อเยื่อข้างเคียง apoptosis เป็นภาษากรีก หมายถึง falling off มีการใช้คำว่า “apoptosis” และ “ program cell death” (PCD) อย่างสับสน ที่แท้จริงแล้ว อะพ็อบโทซิสเป็นส่วนหนึ่งของปรากฏการณ์ PDC โดย PDC เป็นนิยามการจบชีวิตของเซลล์ หรือสิ่งมีชีวิต ที่ถูกกำหนดขึ้นจากสารพันธุกรรม เช่นเดียวกับการกำหนดให้มีลายนิ้วมือ แต่อะพ็อบโทซิสนั้นเป็นการจบชีวิตของเซลล์เนื่องจากการได้รับอันตราย ซึ่งชื่อว่ามีความรุนแรงไม่มาก ทำให้เซลล์ต้องจบชีวิตลงหรือเข้าสู่ PDC เร็วกว่าที่ควรจะเป็นตามธรรมชาติ ในขณะที่ necrosis เป็นการจบชีวิตของเซลล์เนื่องจากการที่เซลล์ได้รับอันตรายอย่างรุนแรง ปรากฏการณ์อะพ็อบโทซิสได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก โดยปรากฏการณ์นี้พบได้มากในโรคเอดส์, โรคอัลไซเมอร์, โรคพาร์คินสัน ซึ่งเป็น neurodegenerative disorders เป็นต้น (ตารางที่ 2.2) เชื่อว่าการที่เซลล์เกิดอะพ็อบโทซิสหรือเข้าสู่ PCD ก่อนเวลาอันสมควรเนื่องมาจากเหตุผลดังต่อไปนี้

1. เนื่องจากเซลล์ถูกสร้างขึ้นเกินความจำเป็น เช่นในช่วงระหว่างเกิด embryogenesis
2. เนื่องจากเซลล์สูญเสียหน้าที่หรือไม่มีความจำเป็นต่อสิ่งมีชีวิตนั้นๆ ต่อไป เช่นในขณะที่เกิด metamorphopsis
3. เนื่องจากเซลล์นั้นเกิดการเปลี่ยนแปลง และเป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตนั้นๆ เช่นเซลล์ที่ได้รับอันตรายจากการสารกัมมันตรังสี, การติดเชื้อ เป็นต้น โดยที่ก่อให้เกิดอันตรายกับสารพันธุกรรม (ตารางที่ 2.3)

จากตารางที่ 2.2 จะเห็นได้ว่าโรคมะเร็งเป็นโรคที่กดปรากฏการณ์อะพ็อบโทซิส หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งว่าโรคมะเร็งทำให้เซลล์เข้าสู่ PCD (เกิดอะพ็อบโทซิส) ได้น้อยลง งานวิจัยนี้จึงศึกษาเพื่อค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีผลทำให้เซลล์มะเร็งมีการตายแบบอะพ็อบโทซิสสูงขึ้น

ตารางที่ 2.2 โรคที่มีผลต่อการเพิ่มและลดลงของปรากฏการณ์อะพ็อบโทซิส

โรคที่มีปรากฏการณ์อะพ็อบโทซิสสูงขึ้น	โรคที่มีการกดปรากฏการณ์อะพ็อบโทซิส
1. AIDS	1. Cancer
2. Neurogegenerative disorders	- Follicular lymphomas
- Alzkeimer's disease	- Carcinomas with p53 mutation
- Parkinson's disease	- Hormone - dependent tumors
- Amyotrophic lateral sclerosis	Breast cancer
- Retinitis pigmentosa	Prostate cancer
- Cerebellar degeneration	Ovarian cancer
3. Myelodysplastic syndromes	2. Autoimmune disorders
- Apastic anemia	- Systemic lupus erythematosus
4. Ischemic injury	- Immune – mediated
- Myocardial infarction	glomerulonephritis
- Stroke	3. Viral infection
- Reperfusion injury	- Herpesviruses
5. Toxin - induced liver disease	- Poxviruses
- Alcohol	- Adenoviruses

ตารางที่ 2.3 สารหรือปรากฏการณ์ที่กระตุ้นให้เกิดอะพ็อบโทซิส

Physiologic activations	Damage – related inducers
1. TNF family	1. Heat shock
- Fas ligand	2. Viral infection
- TNF	3. Bacterial toxins
2. Transforming growth factor ß	4. Oncogenes
3. Neurotransmitters	- *myc. Rel. E1A*
- Glutamate	5. Tumor suppressors *p53*
- Dopamine	6. Cytolytic T cells
- N-methyl-D-aspartate	7. Oxidants
4. Growth factor withdrawal	8. Free radicals
5. Loss of matrix attachment	9. Nutrient deprivation - antimetabolites
6. Calcium	
7. Glucocorticoids	
Therapy – associated agents	**Toxins**
1. Chemotherapeutic drugs	1. Ethanol
- cisplatin, doxorubicin, bleomycin, vincristine,	2. β – amyloid peptide
2. Gamma radiation	
3. UV radiation	

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (incubator) Memmert รุ่น BE600 บริษัท Jebsen and Jessen
2. ตู้ควบคุมอุณหภูมิภายใต้บรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2 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) Olmpus รุ่น BX51 บริษัท Olypus Optical Co., Ltd. Japan
8. กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ (inverted microscope) Olmpus รุ่น CK2 บริษัท Olypus Optical Co., Ltd. Japan
9. เครื่องระเหยแห้งสุญญากาศแบบหมุน (rotary vacuum evaporator) Eyela รุ่น N-1000 บริษัท Tokyo Rikakikai Co., Ltd. Japan
10. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) Hettich รุ่น Rotofix32 บริษัท Becthai, Germany
11. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น WB-710M บริษัท Optima, Japan
12. ฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemacytometer) ขนาด 0.0025 mm^2 ยี่ห้อ Loptik Labor
13. เครื่องอ่านค่าความดูดกลืนแสง (microplate reader) รุ่น ELX800 บริษัท Bio-Tek Instruments, Inc.
14. เครื่องพีซีอาร์ (Authorized thermal cycler) Takara รุ่น TP600 บริษัท Takara Bio, Inc. Japan
15. เครื่อง Electrophoresis chamber set รุ่น Mupid-ex บริษัท Advance
16. เครื่องถ่ายรูปเจล (Gel Doc) ยี่ห้อ Vilber Lourmat
17. เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (micro centrifuge)รุ่น CM-610T บริษัท Hslangtai
18. เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (micro refrigerated centrifuge) Kubota รุ่น 3700 บริษัท Kubota Corporation, Tokyo Japan
19. เครื่องไมโครเวฟ (microwave oven) Turbora รุ่น MW-2020

20. ตู้เย็น 4 °C (refrigerator) Mitsubishi รุ่น Tiara บริษัท Mitsubishi electric
21. ตู้เย็น -20 °C ยี่ห้อ Sharp
22. ตู้เย็น -80 °C รุ่น 8620 บริษัท Thermo Electron Corperation
23. เครื่อง UV-Transilluminator รุ่น TM-10E บริษัท UVP
24. เครื่อง Vortex mixer รุ่น VX-100 บริษัท Labnet International, Inc.
25. โกร่งบดยา (motar)
26. ไมโครปิเปต (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)
27. ปิเปตต์ทิป (pipette tip) บริษัท Axygen Scientific, Inc. USA
28. หลอดไมโครเซนติฟิวส์ (micro centrifuge tubes) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร บริษัท Axygen Scientific, Inc. USA
29. หลอดพีซีอาร์ (PCR tubes) ขนาด 200 ไมโครลิตร บริษัท Axygen Scientific, Inc. USA
30. พาราฟิล์ม
31. บีกเกอร์ (beaker)
32. ขวดแก้ว (bottle)
33. กระบอกตวง (cylinder)
34. ลูป (loop)
35. เข็มเขี่ยเชื้อ (needle)
36. ที่เจาะอาหารวุ้น (cork borer)
37. จานเลี้ยงเชื้อพลาสติก (petridish)
38. จานเลี้ยงเซลล์แบบ 96 หลุม (96 wells plate)
39. ขวดเลี้ยงเซลล์ ยี่ห้อ Corningบริษัท Corning Incorporated, USA
40. หลอดเก็บเซลล์
41. หลอดเซนติฟิวส์ขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร ยี่ห้อ Corning บริษัท Corning Incorporated, USA
42. ปิเปตแก้ว ขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร
43. เครื่องดูดจากปิเปต (pipette aid) ยี่ห้อ Drummond
44. หัวกรองอาหารเลี้ยงเซลล์ ขนาด 0.22 ไมโครเมตร ยี่ห้อ Corning บริษัท Corning Incorporated, USA

45. ถังไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen tank) รุ่น 34 HC ยี่ห้อ Taylor-Wharton Cryogenics บริษัท Harsco Corporation, USA
46. TLC aluminium sheet รุ่น Silica gel60 F_{254} บริษัท Merck, Germany
47. คอลัมน์แก้วสำหรับแยกสาร
48. ขวดแก้วก้นกลม
49. ขวดแก้วสำหรับเก็บสาร
50. เครื่อง Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Varian รุ่น Mercury 400
51. เครื่อง DNA sequencing รุ่น 3100XL ยี่ห้อ ABI บริษัท Applied Biosystem Incorporated

3.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. Agar
2. Bacto peptone
3. Glucose
4. Glycerol
5. Malt extract
6. DMSO (Dimethylsulfoxide) steried บริษัท Sigma, USA
7. Fetal Bovine Serum (FBS) ยี่ห้อ Hyclone บริษัท PERBIO
8. MTT (3-(4,5- dimethylthiazolyl-2-) 2,5- diphenylterazolium bromide) บริษัท Sigma, USA.
9. RPMI ยี่ห้อ Hyclone บริษัท PERBIO
10. Thyphan blue
11. Trypsin-EDTA steried filtered ยี่ห้อ Hyclone บริษัท PERBIO
12. Vanillin
13. ตัวทำละลาย ได้แก่ hexane, ethyl acetate, chloroform, methanol และ ethanol
14. Silica 60 (No 9385) ขนาดอนุภาค 0.040 – 0.063 mm (230 – 400 ASTM) บริษัท E. Merck, Germany
15. Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) บริษัท Serva
16. Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) บริษัท Scharlau
17. Isoamyl alcohol บริษัท Carlo erba
18. RNase
19. Polyethylene glycol (PEG) บริษัท Serva

20. Taq DNA polymerase บริษัท Fermentas
21. Loading dye
22. Primer
23. Bovine serum albumin (BSA)
24. dNTP
25. Boric acid
26. Tris- (hydroxymethyl)-amino methane (Tris base) บริษัท Scharlau
27. Agarose molecular biology grade บริษัท ISC Bio Express
28. Ethidium bromide
29. 100bp + 1.5 kb DNA ladder บริษัท SibEnzyme

3.3 เก็บตัวอย่าง แยกราเอนโดไฟต์จากตัวอย่างพืช และเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์

3.3.1 เก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างพืชจากป่าเต็งรัง จังหวัดน่าน โดยพืชที่ใช้ในการทำวิจัยมี 10 ชนิดได้แก่ พลวง ส้าน ชะมวง ไผ่ เต็ง รัง โมกเครือ เหมือด ตะขบป่า และชิงชัน โดยเก็บตัวอย่าง 2 ฤดูคือฤดูแล้งในช่วงเดือนมกราคม พ.ศ. 2550 และฤดูฝนในช่วงเดือนตุลาคม พ.ศ. 2550 ตัวอย่างที่เก็บต้องเป็นใบที่มีความสมบูรณ์แข็งแรงปราศจากอาการของโรค นำตัวอย่างบรรจุในถุงพลาสติกที่ปิดมิดชิด โดยมีสำลีชุบน้ำช่วยให้ความชื้น นำเข้าตู้เย็น ตัวอย่างที่จะนำมาใช้ในการทดลองต้องเก็บจากต้นมาไม่นานกว่า 48 ชั่วโมง

3.3.2 การแยกราเอนโดไฟต์ และเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์

การแยกราเอนโดไฟต์ใช้เทคนิคฆ่าเชื้อที่ผิว (surface sterilization) ตาม J.Y. Liu, 2006 นำตัวอย่างมาล้างทำความสะอาด ตัดเป็นชิ้นเล็กๆในบริเวณกลางใบ โคนใบ และปลายใบ ตัวอย่างละ 10 ตำแหน่ง นำมาฆ่าเชื้อด้วยเอทานอลความเข้มข้น 75 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที ตามด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรค์ที่ความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที ล้างสารละลายโดยการแช่ในน้ำกลั่นที่ปราศเชื้อจำนวน 2 ครั้ง จากนั้นนำไปวางบน Potato Dextrose Agar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิห้อง แยกจนได้เชื้อบริสุทธิ์ นำเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้ไปเก็บในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วโดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3.4 จำแนกชนิด และศึกษาความหลากหลายของราเอนโดไฟต์

3.4.1 จำแนกชนิดของราเอนโดไฟต์

สังเกตลักษณะการเจริญบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยการทำ slide culture เพื่อศึกษาลักษณะของเส้นใย ลักษณะของสปอร์ เช่น การจัดเรียงตัวของสปอร์ จำนวนสปอร์ ลักษณะผิวของสปอร์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อบ่งบอกชนิดของเชื้อราเอนโดไฟต์ในระดับสกุล (genus) ตาม Bernett และ Hunte (1987) และ Von Arx (1981) สำหรับราในตระกูล Xylariaceae จำแนกชนิดด้วยการชักนำให้สร้าง stroma ในอาหาร Corn Meal Agar (CMA)

3.4.2 ศึกษาความหลากหลายของราเอนโดไฟต์

ศึกษาความหลากหลายของราเอนโดไฟต์ โดยการวิเคราะห์ความถี่ของจำนวนราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากตัวอย่างพืชแต่ละชนิด (Colonization Frequency) (Khan และคณะ 2007) เพื่อเปรียบเทียบความถี่ของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากตัวอย่างพืชต่างชนิดกัน และต่างฤดูกาล

3.5 สกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

นำราเอนโดไฟต์ที่คัดเลือกไว้มาเลี้ยงในอาหารเหลว Malt Extract Broth (MEB) เวลาประมาณ 6 สัปดาห์ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบกำหนดนำมากรองจะได้ส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อ และนำส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อมาสกัดด้วยเอทิลแอซิเตตโดยเติมเอทิลแอซิเตตในปริมาตร 1:1 แล้วแยกส่วนสารสกัดจากเอทิลแอซิเตทออกมาทำการสกัดซ้ำอีก จนกว่าไม่มีสารสกัดละลายปนอยู่ในเอทิลแอซิเตต ในส่วนของเส้นใยสกัดโดยการนำเส้นใยไปบดเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วสกัดด้วยเอทิลแอซิเตต นำไปกรองแยกเส้นใยออก นำส่วนที่สกัดได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อมาผสมรวมกันกับส่วนที่สกัดได้จากเส้นใย นำไประเหยเอทิลแอซิเตต ออกด้วยเครื่องระเหยแบบหมุน ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จนแห้ง

3.6 ทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

3.6.1 ทดสอบความสามารถสารสกัดในการยับยั้งจุลินทรีย์โดย Paper disk susceptility (นิตยา และคณะ 2541)

จุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบมี 5 สายพันธุ์ โดยแบ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก 2 ชนิดได้แก่ *Bacillus subtilis* ATCC6633 และ *Staphylococcus aureus* ATCC25923 แบคทีเรียแกรมลบ 2 ชนิด ได้แก่ *Escherichia coli* ATCC25922 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027 และยีสต์ ได้แก่ *Candida albicans* ATCC7001

3.6.1.1 การเตรียมแบคทีเรียทดสอบ

นำแบคทีเรียทดสอบขีด (streak) บนอาหาร Nutrient agar (NA) เพื่อให้เป็นโคโลนีเดี่ยว บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง ใช้ลูปเขี่ยโคโลนีเดี่ยว 4 - 5 โคโลนี ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth (NB) 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 - 6 ชั่วโมง ขึ้นอยู่กับอัตราการเจริญเติบโตของแบคทีเรียหรือจนสังเกตเห็นว่าหลอดเชื้อขุ่น ปรับความขุ่นของแบคทีเรียทดสอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ให้มีความขุ่นเทียบเท่ามาตรฐาน 0.5 McFarland หรือโดยอ่านค่าจาก Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร ให้มีค่าดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.08 - 0.10 เพื่อให้มีเชื้อประมาณ 10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร

3.6.1.2 การเตรียมยีสต์ทดสอบ

นำยีสต์ทดสอบขีด (streak) บนอาหาร Sabouraud Dextrose Agar เพื่อให้เป็นโคโลนีเดี่ยว บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง ใช้ลูปเขี่ยโคโลนีเดี่ยวขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอย่างน้อย 1 มิลลิเมตร จำนวน 5 โคโลนี ละลายในสารละลาย 0.85% NaCl ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปรับความขุ่นของยีสต์ทดสอบให้มีความขุ่นเทียบเท่ามาตรฐาน 0.5 McFarland หรือโดยอ่านค่าจาก Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร ให้มีค่าดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.08-0.10 เพื่อให้มีเชื้อประมาณ 1×10^6 - 3×10^6 CFUต่อมิลลิลิตร

3.6.1.3 การทดสอบการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์

นำส่วนสกัดที่ได้จากข้อ 3.5 มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ โดยนำจุลินทรีย์ทดสอบที่เตรียมไว้จาก ข้อ 3.6.1.1 และ 3.6.1.2 ป้ายบนผิวหน้าอาหารโดยใช้ไม้พันสำลีปราศจากเชื้อจุ่มลงในหลอดเชื้อ ป้ายลงบนผิวหน้าอาหาร Muller-Hinton Agar (สำหรับแบคทีเรียทดสอบ) Sabouraud Dextrose Agar (สำหรับยีสต์ทดสอบ) เมื่อป้ายเชื้อทดสอบทั่วในลักษณะสามทิศทางแล้วทิ้งไว้ 3-5 นาที เพื่อให้ผิวหน้าของอาหารแห้ง จากนั้นใช้ Paper disk จุ่มลงในส่วนสกัด นำไปวางลงบนผวหน้าอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรียทดสอบ ส่วนยีสต์ทดสอบบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง วัดความกว้างของบริเวณวงใสที่เกิดขึ้น (clear zone) โดยตัวควบคุมบวก ของแบคทีเรียได้แก่ streptomycin สำหรับยีสต์คือ nystatin ตัวควบคุมลบ คือ DMSO

3.6.2 ทดสอบความสามารถสารสกัดในการยับยั้งเซลล์มะเร็งโดย 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl) -2,5- diphenyltetrazolium bromide calorimetric assay (MTT) (Palaga และคณะ, 1996)

นำเซลล์มะเร็ง (cell line) ได้แก่ เซลล์มะเร็งเต้านม (BT 5) เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร(KATO III) เซลล์มะเร็งปอด (CHAGO) เซลล์มะเร็งตับ (Hep -G2) และเซลล์มะเร็งลำไส้ (SW 620) นำเซลล์มะเร็งดังกล่าวมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มีการเติม fetal calf serum 10% (ปริมาตร/ปริมาตร) ในหลุมของ microtiter plates หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% แล้วเติมสารสกัดที่ได้จากข้อ 3.1 ปริมาตร 1-5 ไมโครลิตร ลงในหลุมที่มีเซลล์มะเร็งเจริญอยู่ บ่มที่สภาวะเดิมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติมสารละลาย MTT ลงไป 20 ไมโครลิตร บ่มที่สภาวะเดิมเป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วเติม isopropanol ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เพื่อทำละลายผลึก formazan นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง microplate reader แล้วแปลข้อมูลออกมาเป็นเปอร์เซ็นต์ของจำนวนเซลล์มะเร็งที่มีการอยู่รอด

3.6.2.1 การทดสอบการตายแบบอะพ็อบโทซิส (Apoptosis test)

เลี้ยงเซลล์ให้ได้เซลล์ 1 $\times$ 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ดูดสารละลายเซลล์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์ขนาดเล็กที่มีแผ่น cover slip ปราศจากเชื้อวางอยู่ จากนั้นหยดสารที่จะทดสอบลงบน cover slip ใช้ etoposide กระตุ้นการเกิดอะพ็อบโทซิสเป็นชุดควบคุมบวก บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เซลล์จะเจริญโดยเกาะกับแผ่น cover slip จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก และเติมสารละลาย 1% glutaraldehyde ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในจานเลี้ยงเซลล์ บ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นดูด glutaraldehyde ทิ้ง และล้างแผ่น cover slip ด้วยสารละลาย 1x PBS ปริมาตร 30 ไมโครลิตร นำเซลล์ที่เกาะอยู่กับแผ่น cover slip ตรวจสอบการตายแบบ อะพ็อบโทซิส โดยการหยดสารละลาย 1x PBS ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงบนแผ่นสไลด์ เติมสี Hoechst 33342 ความเข้มข้น 1 mM ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ใช้ปากคีบ คีบแผ่น cover slip ที่มีเซลล์เกาะอยู่วางคว่ำลงบนแผ่นสไลด์ ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 5 นาที เคลือบขอบ cover slip ยาทาเล็บ นำไปเซลล์ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบฟลูโอเรสเซนต์ เซลล์ที่ตายแบบอะพ็อบโทซิสจะมีการหดตัวของเซลล์ และนิวเคลียส

3.6.2.2 การตรวจสอบเวลาที่เกิดอะพ็อบโทซิสสูงสุด

เลี้ยงเซลล์มะเร็งตามวิธี 3.6.2.1 โดยบ่มในเวลาที่เวลาต่างๆได้แก่ 24, 36, 48, 72 ชั่งโมง ตรวจสอบการตายแบบ อะพ็อบโทซิส โดยการหยดสารละลาย 1x PBS ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงบนแผ่นสไลด์ เติมสี Hoechst 33342 ความเข้มข้น 1 mM ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ใช้

ปากคีบ คีบแผ่น cover slip ที่มีเซลล์เกาะอยู่วางคว่ำลงบนแผ่นสไลด์ ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 5 นาที เคลือบขอบ cover slip ยาทาเล็บ นำไปเซลล์ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูโอเรสเซนต์

3.7 พิสูจน์เอกลักษณ์ทางอณูชีววิทยาของราเอนโดไฟต์ที่คัดเลือกได้

3.7.1 การสกัดดีเอ็นเอของราเอนโดไฟต์

การสกัดดีเอ็นเอทำโดยการเลี้ยงเส้นใยของราเอนโดไฟต์ในอาหารเหลว จากนั้นกรองและนำมาบดให้ละเอียดในโกร่ง จากนั้นนำมาสกัดด้วย cetyltrimethylammonium bromine (CTAB) ตามวิธีของ Zhou และคณะ (1991) นำเส้นใยที่บดแล้วมาเติม CTAB buffer (ภาคผนวก ค) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปสกัดด้วย Phenol chloroform และ isoamyl alcohol และสกัดซ้ำด้วย chloroform - isoamyl alcohol ความเข้มข้น 24:1 (ภาคผนวก ค) 2 ครั้ง ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย isopropanol นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดีเอ็นเอที่ได้นำมาละลายใน TE buffer (ภาคผนวก ค) นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส

3.7.2 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส

ไพรเมอร์ที่ใช้ คือ ITS 1f และ ITS 4 โดยอ้างอิงจาก Gardes และ Bruns (1993) และ White และคณะ (1990)

ITS 1 (5’-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3’)

ITS 4 (5’- TCCTCCGCTTATTGATATGC-3’)

จากนั้นทำปฏิกริยาลูกโซ่พอริเมอเรส (Polymerase chain reaction, PCR) โดยใช้สารละลายดีเอ็นเอจากขั้นตอนที่ 3.7.1 เป็นแม่แบบ (template) ซึ่งในส่วนผสมที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาปริมาตร 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

1. 10x buffer ปริมาตร 1 ไมโครลิตร
2. forward primer (20 μM) ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร
3. reverse primer (20 μM) ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร
4. Taq DNA polymerase (5U) ปริมาตร 0.1 ไมโครลิตร
5. น้ำกลั่นปลอดเชื้อ ปริมาตร 6.3 ไมโครลิตร
6. DNA template ปริมาตร 1 ไมโครลิตร

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสประกอบด้วยขั้นตอน ดังนี้ ปฏิกิริยาเริ่มต้น (initial denaturation) 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยาทั้งหมด 38 รอบ โดยแต่ละรอบประกอบด้วยขั้นตอนการแยกคู่สายดีเอ็นเอ (denaturation) 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที การเข้าจับคู่กันใหม่ (Annealing) ที่ 51 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ การเพิ่มความยาวของสายดีเอ็นเอ

(extension) ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และสิ้นสุดปฏิกิริยาด้วยการเพิ่มความยาวสายดีเอ็นเอ (final extension) ที่ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที (Kanchanaprayudh และคณะ, 2003)

3.7.3 การตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอโดยวิธีเจลอิเล็คโทรโฟริซิส

ตรวจสอบยีนที่ได้จากการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (PCR product) โดยการทำเจลอิเล็คโทรโฟริซิส เตรียมอะกาโรสเจล (ภาคผนวก ค) หลอม และเทลงในแม่พิมพ์ที่มีหวี (comb) เสียบอยู่ แล้วปล่อยให้เจลแข็งตัว ผสมสารละลายดีเอ็นเอกับสีติดตาม (loading dye) ในอัตราส่วน 5 : 2 และหยอดตัวอย่างลงในหลุมอะกาโรสเจล จากนั้นนำไปทำอิเล็คโทรโฟริซิสในเครื่อง Electrophoresis chamber โดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที ตรวจสอบการเรืองแสงของดีเอ็นเอ โดยการย้อมด้วย Ethidium bromide (ภาคผนวก ค) ส่องภายใต้รังสี UV ตรวจสอบขนาดของยีนโดยการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp + 1.5 kb DNA ladder

3.7.4 วิเคราะห์หาลำดับเบส

นำผลิตภัณฑ์ของการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้ ตามขั้นตอนที่ 3.7.3 มาวิเคราะห์หาลำดับเบสของชิ้นส่วนยีนที่ประมวลรหัส โดยวิธี derect sequencing โดยส่งไปวิเคราะห์หาลำดับเบสที่ สถาบันอณูชีววิทยาและพันธุศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

3.8 การแยกองค์ประกอบทางเคมีของส่วนสกัดและการทำให้บริสุทธิ์

3.8.1 การแยกองค์ประกอบทางเคมีของส่วนสกัดของราเอนโดไฟต์ DTD 6 และการทำให้บริสุทธิ์

นำราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ DTD 6 เลี้ยงในอาหารเหลว Malt Extract Broth (MEB) เวลาประมาณ 4-6 สัปดาห์ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบกำหนดนำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 จะได้ส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อ และนำส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อมาสกัดด้วยเอทิลแอซิเตทโดยเติมเอทิลแอซิเตทในปริมาตร 1:1 จากนั้นนำส่วนของเส้นใยนำมาปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น (blender) นำไปสกัดด้วยเอทิลแอซิเตต นำส่วนสกัดทั้งสองส่วนรวมกัน จากนั้นนำไประเหยด้วยเครื่องระเหยแบบหมุน

หลังจากระเหยตัวทำละลายแล้วได้ผลึกสีขาวปนน้ำมันสีเหลือง ทำการตกผลึกใหม่ด้วยเฮกเซน จะได้ของแข็งสีขาวปริมาณ 33 มิลลิกรัม (สารบริสุทธิ์ 1) เมื่อนำสารดังกล่าวไปแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง (thin layer chromatography: TLC) โดยใช้ระบบตัวทำละลาย คือ เฮกเซน:เอทิลแอซิเตต ในอัตราส่วน 20:80 จากนั้นนำไปย้อมด้วย vanillin ทำให้แห้งพบว่ามีจุดเดียว มีค่า Rf เท่ากับ 0.78

FT-IR สเปกตรัม ν_{max} (cm^{-1}): 2855 (s), 1656 (m), 1577 (m), 1460 (m), 1348 (m), 1274 (s), 1169 (m), 1107 (m), 1049 (m), 1016 (m) (รูปในภาคผนวก ง.)

^{1}H- NMR spectrum ($CDCl_3$, 400 MHz) δ(ppm) : 3.68(s, 3H, OCH_3-7), 6.84(d, *J* = 3 Hz, 1H, H-2), 6.86(d, *J* = 3 Hz, 1H, H-6), 7.35(dd, *J* = 2.0, 2.0 Hz, 1H, H-3), 7.38(dd, *J* = 4.0,5.0 Hz, 1H, H-5), 7.40(d, *J* = 3.0 Hz, 1H, H-4) (รูปในภาคผนวก ง.)

^{1}C- NMR spectrum ($CDCl_3$, 100 MHz) δ(ppm) : 29.65(CH_3-7), 29.69(CH-6), 56.41(CH-4), 106.08(CH-3), 120.81(CH-5), 120.81(CH-2), 157.02(CH-1) (รูปในภาคผนวก ง.)

3.8.2 การแยกองค์ประกอบทางเคมีของส่วนสกัดของราเอนโดไฟต์ FID 15 และการทำให้บริสุทธิ์

นำราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ FID 15 เลี้ยงในอาหารเหลว Malt Extract Broth (MEB) เป็นเวลา 4 - 6 สัปดาห์ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบกำหนดนำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 จะได้ส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อ และนำส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อมาสกัดด้วยเอทิลแอซิเตทโดยเติมเอทิลแอซิเตทในปริมาตร 1:1 จากนั้นนำส่วนของเส้นใยนำมาปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น (blender) นำไปสกัดด้วยเอทิลแอซิเตต นำส่วนสกัดทั้งสองส่วนรวมกัน จากนั้นนำไประเหยด้วยเครื่องระเหยแบบหมุน

ได้ของแข็งสีส้ม ปริมาณ 80 มิลลิกรัม นำส่วนสกัดดังกล่าวมาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ที่มีซิลิกาเป็นตัวดูดซับ ใช้ตัวทำละลายเริ่มจาก เฮกเซน, เฮกเซน - เอทิลแอซิเตต และ เมทานอล ผลที่ได้แสดงดังตารางที่ 3.1

ได้ผลึกรูปเข็มสีขาวปริมาณ 4.5 มิลลิกรัม (สารบริสุทธิ์ 2) ที่ได้จากส่วนที่ F5 จากการแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยตัวชะคือ เฮกเซนและเอทิลแอซิเตต ในอัตราส่วน 50:50 ถึง 40:60

ตารางที่ 3.1 การแยกส่วนสกัดจากราเอนโดไฟต์ สายพันธุ์ FID 15

ลำดับส่วนที่	ตัวชะ	ลักษณะสาร	น้ำหนัก
	เฮกเซน : เอทิลแอซิเตต		(มิลลิกรัม)
F1 (1-3)	100:0 ถึง 90:10	-	-
F2 (4-6)	90:10 ถึง 80:20	น้ำมันสีเหลือง	5.4
F3 (6-11)	80:20 ถึง 60:40	ของเหลวหนืดสีน้ำตาล	13.6
F4 (12-14)	60:40 ถึง 50:50	ของเหลวหนืดสีเหลือง	8.1
F5 (14-16)	50:50 ถึง 40:60	ผลึกรูปเข็มสีขาว	4.5
F6 (17-21)	40:60 ถึง 20:80	ผลึกสีขาวปนน้ำมัน	7.7
F7 (22-24)	20:80 ถึง 0:100	ของเหลวหนืดสีเหลือง	12.5
	เอทิลแอซิเตต : เมทานอล		
F8 (25-27)	0:100 ถึง 50:50	ของแข็งสีขาว	4.4
F9 (27-30)	50:50 ถึง :100	ของแข็งสีขาว	10.2

FT-IR สเปกตรัม ν_{max} (cm^{-1}) : 3409(s), 1733(m), 1693(m), 1449(s), 1369(s), 1227(w) และ 1008(w) (รูปในภาคผนวก ง.)

^{1}H- NMR spectrum ($CDCl_3$, 400 MHz) δ(ppm) : 7.332 (2H, dd, *J* = 7.2 และ 7.6 Hz, 3-H และ 5-H), 7.260 (1H, dd, *J* = 7.2 และ 7.6 Hz, 4-H), 7.118 (2H, dd, *J* = 6.8 Hz, 2-H และ 6-H), 6.128 (1H, dd, *J* = 2.8 และ 12.8 Hz, 20-H), 5.717 (1H, dd, *J* = 9.6 และ 15.6 Hz, 13-H), 5.693 (1H, t, *J* = 2.0 และ 2.0 Hz, 21-H), 5.372 (1H, dd, *J* = 5.2 และ 10.0 Hz, 14-H), 5.333 (2H, s, 12-H), 5.158 (1H, dd, *J* = 2.4 และ 16 Hz, H-19), 5.118 (2H, s, H-12), 3.819 (1H, d, *J* = 10.4 Hz, H-7), 3.239 (1H, dt, *J* = 4.4 และ 9.2 Hz, 3-H), 2.873 (1H, dd, *J* = 10 และ 9.6 Hz, 8-H), 2.848 (2H, dd, *J* = 4.8 และ 12.4 Hz, 10-H), 2.794 (1H, 16-H), 2.758 (1H, d, *J* = 5.6 Hz, 5-H), 2.717 (2H, dd, *J* = 9.2 และ 1.32 Hz, 10-H), 2.550 (2H, q, *J* = 11.2 Hz, 15- H), 2.303 (3H, s, H-CH_3 (Ac)), 2.171 (1H, dd, *J* = 3.6 และ 4.4 Hz, 4-H), 2.044 (2H, dd, *J* = 5.6 และ 14.4 Hz, 15-H), 1.540 (3H, s, 23-H), 1.246 (3H, d, *J* = 6.4 Hz, 22-H), 0.959 (3H, d, *J* = 6.8 Hz, H-11) (รูปในภาคผนวก ง.)

^{1}C- NMR spectrum ($CDCl_3$, 100 MHz) δ(ppm) : 210.319 (C-17), 173.640 (C-1), 169.728 ($CH_3\underline{C}(O)$), 147.460 (C-6), 137.233 (C-1), 134.152 (C-14), 132.268 (C-20), 130.583 (C-13), 129.065 (C-2), 128.943 (C-3), 127.601 (C-19), 127.098 (C-4), 114.538 (C-12), 77.696 (C-18), 77.223 (C-21), 69.810 (C-9), 53.544 (C-3), 53.254 (C-9), 50.013 (C-4), 46.962 (C-8), 45.315 (C-8), 45.315 (C-10), 42.318 (C-16), 37.704 (C-15), 32.656 (C-5), 24.160 (C-23), 2.858 (C-CO), 19.386 (C-22), 13.659 (C-11) (รูปในภาคผนวก ง.)

3.9 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

นำสารทั้ง 2 ชนิดมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง โดยวิธีตามข้อ 3.6

3.10 การพิสูจน์เอกลักษณ์สารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปี

3.10.1 Fourier transform infrared spectrometry (FT-IR)

เตรียมสารตัวอย่างให้เป็นของแข็งโดยนตัวอย่างมาผสมกับโพแทสเซียมโบรไมด์ (KBr) บดให้ละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำไปอัดให้เป็นแผ่นบางๆ แล้วนำไปทดสอบ FT-IR ด้วยเครื่อง Perkin – Elmer Model 1760x Fourier transform infrared spectrophotometry ตั้งแต่เลขคลื่น 4,000 ถึง 400 cm^{-1}

3.10.2 Nuclear magnetic resonance spectrometry (NMR)

วัด 1H-NMR, 13 C-NMR, gCOSY, gHSQC, gHMBC, gNOESY และ gTOCSY spectra ด้วย Varian Spectrometer ที่ความถี่ 400 MHz สำหรับโปรตอน และความถี่ 100 MHz สำหรับคาร์บอน-13 ปริมาณเคมมิคอลชิฟท์ วัดในหน่วยพีพีเอ็ม (ppm) เปรียบเทียบกับมาตรฐาน protonate chloroform ที่มีค่าเคมมิคอลชิฟท์ เท่ากับ 7.26 ppm

บทที่ 4

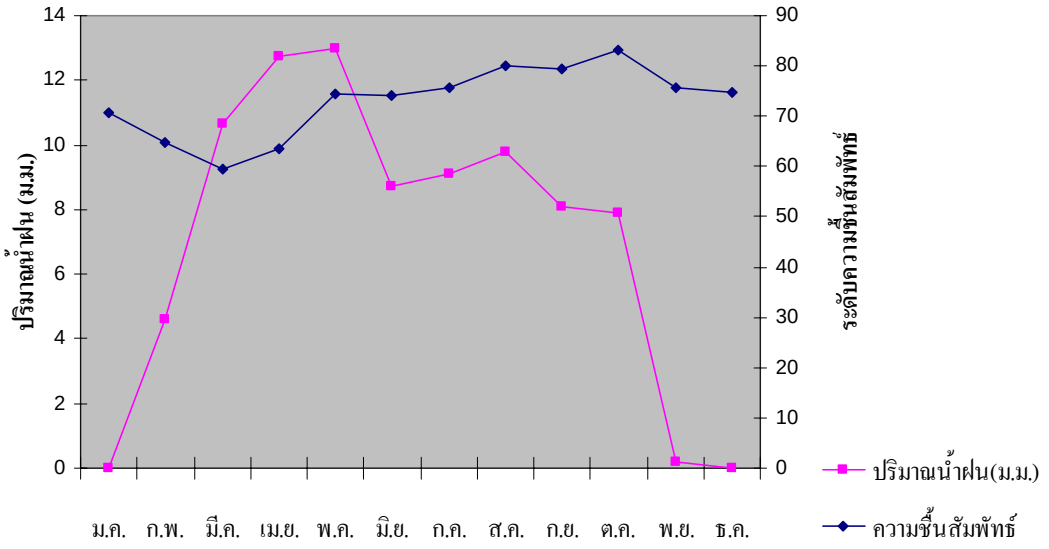
ผลการทดลอง และวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การเก็บตัวอย่างใบพืช

เก็บตัวอย่างใบพืชในป่าเต็งรัง ตำบลไหล่น่าน อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน ประเทศไทย โดยเก็บตัวอย่าง 2 ฤดู ได้แก่ฤดูแล้งในช่วงเดือนมกราคม พ.ศ. 2550 ซึ่งมีปริมาณน้ำฝนเฉลี่ยเท่ากับ 4.60 ม.ม. และฤดูฝนในช่วงเดือนตุลาคม พ.ศ. 2550 ซึ่งมีปริมาณน้ำฝนเฉลี่ยเท่ากับ 7.88 ม.ม. ปริมาณน้ำฝน และปริมาณความชื้นสัมพัทธ์เฉลี่ยทั้งปี พ.ศ. 2550 แสดงดังรูปที่ 4.1 ชนิดของพืชตัวอย่างทั้ง 10 ชนิด แสดงในตารางที่ 4.1 การเก็บตัวอย่างเก็บเฉพาะใบที่แข็งแรงปราศจากอาการของโรคในช่วงเวลา 10.00 – 12.00 น.

ตารางที่ 4.1 ตัวอย่างพืชจากป่าเต็งรัง อ.เวียงสา จ.น่าน ที่นำมาใช้แยกราเอนโดไฟต์

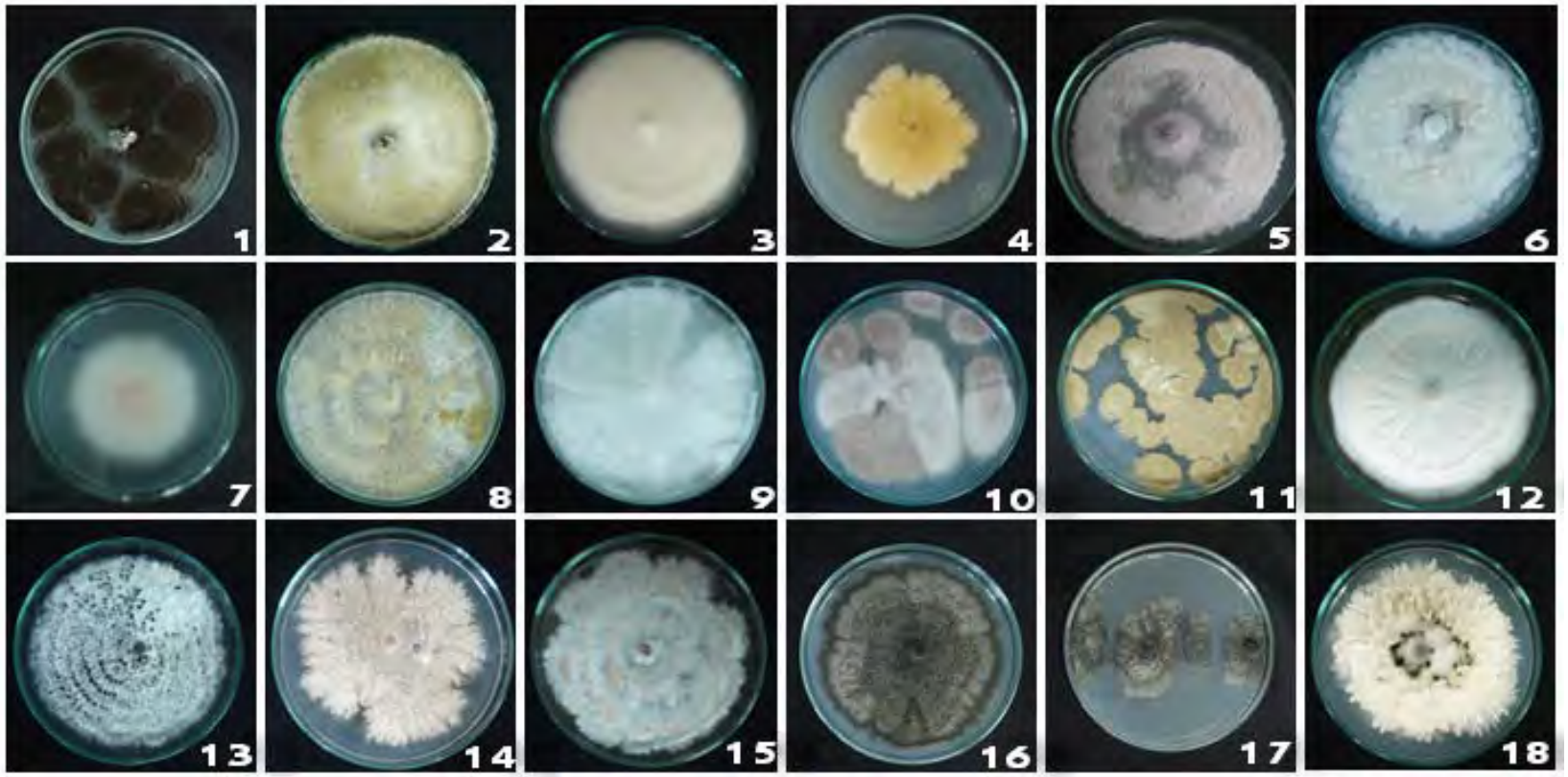
ลำดับที่	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อสามัญ	วงศ์
1	*Dipterocarpus tuberculatus* Roxb.	ยางพลวง	DIPTEROCARPACEAE
2	*Dillenia parviflora* Griff.	ส้านหิ่ง	DILLENIACEAE
3	*Shorea siamensis* Miq.	รัง	DIPTEROCARPACEAE
4	*Garcinia nigrolineata* Planch.	ชะมวง	GUTTIFERAE
5	*Shorea obtusa* Wall.	เต็ง	DIPTEROCARPACEAE
6	*Bambusa arundinacea* Willd.	ไผ่	GRAMINEAE
7	*Aganosma marginata* G. Don	โมกเครือ	APOCYNACEAE
8	*Dillenia ovata* Wall. ex Hook. f. & Th.	ส้านใบเล็ก	DILLENIACEAE
9	*Flacourtia indic* Merr.	ตะขบป่า	FLACOURTIACEAE
10	*Dalbergia oliveri* Gamble.	ชิงชัน	PAPILIONACEAE



รูปที่ 4.1 ปริมาณน้ำฝนและระดับความชื้นสัมพัทธ์

4.2 ราเอนโดไฟต์ที่แยกจากใบพืชในป่าเต็งรังทั้ง 10 ชนิด

ได้ราเอนโดไฟต์ทั้งหมด 302 ไอโซเลต 18 ชนิด 10 สกุล โดยราที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันแสดงดังรูป 4.2 จากการเก็บตัวอย่างพืช 10 ชนิดทั้ง 2 ฤดู พบว่าในฤดูแล้งสามารถแยกราเอนโดไฟต์ได้มากที่สุดจากต้นรัง 18 ไอโซเลต และยางพลวง 17 ไอโซเลต ในฤดูฝนสามารถแยกราเอนโดไฟต์ได้มากที่สุด 23 ไอโซเลต จากต้นส้านใบเล็ก และยางพลวง ราเอนโดไฟต์ทั้งหมดที่แยกได้จากพืชแต่ละชนิด แสดงดังตารางที่ 4.2 - 4.23 และราเอนโดไฟต์เปรียบเทียบทั้ง 2 ฤดู พบว่าสามารถแยกราในฤดูฝนได้ 175 ไอโซเลต และแยกราในฤดูแล้งได้ 127 ไอโซเลต แสดงในตารางที่ 4.24 จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าปริมาณน้ำฝนมีส่วนสำคัญต่อปริมาณราเอนโดไฟต์ และเมื่อปริมาณน้ำฝนลดลงจำนวนราที่พบก็ลดลงเช่นกัน (Fisher และคณะ 1994) ซึ่งปริมาณน้ำฝนเฉลี่ยในเดือนตุลาคมเท่ากับ 8.5 มิลลิเมตรต่อวัน ในขณะที่การเก็บตัวอย่างในฤดูแล้งในเดือนมกราคมไม่มีปริมาณน้ำฝนเลย (รูปที่ 4.1) ราเอนโดไฟต์ที่แยกได้มากที่สุด 3 อันดับแรกจากการเก็บตัวอย่างทั้ง 2 ฤดูได้แก่ *Phyllosticta* sp.1 60 ไอโซเลต, *Phomopsis* sp.1 54 ไอโซเลต และ *Xylaria* sp. 1 44 ไอโซเลต (รูปที่ 4.2) ผลการวิจัยนี้สอดคล้องกับผลงานวิจัยที่แยกราเอนโดไฟต์จากต้นบุนนาค (*Mesua ferrea*) บริเวณดอยสุเทพ จังหวัดเชียงใหม่ ราที่พบมากได้แก่ *Guignardia* sp. ซึ่งเป็น teleomorph ของ *Phyllosticta* sp. ส่วนราที่พบรองลงมาได้แก่ *Phomopsis* sp., *Xylaria* sp. และ *Geosporium* sp. ตามลำดับ (สายสมร และคณะ, 2541)



รูปที่ 4.2 ราเอนโดไฟต์ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันจากพืชในป่าเต็งรัง จ.น่านทั้ง 2 ฤดู

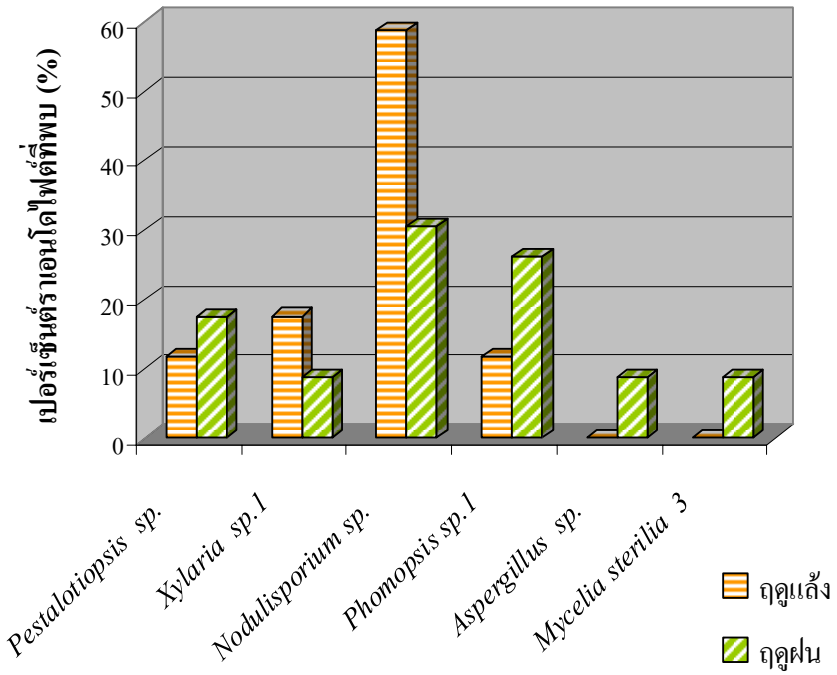
(1) *Aspergillus* sp.1, (2) *Daldinia* sp., (3) Mycelia sterilia 2, (4) Mycelia sterilia 3, (5) *Fuusarium* sp.1, (6) *Xylaria* sp.3, (7) *Fusarium* sp.2, (8) *Nodulisporium* sp., (9) Mycelia sterilia 1, (10) *Paecilomyces* sp., (11) *Penicillium* sp., (12) *Xylaria* sp.2, (13) *Pestalotiopsis* sp. (14) *Phomopsis* sp.1 (15) *Phomopsis* sp.2, (16) *Phyllosticta* sp.1, (17) *Phyllosticta* sp.2, (18) *Xylaria* sp.1

ตารางที่ 4.2 ราเอนโดไฟต์ที่แยกจากใบยางพลวง (*Dipterocarpus tuberculatus* Roxb)

ฤดูแล้ง		ฤดูฝน	
รหัส	ราเอนโดไฟต์	รหัส	ราเอนโดไฟต์
DTD 1	*Pestalotiopsis* sp.	DTW 1	*Pestalotiopsis* sp.
DTD 2	*Pestalotiopsis* sp.	DTW 2	*Pestalotiopsis* sp.
DTD 3	*Phomopsis* sp.1	DTW 3	*Phomopsis* sp.1
DTD 4	*Xylaria* sp.1	DTW 4	*Phomopsis* sp.1
DTD 5	*Nodulisporium* sp.	DTW 5	*Phomopsis* sp.1
DTD 6	*Nodulisporium* sp.	DTW 6	*Phomopsis* sp.1
DTD 7	*Nodulisporium* sp.	DTW 7	*Phomopsis* sp.1
DTD 8	*Nodulisporium* sp.	DTW 8	*Nodulisporium* sp.
DTD 9	*Nodulisporium* sp.	DTW 9	*Nodulisporium* sp.
DTD10	*Xylaria* sp.1	DTW10	*Aspergillus* sp.
DTD11	*Nodulisporium* sp.	DTW11	*Aspergillus* sp.
DTD12	*Xylaria* sp.1	DTW12	*Phomopsis* sp.1
DTD13	*Phomopsis* sp.1	DTW13	*Nodulisporium* sp.
DTD14	*Nodulisporium* sp.	DTW14	*Nodulisporium* sp.
DTD15	*Nodulisporium* sp.	DTW15	*Nodulisporium* sp.
DTD16	*Nodulisporium* sp.	DTW16	*Nodulisporium* sp.
DTD17	*Nodulisporium* sp.	DTW17	*Nodulisporium* sp.
		DTW18	*Nodulisporium* sp.
		DTW19	*Nodulisporium* sp.
		DTW20	*Xylaria* sp.1
		DTW21	*Xylaria* sp.1
		DTW22	Mycelia sterilia 3
		DTW23	Mycelia sterilia 3

ตารางที่ 4.3 จำนวนราเอนโดไฟต์ที่แยกจากใบยางพลวง (*Dipterocarpus tuberculatus* Roxb.) เปรียบเทียบระหว่างฤดูแล้งและฤดูฝน

ฤดูแล้ง			ฤดูฝน		
ราเอนโดไฟต์	จำนวนไอโซเลต	เปอร์เซ็นต์ (%)	ราเอนโดไฟต์	จำนวนไอโซเลต	เปอร์เซ็นต์ (%)
Pestalotiopsis sp.	2	11.76	*Pestalotiopsis* sp.	4	17.39
Xylaria sp.1	3	17.64	*Xylaria* sp.1	2	8.69
Nodulisporium sp.	10	58.82	*Nodulisporium* sp.	7	30.43
Phomopsis sp. 1	2	11.76	*Phomopsis* sp. 1	6	26.08
			Aspergillus sp.	2	8.69
			Mycelia sterilia 3	2	8.69
รวม	17	100	รวม	23	100



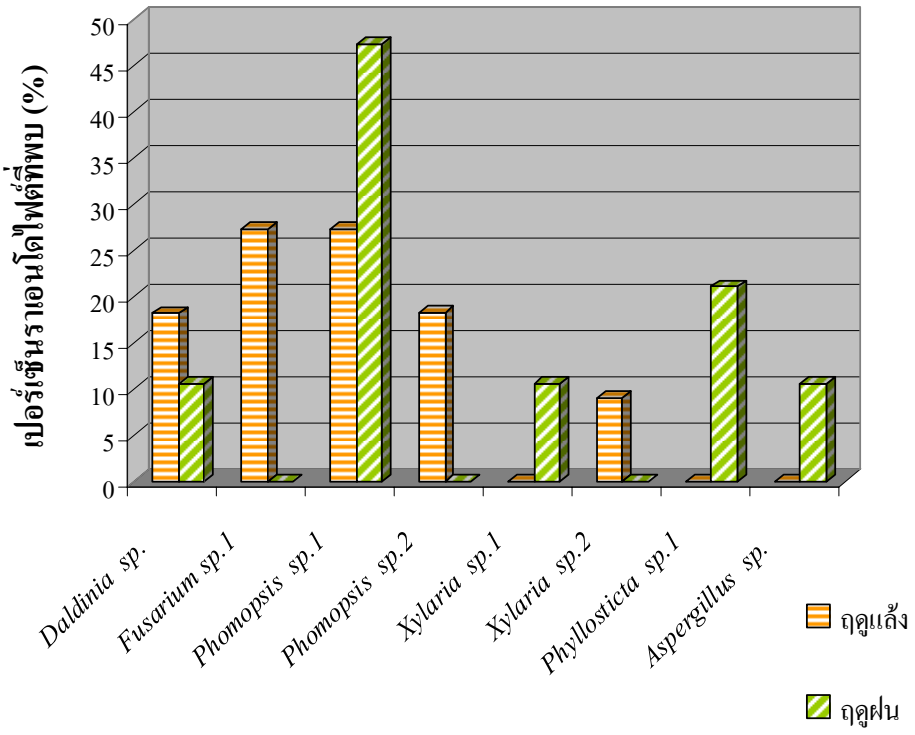
รูปที่ 4.3 เปอร์เซ็นต์ราเอนโดไฟต์ที่แยกจากใบยางพลวงเปรียบเทียบระหว่างฤดูแล้งและฤดูฝน

ตารางที่ 4.4 ราเอนโดไฟต์ที่แยกจากใบส้านหิ่ง (*Dillenia parviflora* Griff.)

ฤดูแล้ง		ฤดูฝน	
รหัส	ราเอนโดไฟต์	รหัส	ราเอนโดไฟต์
DPD 1	*Daldinia* sp.	DPW 1	*Phomopsis* sp.1
DPD 2	*Fusarium* sp.1	DPW 2	*Phomopsis* sp.1
DPD 3	*Fusarium* sp.1	DPW 3	*Daldinia* sp.
DPD 4	*Fusarium* sp.1	DPW 4	*Phomopsis* sp.1
DPD 5	*Phomopsis* sp.1	DPW 5	*Phomopsis* sp.1
DPD 6	*Daldinia* sp.	DPW 6	*Phomopsis* sp.1
DPD 7	*Phomopsis* sp.2	DPW 7	*Phyllosticta* sp.1
DPD 8	*Phomopsis* sp.2	DPW 8	*Xylaria* sp.1
DPD 9	*Phomopsis* sp.1	DPW 9	*Phyllosticta* sp.1
DPD10	*Xylaria* sp.2	DPW10	*Daldinia* sp.
DPD11	*Phomopsis* sp.1	DPW11	*Phomopsis* sp.1
		DPW12	*Phyllosticta* sp.1
		DPW13	*Phyllosticta* sp.1
		DPW14	*Phomopsis* sp.1
		DPW15	*Phomopsis* sp.1
		DPW16	*Phomopsis* sp.1
		DPW17	*Aspergillus* sp.
		DPW18	*Aspergillus* sp.
		DPW19	*Xylaria* sp.1

ตารางที่ 4.5 จำนวนราเอนโดไฟต์ที่แยกจากใบส้านหิ่ง (*Dillenia parviflora* Griff.) เปรียบเทียบระหว่างฤดูแล้งและฤดูฝน

ฤดูแล้ง			ฤดูฝน		
ราเอนโดไฟต์	จำนวนไอโซเลต	เปอร์เซ็นต์ (%)	ราเอนโดไฟต์	จำนวนไอโซเลต	เปอร์เซ็นต์ (%)
Daldinia sp.	2	18.18	*Daldinia* sp.	2	10.52
Fusarium sp.1	3	27.27	*Phomopsis* sp. 1	9	47.36
Phomopsis sp. 1	3	27.27	*Phyllosticta* sp.1	4	21.05
Phomopsis sp. 2	2	18.21	*Aspergillus* sp.	2	10.52
Xylaria sp.2	1	9.09	*Xylaria* sp.1	2	10.52
รวม	11	100	รวม	19	100



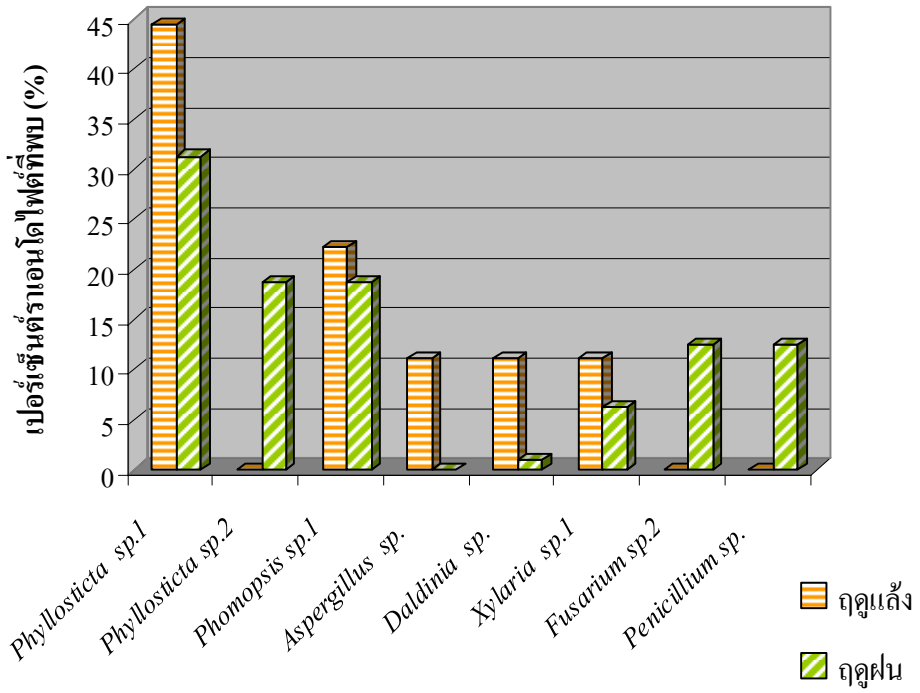
รูปที่ 4.4 จำนวนราเอนโดไฟต์ที่แยกจากใบส้านหิ่ง เปรียบเทียบระหว่างฤดูแล้งและฤดูฝน

ตารางที่ 4.6 ราเอนโดไฟต์ที่แยกจากใบรัง (*Shorea siamensis* Miq.)

ฤดูแล้ง		ฤดูฝน	
รหัส	ราเอนโดไฟต์	รหัส	ราเอนโดไฟต์
SSD 1	*Phyllosticta* sp.1	SSW 1	*Fusarium* sp.2
SSD 2	*Phomopsis* sp.1	SSW 2	*Fusarium* sp.2
SSD 3	*Phomopsis* sp.1	SSW 3	*Phomopsis* sp.1
SSD 4	*Phyllosticta* sp.1	SSW 4	*Phomopsis* sp.1
SSD 5	*Aspergillus* sp.	SSW 5	*Phyllosticta* sp.1
SSD 6	*Phyllosticta* sp.1	SSW 6	*Phyllosticta* sp.1
SSD 7	*Daldinia* sp.	SSW 7	*Phyllosticta* sp.1
SSD 8	*Phyllosticta* sp.1	SSW 8	*Xylaria* sp.1
SSD 9	*Phyllosticta* sp.1	SSW 9	*Phyllosticta* sp.1
SSD10	*Phomopsis* sp.1	SSW10	*Penicillium* sp.
SSD11	*Phomopsis* sp.1	SSW11	*Penicillium* sp.
SSD12	*Daldinia* sp.	SSW12	*Phyllosticta* sp.2
SSD13	*Aspergillus* sp.	SSW13	*Phyllosticta* sp.2
SSD14	*Phyllosticta* sp.1	SSW14	*Phyllosticta* sp.2
SSD15	*Phyllosticta* sp.1	SSW15	*Phyllosticta* sp.1
SSD16	*Phyllosticta* sp.1	SSW16	*Phomopsis* sp.1
SSD17	*Xylaria* sp.1		
SSD18	*Xylaria* sp.1		

ตารางที่ 4.7 จำนวนราเอนโดไฟต์ที่แยกจากใบรัง (*Shorea siamensis* Miq.) เปรียบเทียบ ระหว่างฤดูแล้งและฤดูฝน

ฤดูแล้ง			ฤดูฝน		
ราเอนโดไฟต์	จำนวนไอโซเลต	เปอร์เซ็นต์ (%)	ราเอนโดไฟต์	จำนวนไอโซเลต	เปอร์เซ็นต์ (%)
Phyllosticta sp.1	8	44.44	*Phyllosticta* sp.1	5	31.25
Phomopsis sp. 1	4	22.22	*Phyllosticta* sp.2	3	18.75
Aspergillus sp.	2	11.11	*Phomopsis* sp. 1	3	18.75
Daldinia sp.	2	11.11	*Fusarium* sp.2	2	12.50
Xylaria sp.1	2	11.11	*Penicillium* sp.	2	12.50
			Xylaria sp.1	1	6.25
รวม	18	100	รวม	16	100



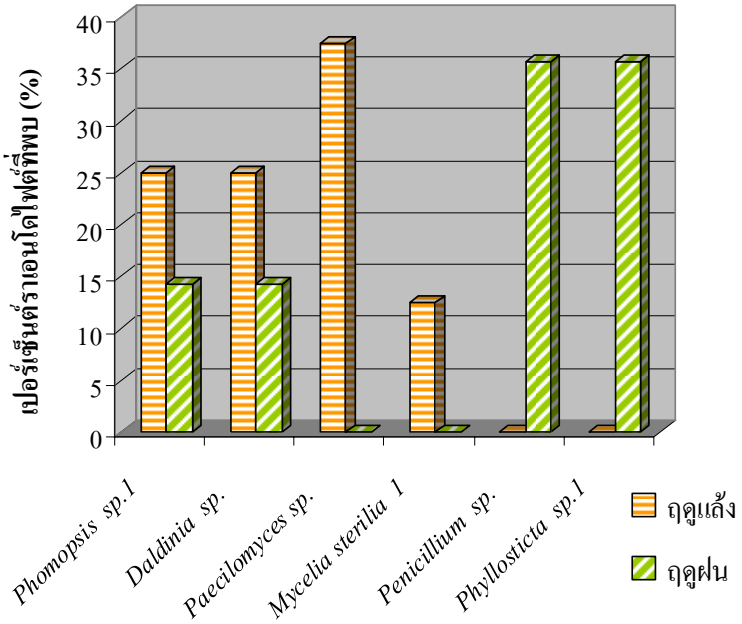
รูปที่ 4.5 เปอร์เซ็นต์ราเอนโดไฟต์ที่แยกจากใบรังเปรียบเทียบระหว่างฤดูแล้งและฤดูฝน2 ฤดู

ตารางที่ 4.8 ราเอนโดไฟต์ที่แยกจากใบชะมวง (*Garcinia nigrolineata* Planch.)

ฤดูแล้ง		ฤดูฝน	
รหัส	ราเอนโดไฟต์	รหัส	ราเอนโดไฟต์
GND 1	*Phomopsis* sp.1	GNW 1	*Penicillium* sp.
GND 2	*Phomopsis* sp.1	GNW 2	*Penicillium* sp.
GND 3	*Daldinia* sp.	GNW 3	*Penicillium* sp.
GND 4	*Paecilomyces* sp.	GNW 4	*Penicillium* sp.
GND 5	*Paecilomyces* sp.	GNW 5	*Phyllosticta* sp.1
GND 6	*Daldinia* sp.	GNW 6	*Phyllosticta* sp.1
GND 7	*Paecilomyces* sp.	GNW 7	*Daldinia* sp.
GND 8	Mycelia sterilia 1	GNW 8	*Phyllosticta* sp.1
		GNW 9	*Phyllosticta* sp.1
		GNW10	*Phomopsis* sp.1
		GNW11	*Phyllosticta* sp.1
		GNW12	*Phomopsis* sp.1
		GNW13	*Daldinia* sp.
		GNW14	*Penicillium* sp.

ตารางที่ 4.9 จำนวนราเอนโดไฟต์ที่แยกจากใบชะมวง (*Garcinia nigrolineata* Planch.) เปรียบเทียบระหว่างฤดูแล้งและฤดูฝน

ฤดูแล้ง			ฤดูฝน		
ราเอนโดไฟต์	จำนวนไอโซเลต	เปอร์เซ็นต์ (%)	ราเอนโดไฟต์	จำนวนไอโซเลต	เปอร์เซ็นต์ (%)
Phomopsis sp. 1	2	25.00	*Phomopsis* sp.1	2	14.25
Paecilomyces sp.	3	37.50	*Daldinia* sp.	2	14.25
Daldinia sp.	2	25.00	*Phyllosticta* sp.1	5	35.70
Mycelia sterilia 1	1	12.50	*Penicillium* sp.	5	35.70
รวม	8	100	รวม	14	100



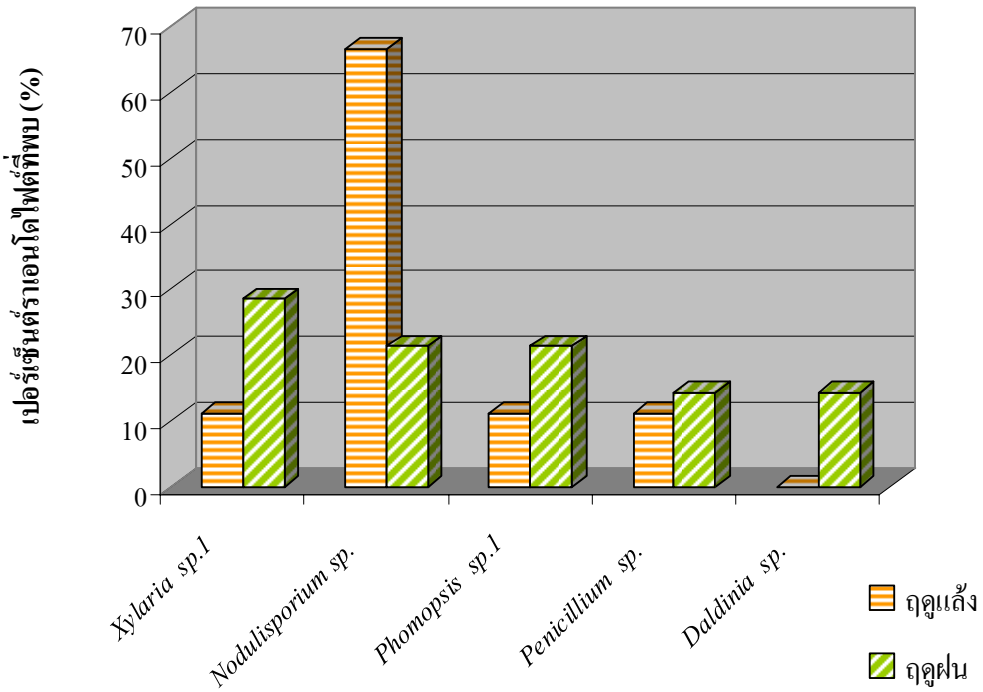
รูปที่ 4.6 เปอร์เซ็นต์ราเอนโดไฟต์ที่แยกจากใบชะมวงเปรียบเทียบระหว่างฤดูแล้งและฤดูฝน

ตารางที่ 4.10 ราเอนโดไฟต์ที่แยกจากใบเต็ง (*Shorea obtusa* Wall.)

ฤดูแล้ง		ฤดูฝน	
รหัส	ราเอนโดไฟต์	รหัส	ราเอนโดไฟต์
SOD 1	*Nodulisporium* sp.	SOW 1	*Phomopsis* sp.1
SOD 2	*Xylaria* sp.1	SOW 2	*Phomopsis* sp.1
SOD 3	*Nodulisporium* sp.	SOW 3	*Penicillium* sp.
SOD 4	*Phomopsis* sp.1	SOW 4	*Nodulisporium* sp.
SOD 5	*Penicillium* sp.	SOW 5	*Nodulisporium* sp.
SOD 6	*Nodulisporium* sp.	SOW 6	*Nodulisporium* sp.
SOD 7	*Nodulisporium* sp.	SOW 7	*Xylaria* sp.1
SOD 8	*Nodulisporium* sp.	SOW 8	*Xylaria* sp.1
SOD 9	*Nodulisporium* sp.	SOW 9	*Xylaria* sp.1
		SOW10	*Daldinia* sp.
		SOW11	*Penicillium* sp.
		SOW12	*Phomopsis* sp.1
		SOW13	*Xylaria* sp.1
		SOW14	*Daldinia* sp.

ตารางที่ 4.11 จำนวนราเอนโดไต์ที่แยกจากใบเต็ง (*Shorea obtusa* Wall.) เปรียบเทียบระหว่างฤดูแล้งและฤดูฝน

ฤดูแล้ง			ฤดูฝน		
ราเอนโดไฟต์	จำนวนไอโซเลต	เปอร์เซ็นต์ (%)	ราเอนโดไฟต์	จำนวนไอโซเลต	เปอร์เซ็นต์ (%)
Nodulisporium sp.	6	66.66	*Nodulisporium* sp.	3	21.42
Xylaria sp.1	1	11.11	*Xylaria* sp.1	4	28.57
Phomopsis sp.1	1	11.11	*Phomopsis* sp.1	3	21.42
Penicillium sp.	1	11.11	*Penicillium* sp.	2	14.28
			Daldinia sp.	2	14.28
รวม	9	100	รวม	14	100



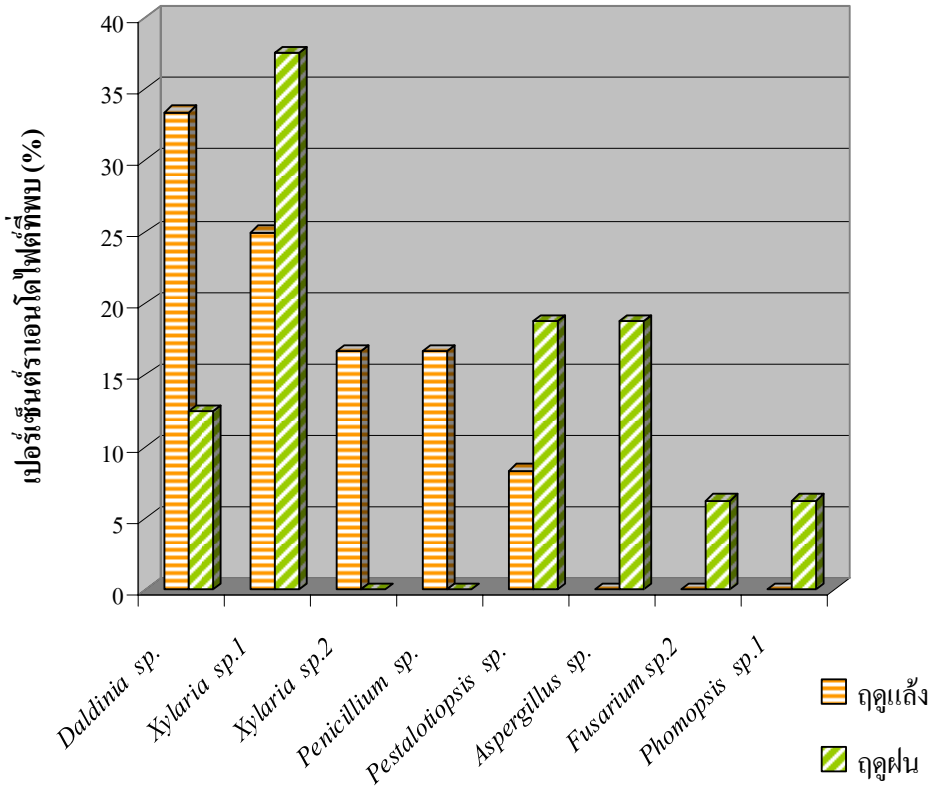
รูปที่ 4.7 เปอร์เซ็นต์ราเอนโดไฟต์ที่แยกจากใบเต็งเปรียบเทียบระหว่างฤดูแล้งและฤดูฝน

ตารางที่ 4.12 ราเอนโดไฟต์ที่แยกจากใบไผ่ (*Bambusa arundinacea* Willd.)

ฤดูแล้ง		ฤดูฝน	
รหัส	ราเอนโดไฟต์	รหัส	ราเอนโดไฟต์
BAD 1	*Daldinia* sp.	BAW 1	*Xylaria* sp.1
BAD 2	*Xylaria* sp.1	BAW 2	*Aspergillus* sp.
BAD 3	*Penicillium* sp.	BAW 3	*Aspergillus* sp.
BAD 4	*Penicillium* sp.	BAW 4	*Xylaria* sp.1
BAD 5	*Daldinia* sp.	BAW 5	*Xylaria* sp.1
BAD 6	*Daldinia* sp.	BAW 6	*Pestalotiopsis* sp.
BAD 7	*Daldinia* sp.	BAW 7	*Pestalotiopsis* sp.
BAD 8	*Xylaria* sp.2	BAW 8	*Pestalotiopsis* sp.
BAD 9	*Xylaria* sp.2	BAW 9	*Aspergillus* sp.
BAD10	*Pestalotiopsis* sp.	BAW10	*Fusarium* sp.2
BAD11	*Xylaria* sp.1	BAW11	*Daldinia* sp.
BAD12	*Xylaria* sp.1	BAW12	*Daldinia* sp.
		BAW13	*Xylaria* sp.1
		BAW14	*Xylaria* sp.1
		BAW15	*Xylaria* sp.1
		BAW16	*Phomopsis* sp.1

ตารางที่ 4.13 จำนวนราเอนโดไฟต์ที่แยกจากใบไผ่ (*Bambusa arundinacea* Willd.)เปรียบเทียบระหว่างฤดูแล้งและฤดูฝน

ฤดูแล้ง			ฤดูฝน		
ราเอนโดไฟต์	จำนวนไอโซเลต	เปอร์เซ็นต์ (%)	ราเอนโดไฟต์	จำนวนไอโซเลต	เปอร์เซ็นต์ (%)
Daldinia sp.	4	33.33	*Daldinia* sp.	2	12.50
Xylaria sp.1	3	25.00	*Xylaria* sp.1	6	37.50
Xylaria sp.2	2	16.66	*Aspergillus* sp.	3	18.75
Penicillium sp.	2	16.66	*Pestalotiopsis* sp.	3	18.75
Pestalotiopsis sp.	1	8.33	*Phomopsis* sp.1	1	6.25
			Fusarium sp.2	1	6.25
รวม	12	100	รวม	16	100



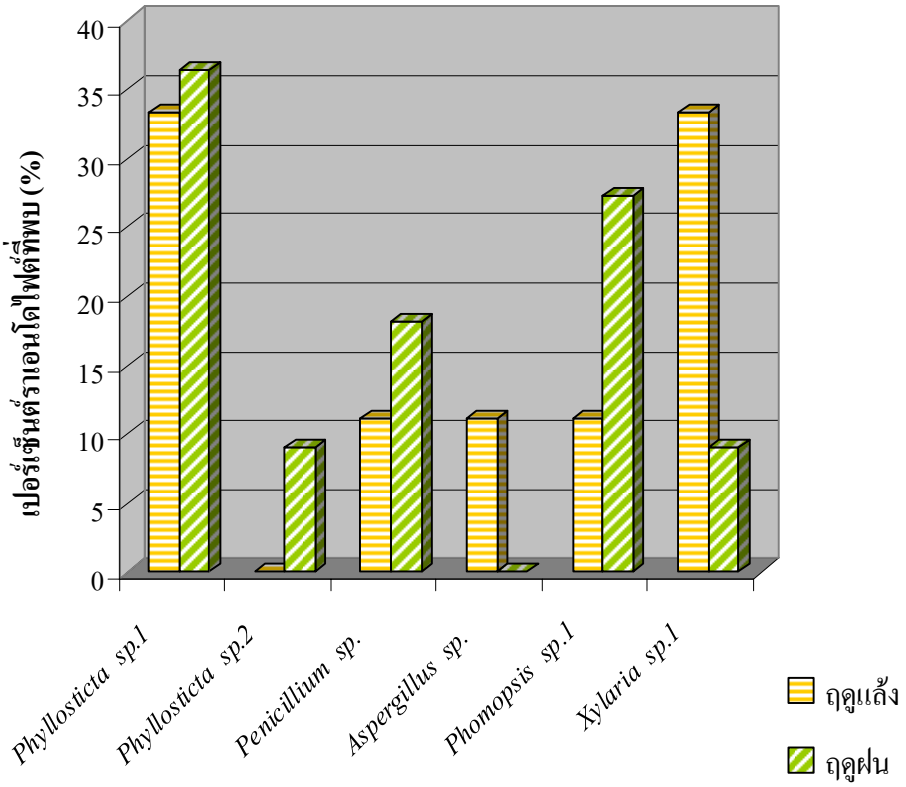
รูปที่ 4.8 เปอร์เซ็นต์ราเอนโดไฟต์ที่แยกจากใบไผ่เปรียบเทียบระหว่างฤดูแล้งและฤดูฝน

ตารางที่ 4.14 ราเอนโดไฟต์ที่แยกจากใบโมกเครือ (*Aganosma marginata* G. Don)

ฤดูแล้ง		ฤดูฝน	
รหัส	ราเอนโดไฟต์	รหัส	ราเอนโดไฟต์
AMD 1	*Phyllosticta* sp.1	AMW 1	*Phyllosticta* sp.1
AMD 2	*Penicillium* sp.	AMW 2	*Phyllosticta* sp.1
AMD 3	*Phomopsis* sp.1	AMW 3	*Phyllosticta* sp.1
AMD 4	*Phyllosticta* sp.1	AMW 4	*Penicillium* sp.
AMD 5	*Xylaria* sp.1	AMW 5	*Penicillium* sp.
AMD 6	*Xylaria* sp.1	AMW 6	*Phyllosticta* sp.1
AMD 7	*Xylaria* sp.1	AMW 7	*Xylaria* sp.1
AMD 8	*Aspergillus* sp.	AMW 8	*Phomopsis* sp.1
AMD 9	*Phyllosticta* sp.1	AMW 9	*Phomopsis* sp.1
		AMW10	*Phomopsis* sp.1
		AMW11	*Phyllosticta* sp.2

ตารางที่ 4.15 จำนวนราเอนโดไฟต์ที่แยกจากใบโมกเครือ (*Aganosma marginata* G. Don) เปรียบเทียบระหว่างฤดูแล้งและฤดูฝน

ฤดูแล้ง			ฤดูฝน		
ราเอนโดไฟต์	จำนวนไอโซเลต	เปอร์เซ็นต์ (%)	ราเอนโดไฟต์	จำนวนไอโซเลต	เปอร์เซ็นต์ (%)
Phyllosticta sp.1	3	33.33	*Phyllosticta* sp.1	4	36.36
Penicillium sp.	1	11.11	*Phyllosticta* sp.2	1	9.09
Xylaria sp.1	3	33.33	*Penicillium* sp.	2	18.18
Aspergillus sp.	1	11.11	*Xylaria* sp.1	1	9.09
Phomopsis sp.1	1	11.11	*Phomopsis* sp.1.	3	27.27
รวม	9	100	รวม	11	100



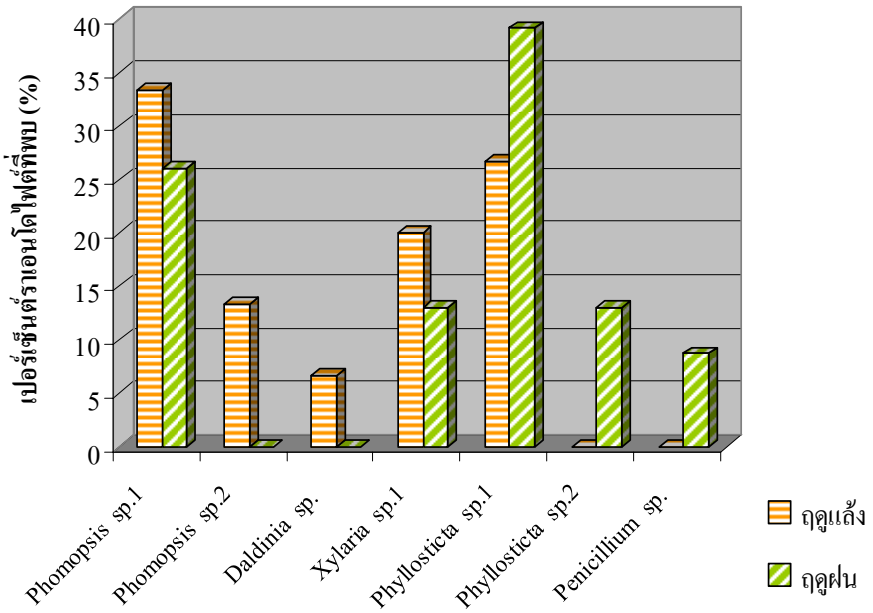
รูปที่ 4.9 เปอร์เซ็นต์ราเอนโดไฟต์ที่แยกจากใบโมกเครือเปรียบเทียบระหว่างฤดูแล้งและฤดูฝน

ตารางที่ 4.16 ราเอนโดไฟต์ที่แยกใบส้านใบเล็ก (*Dillenia ovata* Wall. ex Hook. f. & Th.)

ฤดูแล้ง		ฤดูฝน	
รหัส	ราเอนโดไฟต์	รหัส	ราเอนโดไฟต์
DID 1	*Phomopsis* sp.1	DIW 1	*Phyllosticta* sp.1
DID 2	*Daldinia* sp.	DIW 2	*Phyllosticta* sp.1
DID 3	*Phomopsis* sp.1	DIW 3	*Phyllosticta* sp.1
DID 4	*Phyllosticta* sp.1	DIW 4	*Penicillium* sp.
DID 5	*Phomopsis* sp.1	DIW 5	*Penicillium* sp.
DID 6	*Phomopsis* sp.1	DIW 6	*Xylaria* sp.1
DID 7	*Xylaria* sp.1	DIW 7	*Phomopsis* sp.1
DID 8	*Phyllosticta* sp.1	DIW 8	*Phomopsis* sp.1
DID 9	*Phomopsis* sp.1	DIW 9	*Phyllosticta* sp.1
DID10	*Phyllosticta* sp.1	DIW10	*Phyllosticta* sp.2
DID11	*Phomopsis* sp.2	DIW11	*Xylaria* sp.1
DID12	*Phomopsis* sp.2	DIW12	*Phomopsis* sp.1
DID13	*Phyllosticta* sp.1	DIW13	*Phomopsis* sp.1
DID14	*Xylaria* sp.1	DIW14	*Phyllosticta* sp.2
DID15	*Xylaria* sp.1	DIW15	*Phyllosticta* sp.2
		DIW16	*Phyllosticta* sp.1
		DIW17	*Phomopsis* sp.1
		DIW18	*Phomopsis* sp.1
		DIW19	*Xylaria* sp.1
		DIW20	*Phyllosticta* sp.1
		DIW21	*Phyllosticta* sp.1
		DIW22	*Phyllosticta* sp.1
		DIW23	*Phyllosticta* sp.1

ตารางที่ 4.17 จำนวนราเอนโดไฟต์ที่แยกจากใบส้านใบเล็ก(*Dillenia ovata* Wall.ex Hook. f.& Th.) เปรียบเทียบระหว่างฤดูแล้งและฤดูฝน

ฤดูแล้ง			ฤดูฝน		
ราเอนโดไฟต์	จำนวนไอโซเลต	เปอร์เซ็นต์ (%)	ราเอนโดไฟต์	จำนวนไอโซเลต	เปอร์เซ็นต์ (%)
Phyllosticta sp.1	4	26.66	*Phyllosticta* sp.1	9	39.13
Phomopsis sp.1	5	33.33	*Phyllosticta* sp.2	3	13.04
Phomopsis sp.2	2	13.33	*Phomopsis* sp.1	6	26.08
Daldinia sp.	1	6.66	*Xylaria* sp.1	3	13.04
Xylaria sp.1	3	20.00	*Penicillium* sp.	2	8.69
รวม	15	100	รวม	23	100



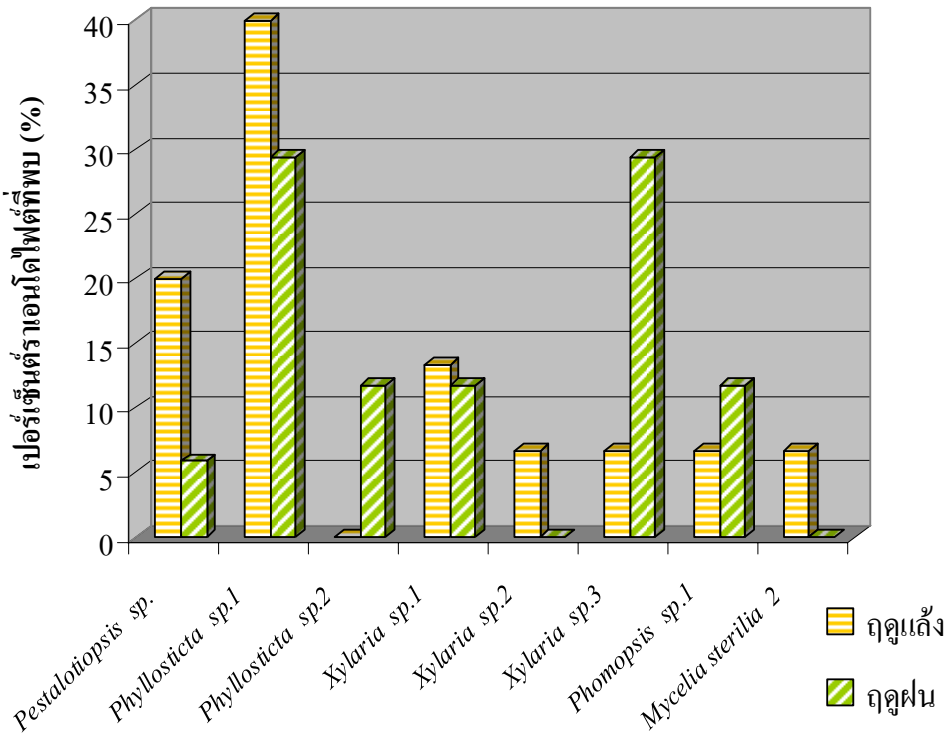
รูปที่ 4.10 เปอร์เซ็นต์ราเอนโดไฟต์ที่แยกจากใบส้านใบเล็กเปรียบเทียบระหว่างฤดูแล้งและฤดูฝน

ตารางที่ 4.18 ราเอนโดไฟต์ที่แยกจากใบตะขบป่า (*Flacourtia indic* Merr)

ฤดูแล้ง		ฤดูฝน	
รหัส	ราเอนโดไฟต์	รหัส	ราเอนโดไฟต์
FID 1	Mycelia sterilia 2	FIW 1	*Pestalotiopsis* sp.
FID 2	*Xylaria* sp.3	FIW 2	*Phyllosticta* sp.1
FID 3	*Pestalotiopsis* sp.	FIW 3	*Xylaria* sp.1
FID 4	*Phomopsis* sp.1	FIW 4	*Phyllosticta* sp.1
FID 5	*Pestalotiopsis* sp.	FIW 5	*Phyllosticta* sp.1
FID 6	*Phyllosticta* sp.1	FIW 6	*Xylaria* sp.1
FID 7	*Xylaria* sp.1	FIW 7	*Phomopsis* sp.1
FID 8	*Phyllosticta* sp.1	FIW 8	*Phomopsis* sp.1
FID 9	*Pestalotiopsis* sp.	FIW 9	*Phyllosticta* sp.1
FID10	*Phyllosticta* sp.1	FIW10	*Phyllosticta* sp.1
FID11	*Phyllosticta* sp.1	FIW11	*Phyllosticta* sp.2
FID12	*Phyllosticta* sp.1	FIW12	*Phyllosticta* sp.2
FID13	*Xylaria* sp.1	FIW13	*Xylaria* sp.3
FID14	*Phyllosticta* sp.1	FIW14	*Xylaria* sp.3
FID15	*Xylaria* sp.2	FIW15	*Xylaria* sp.3
		FIW16	*Xylaria* sp.3
		FIW17	*Xylaria* sp.3

ตารางที่ 4.19 จำนวนราเอนโดไฟต์ที่แยกจากใบตะขบป่า (*Flacourtia indic* Merr) เปรียบเทียบระหว่างฤดูแล้งและฤดูฝน

ฤดูแล้ง			ฤดูฝน		
ราเอนโดไฟต์	จำนวนไอโซเลต	เปอร์เซ็นต์ (%)	ราเอนโดไฟต์	จำนวนไอโซเลต	เปอร์เซ็นต์ (%)
Phyllosticta sp.1	6	40.00	*Phyllosticta* sp.1	5	29.41
Phomopsis sp.1	1	6.66	*Phyllosticta* sp.2	2	11.76
Xylaria sp.1	2	13.33	*Xylaria* sp.1	2	11.76
Xylaria sp.2	1	6.66	*Xylaria* sp.3	5	29.41
Xylaria sp.3	1	6.66	*Phomopsis* sp.1	2	11.76
Pestalotiopsis sp.	3	20.00	*Pestalotiopsis* sp.	1	5.88
Mycelia sterilia 2	1	6.66			
รวม	15	100	รวม	17	100



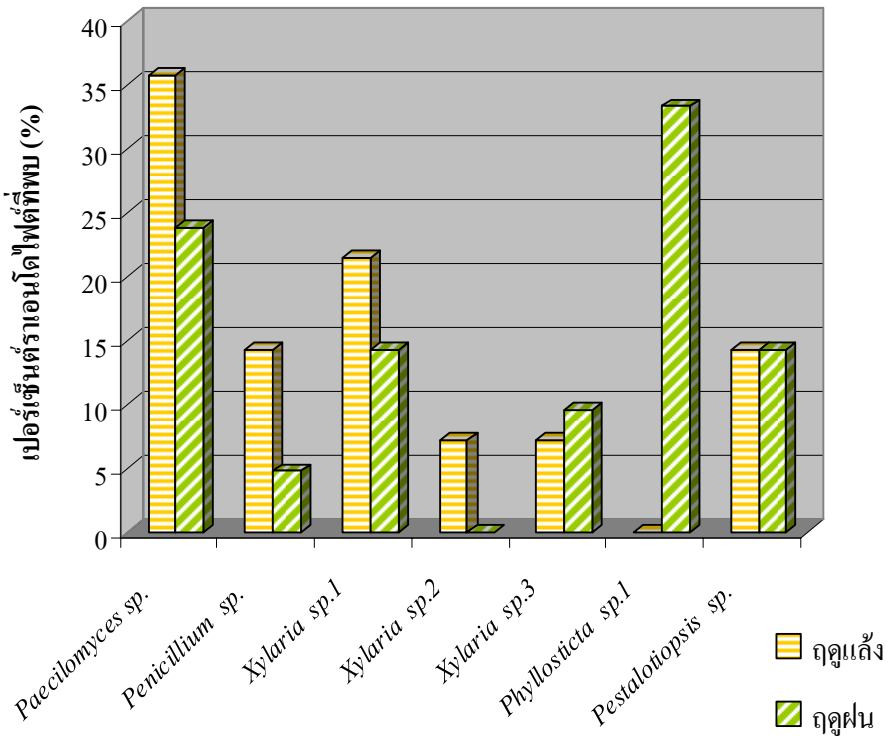
รูปที่ 4.11 เปอร์เซ็นต์ราเอนโดไฟต์ที่แยกจากใบตะขบป่าเปรียบเทียบระหว่างฤดูแล้งและฤดูฝน

ตารางที่ 4.20 ราเอนโดไฟต์ที่แยกจากใบชิงชัน (*Dalbergia oliveri* Gamble.)

ฤดูแล้ง		ฤดูฝน	
รหัส	ราเอนโดไฟต์	รหัส	ราเอนโดไฟต์
DOD 1	*Paecilomyces* sp.	DOW 1	*Xylaria* sp.1
DOD 2	*Penicillium* sp.	DOW 2	*Pestalotiopsis* sp.
DOD 3	*Penicillium* sp.	DOW 3	*Pestalotiopsis* sp.
DOD 4	*Paecilomyces* sp.	DOW 4	*Penicillium* sp.
DOD 5	*Xylaria* sp.1	DOW 5	*Paecilomyces* sp.
DOD 6	*Paecilomyces* sp.	DOW 6	*Paecilomyces* sp.
DOD 7	*Pestalotiopsis* sp.	DOW 7	*Phyllosticta* sp.1
DOD 8	*Xylaria* sp.1	DOW 8	*Pestalotiopsis* sp.
DOD 9	*Pestalotiopsis* sp.	DOW 9	*Xylaria* sp.1
DOD10	*Xylaria* sp.2	DOW10	*Xylaria* sp.1
DOD11	*Xylaria* sp.3	DOW11	*Xylaria* sp.3
DOD12	*Paecilomyces* sp.	DOW12	*Paecilomyces* sp.
DOD13	*Paecilomyces* sp.	DOW13	*Phyllosticta* sp.1
DOD14	*Xylaria* sp.1	DOW14	*Pestalotiopsis* sp.
		DOW15	*Pestalotiopsis* sp.
		DOW16	*Phyllosticta* sp.1
		DOW17	*Paecilomyces* sp.
		DOW18	*Xylaria* sp.3
		DOW19	*Paecilomyces* sp.
		DOW20	*Phyllosticta* sp.1
		DOW21	*Phyllosticta* sp.1

ตารางที่ 4.21 จำนวนราเอนโดไฟต์ที่แยกจากใบชิงชัน (*Dalbergia oliveri* Gamble.) เปรียบเทียบระหว่างฤดูแล้งและฤดูฝน

ฤดูแล้ง			ฤดูฝน		
ราเอนโดไฟต์	จำนวนไอโซเลต	เปอร์เซ็นต์ (%)	ราเอนโดไฟต์	จำนวนไอโซเลต	เปอร์เซ็นต์ (%)
Paecilomyces sp.	5	35.71	*Paecilomyces* sp.	5	23.80
Xylaria sp.1	3	21.42	*Xylaria* sp.1	3	14.28
Xylaria sp.2	1	7.14	*Xylaria* sp.3	2	9.52
Xylaria sp.3	1	7.14	*Pestalotiopsis* sp.	3	14.28
Pestalotiopsis sp.	2	14.28	*Phyllosticta* sp.1	7	33.33
Penicillium sp.	2	14.28	*Penicillium* sp.	1	4.76
รวม	14	100	รวม	21	100



รูปที่ 4.12 เปอร์เซ็นต์ราเอนโดไฟต์ที่แยกจากใบชิงชันเปรียบเทียบระหว่างฤดูแล้งและฤดูฝน

4.3 การศึกษาความหลากหลายของราเอนโดไฟต์ที่แยกจากพืชในป่าเต็งรัง ทั้ง 10 ชนิด

ศึกษาความหลากหลายของราเอนโดไฟต์โดยวิเคราะห์ความถี่ของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากตัวอย่างพืชแต่ละชนิด (Colonization Frequency) โดยคำนวณจากสูตรดังนี้ (Khan และคณะ, 2007)

% Colonization Frequency = (Ncol / Nt) × 100

เมื่อ Ncol = จำนวนราที่แยกได้จากใบพืช

Nt = จำนวนชิ้นใบทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษา

จากตารางที่ 4.23 แสดงเปอร์เซ็นต์ Colonization Frequency (CF%) ซึ่งได้จากการคำนวณตามสูตรข้างต้น พบว่าในฤดูแล้ง ต้นรัง (*Shorea siamensis* Miq.) มีค่า CF% สูงที่สุด ที่ 90% และในฤดูฝน ยางพลวง (*Dipterocarpus tuberculatus* Roxb.) และส้านใบเล็ก (*Dillenia ovata* Wall.ex Hook. f.& Th.) มีค่า CF% สูงที่สุด ที่ 115% สำหรับการสำรวจทั้ง 2 ฤดูพบราเอนโดไฟต์ที่มีจำนวนสูงสุด ได้แก่ *Phyllosticta* sp.1 60 ไอโซเลต , *Phomopsis* sp.1 54 ไอโซเลต และ *Xylaria* sp.1 44 ไอโซเลต

ราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากใบพืชแต่ละชนิด จากการสำรวจทั้ง 2 ฤดูสามารถจัดจำแนกเป็นกลุ่มใหญ่ๆได้ดังนี้ (ตารางที่ 4.24)

1. Deuteromycetes กลุ่ม Coelomycetes ได้แก่ *Phyllosticta* sp.1, *Phyllosticta* sp.2, *Phomopsis* sp.1, *Phomopsis* sp.2 และ *Pestalotiopsis* sp. (รูปที่ 4.14) ราในกลุ่มนี้สร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศภายในโครงสร้างที่เรียกว่า pcnidia หรือ acervulus (วิจัย, 2546)

2. Deuteromycetes กลุ่ม Hyphomycetes ได้แก่ *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Paecilomyces* sp., *Fusarium* sp.1, *Fusarium* sp.2 และ *Nodulisporium* sp. (รูปที่ 4.15) ราในกลุ่มนี้สร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศโดยไม่มีโครงสร้างใดห่อหุ้ม

3. Ascomycetes ได้แก่ *Xylaria* sp.1, *Xylaria* sp.2, *Xylaria* sp.3 และ *Daldinia* sp. สำหรับราเอนโดไฟต์ใน กลุ่ม Ascomycetes ที่แยกได้ในงานวิจัยนี้ทุกชนิดอยู่ในกลุ่ม Xylariaceae ทั้งหมด โดยมีรายงานว่าราในกลุ่ม Xylariaceae ที่เป็นเอนโดไฟต์มีถึง 11 สกุล (Whalley, 1996) ในการศึกษาราเอนโดไฟต์ในป่าเต็งรังอำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน พบราในกลุ่ม Xylariaceae 4 ชนิด 2 สกุล (รูปที่ 4.16)

ตารางที่ 4.22 จำนวนราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากพืชแต่ละชนิดระหว่างฤดูแล้งและฤดูฝน ในปี พ.ศ.2550 ที่ อ.เวียงสา จ.น่าน

ราเอนโดไฟต์	DT		DP		SS		GN		SO		BA		AM		DI		FI		DO		รวม
	D	W	D	W	D	W	D	W	D	W	D	W	D	W	D	W	D	W	D	W	
Phyllosticta sp.1	-	-	-	4	8	5	-	5	-	-	-	-	3	4	4	9	6	5	-	7	60
Phyllosticta sp.2	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	1	-	3	-	2	-	-	9
Fusarium sp.1	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
Fusarium sp.2	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	3
Phomopsis sp.1	2	6	3	9	4	3	2	2	1	3	-	1	1	3	5	6	1	2	-	-	54
Phomopsis sp.2	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	3
Aspergillus sp.	-	2	-	2	2	-	-	-	-	-	-	3	1	-	-	-	-	-	-	-	10
Penicillium sp.	-	-	-	-	-	2	-	5	1	2	2	-	1	2	-	2	-	-	2	1	20
Pestalotiopsis sp.	2	4	-	-	-	-	-	-	-	-	1	3	-	-	-	-	3	1	2	3	19
Paecilomyces sp.	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	5	13
Daldinia sp.	-	-	2	2	2	-	2	2	-	2	4	2	-	-	1	-	-	-	-	-	19
Xylaria sp.1	3	2	-	2	2	1	-	-	1	4	3	6	3	1	3	3	2	2	3	3	44
Xylaria sp.2	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	1	-	1	-	6
Xylaria sp.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	5	1	2	9
Nodulisporium sp.	10	7	-	-	-	-	-	-	6	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	26
Mycelia Sterilia 1	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Mycelia Sterilia 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1
Mycelia Sterilia 3	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
รวม	17	23	11	19	18	16	8	14	9	14	12	16	9	11	15	23	15	17	14	21	302

ตารางที่ 4.23 colonization frequency (CF%) ของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากใบพืชแต่ละชนิดระหว่างฤดูแล้งและฤดูฝนในปี พ.ศ.2550 ที่ อ.เวียงสา จ.น่าน

ราเอนโดไฟต์	DT		DP		SS		GN		SO		BA		AM		DI		FI		DO	
	D	W	D	W	D	W	D	W	D	W	D	W	D	W	D	W	D	W	D	W
Phyllosticta sp.1	-	-	-	20	40	25	-	25	-	-	-	-	15	20	20	45	30	25	-	35
Phyllosticta sp.2	-	-	-	-	-	15	-	-	-	-	-	-	-	5	-	15	-	10	-	-
Fusarium sp.1	-	-	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fusarium sp.2	-	-	-	-	-	10	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-
Phomopsis sp.1	10	30	15	45	20	15	10	10	5	15	-	5	5	15	25	30	5	10	-	-
Phomopsis sp.2	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	-	-	-	-	-
Aspergillus sp.	-	10	-	10	10	-	-	-	-	-	-	15	5	-	-	-	-	-	-	-
Penicillium sp.	-	-	-	-	-	10	-	25	5	10	10	-	5	10	-	10	-	-	10	5
Pestalotiopsis sp.	10	20	-	-	-	-	-	-	-	-	5	15	-	-	-	-	15	5	10	15
Paecilomyces sp.	-	-	-	-	-	-	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	25	25
Daldinia sp.	-	-	10	10	10	-	10	10	-	10	20	10	-	-	5	-	-	-	-	-
Xylaria sp.1	15	10	-	10	10	5	-	-	5	20	15	30	15	5	15	15	10	10	15	15
Xylaria sp.2	-	-	10	-	-	-	-	-	-	-	10	-	-	-	-	-	5	-	5	-
Xylaria sp.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	25	5	10
Nodulisporium sp.	50	35	-	-	-	-	-	-	30	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mycelia Sterilia 1	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mycelia Sterilia 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-
Mycelia Sterilia 3	-	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CF% รวม	85	115	55	95	90	80	40	70	45	70	60	80	45	55	75	115	75	85	70	105

ตารางที่ 4.24 จำแนกกลุ่มของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้ระหว่างฤดูแล้งและฤดูฝนในปี พ.ศ.2550 ที่ อ.เวียงสา จ.น่าน

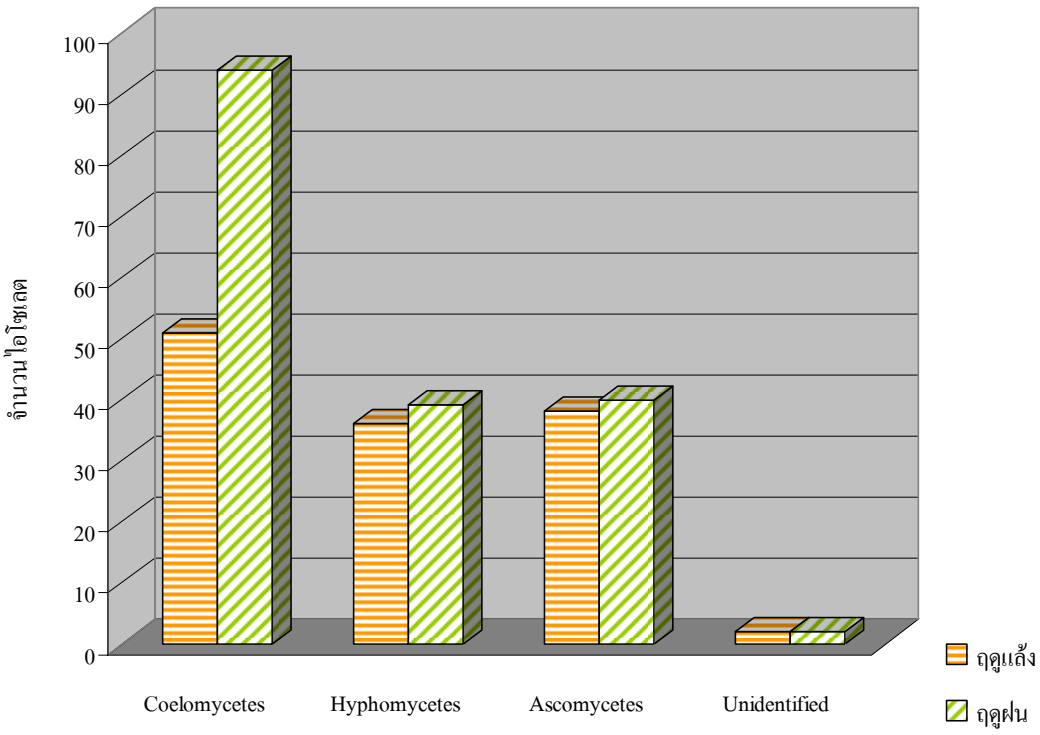
ราเอนโดไฟต์	จำนวนไอโซเลต		การจัดจำแนก
	ฤดูแล้ง	ฤดูฝน	
Phyllosticta sp.1	21	39	Coelomycetes
Phyllosticta sp.2	-	9	Coelomycetes
Phomopsis sp.1	19	35	Coelomycetes
Phomopsis sp.2	3	-	Coelomycetes
Pestalotiopsis sp.	8	11	Coelomycetes
Aspergillus sp.	3	7	Hyphomycetes
Penicillium sp.	6	14	Hyphomycetes
Paecilomyces sp.	8	5	Hyphomycetes
Fusarium sp.1	3	-	Hyphomycetes
Fusarium sp.2	-	3	Hyphomycetes
Daldinia sp.	11	8	Ascomycetes
Xylaria sp.1	19	25	Ascomycetes
Xylaria sp.2	6	-	Ascomycetes
Xylaria sp.3	2	7	Ascomycetes
Nodulisporium sp.	16	10	Hyphomycetes
Mycelia Sterilia 1	1	-	Unidentified
Mycelia Sterilia 2	1	-	Unidentified
Mycelia Sterilia 3	-	2	Unidentified
รวม	127	175	

จากการจัดจำแนกกลุ่มของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้ พบว่าราในกลุ่ม Coelomycetes สูงที่สุดทั้งฤดูแล้ง และฤดูฝน ตามมาด้วยกลุ่ม Hyphomycetes และ Ascomycetes ตามลำดับ (รูปที่ 4.13) ในฤดูฝนสามารถพบราทั้ง 3 กลุ่มเพิ่มมากขึ้นจากฤดูแล้ง ผลการวิจัยนี้สอดคล้องกับผลงานวิจัยที่สำรวจความหลากหลายของราเอนโดไฟต์บริเวณป่าเบญจพรรณ (Decidous forest) ตอนใต้ประเทศอินเดีย ซึ่งเป็นป่าโปร่งเขตร้อนคล้ายกับป่าเต็งรังในประเทศไทย ผลการสำรวจราเอนโดไฟต์พบว่า

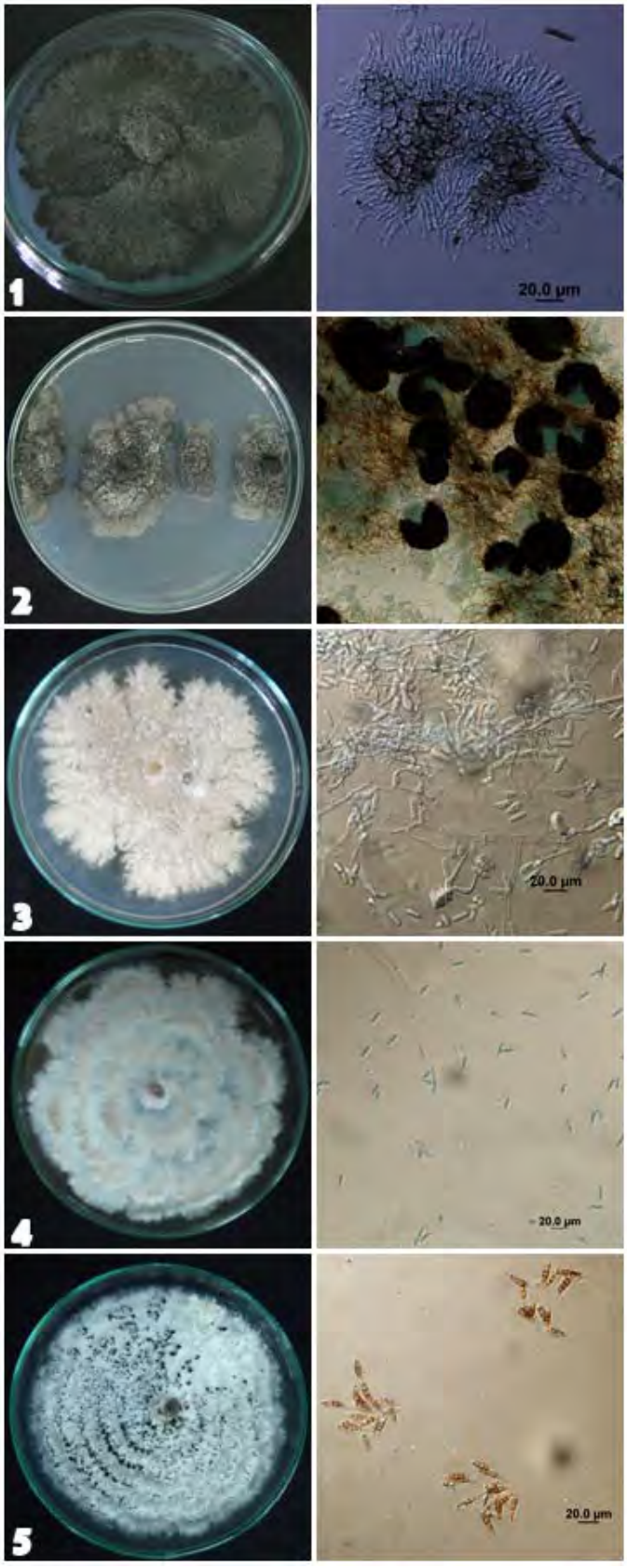
พบราในกลุ่ม Deuteromycotina สูงที่สุด โดยเฉพาะในกลุ่ม Coelomycetes ซึ่งราที่พบมากที่สุดในฤดูหนาวคือ *Phyllosticta* sp. และ *Pestalotiopsis* sp. (Mysore และคณะ, 2005) การศึกษาความหลากหลายของราเอนโดไฟต์จากพืชสมุนไพรบริเวณ จังหวัดกาญจนบุรี และนครราชสีมา ได้ราเอนโดไฟต์มากถึง 210 ไอโซเลต จัดเป็นกลุ่ม Coelomycetes 135 ไอโซเลต ตามมาด้วยกลุ่ม Hyphomycetes 25 ไอโซเลต และ Ascomycetes 20 ไอโซเลต ตามลำดับ (จิตรา, 2550) จากผลการวิจัยดังกล่าวจะเห็นได้ว่าพบราในกลุ่ม Coelomycetes มากที่สุดซึ่งสอดคล้องกับผลวิจัยนี้

จากการสำรวจครั้งนี้ไม่พบราในกลุ่ม Zygomycetes และ Basidiomycetes แต่ได้มีการรายงานว่าราในกลุ่ม Basidiomycetes เป็นราเอนโดไฟต์ เช่นกัน โดยสามารถแยก *Shizophylumn commune* (เห็ดแครง หรือเห็ดตีนตุ๊กแก) ได้จากต้นสัก และต้นจามจุรี (Chareprasert และคณะ, 2006)

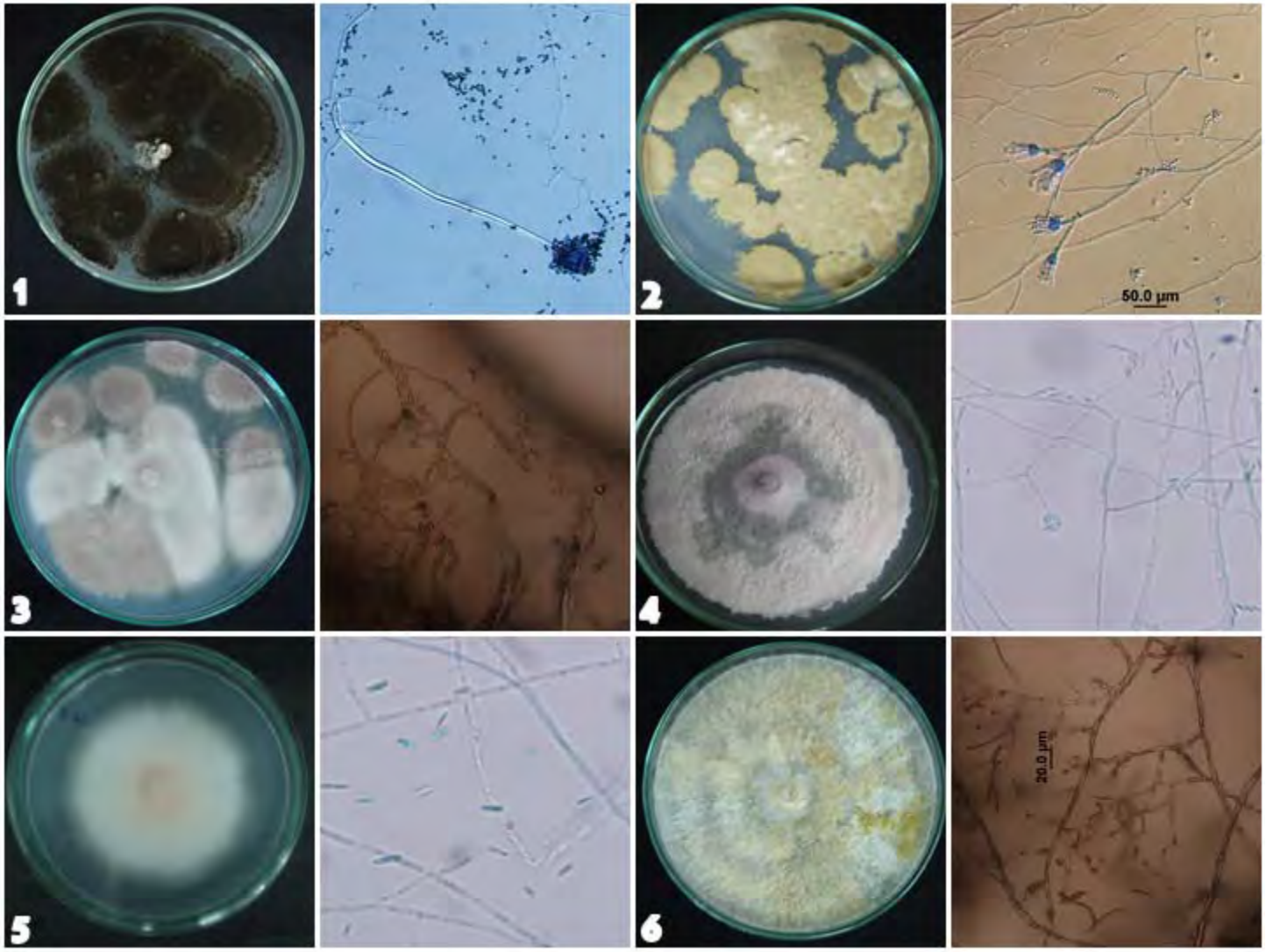
ราเอนโดไฟต์ในกลุ่ม Deuteromycotina มีจำนวนและความหลากหลายมากที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Bacon และ White, 1999 ที่พบว่าราเอนโดไฟต์ในกลุ่ม Deuteromycotina และ Ascomycotina สามารถพบได้ทั่วไปในพืชตระกูลหญ้า และไม้เนื้อแข็ง ในป่าเขตร้อน (Frohlich และ Hyde, 1999)



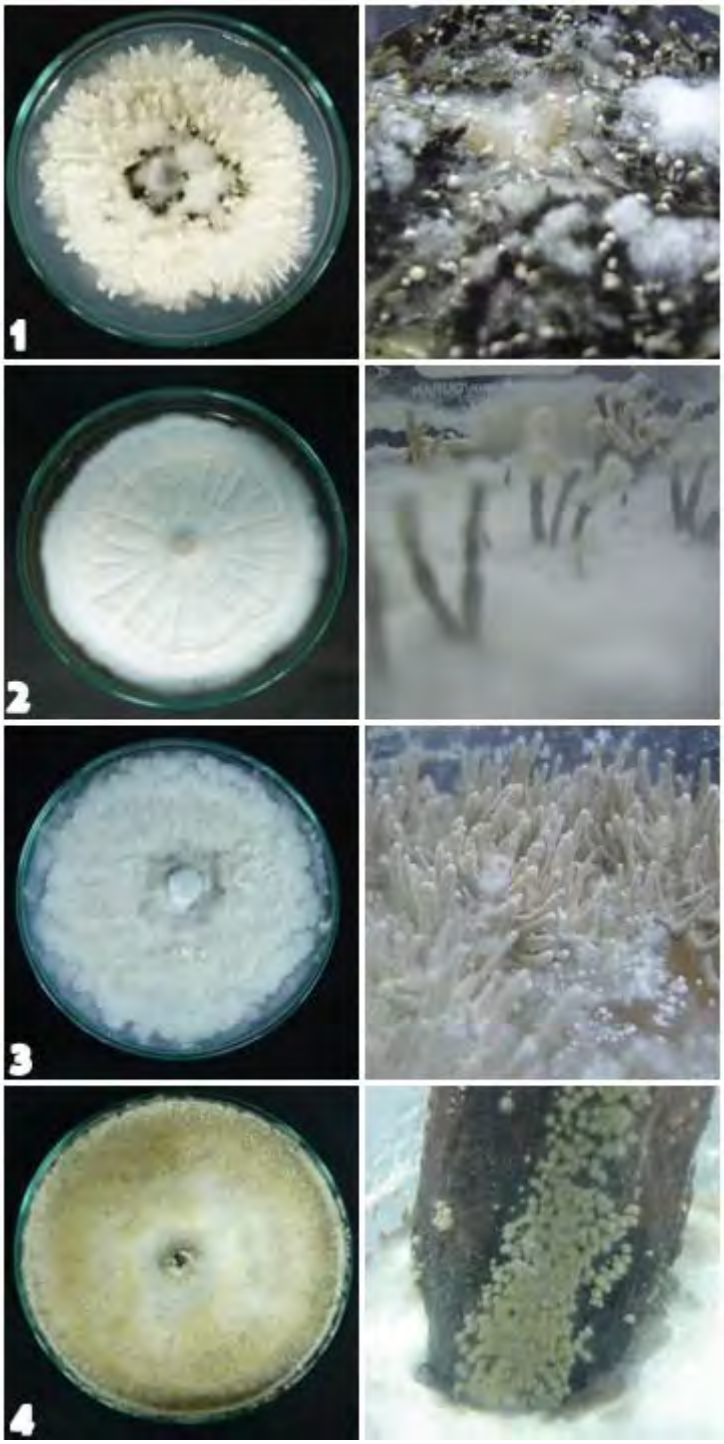
รูปที่ 4.13 จำนวนจำนวนราเอนโดไฟต์กลุ่มต่างๆเปรียบเทียบระหว่างฤดูแล้งและฤดูฝน



รูปที่ 4.14 ราเอนโดไฟต์กลุ่ม Coelomycetes ได้แก่ *Phyllosticta* sp.1 (1), *Phyllosticta* sp.2 (2), *Phomopsis* sp.1 (3), *Phomopsis* sp.2 (4)และ *Pestalotiopsis* sp. (5)



รูปที่ 4.15 ราเอนโดไฟต์ในกลุ่ม Hyphomycetes ได้แก่ *Aspergillus* sp. (1), *Penicillium* sp. (2), *Paecilomyces* sp. (3), *Fusarium* sp.1 (4), *Fusarium* sp.2 (5)และ *Nodulisporium* sp. (6)



รูปที่ 4.16 ราเอนโดไฟต์ในตระกูล Xylariaceae ได้แก่ *Xylaria* sp.1 (1), *Xylaria* sp.2 (2), *Xylaria* sp.3 (3) และ *Daldinia* sp. (4)

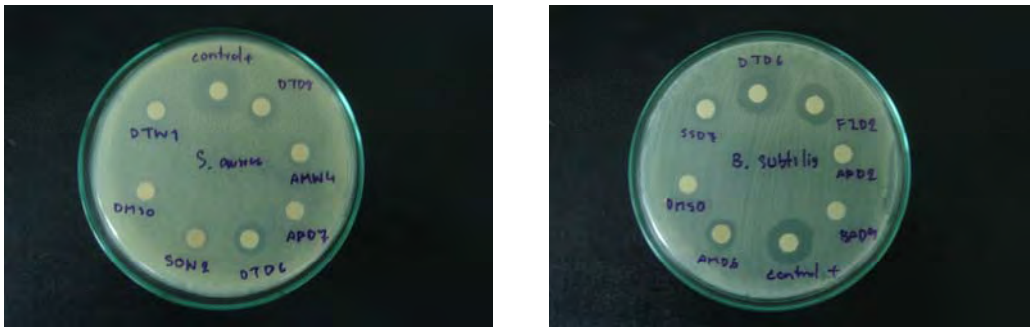
4.4 การทดสอบการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

4.4.1 ทดสอบความสามารถส่วนสกัดในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค

นำราเอนโดไฟต์ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันในตัวอย่างพืชแต่ละชนิดมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคโดยวิธี paper disk (นิตยา และคณะ, 2541) จุลินทรีย์ที่ใช้ 5 ชนิด ได้แก่

1. *Bacillus subtilis* ATCC6633
2. *Staphylococcus aureus* ATCC25923
3. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027
4. *Escherichia coli* ATCC25922
5. *Candida albicans* ATCC70014

เมื่อวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง โดยวัดจากขอบของจุลินทรีย์ทดสอบที่ถูกยับยั้งผ่าน paper disk จนถึงขอบอีกด้านหนึ่งของจุลินทรีย์ทดสอบที่ถูกยับยั้ง พบว่า ราเอนโดไฟต์แต่ละสายพันธุ์ สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ ได้แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 4.25 จากผลการทดลองพบว่าราเอนโดไฟต์ที่แยกได้สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้มากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ และยีสต์ (ตารางที่ 4.26) ราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ที่ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้เป็นวงกว้าง ได้แก่ DTD 8 , DTD 6 (รูปที่ 4.17)



(A) **(B)**

รูปที่ 4.17 แสดงการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบ (A)S*tapllylococcus aureus*, (B) *Bacillus subtil*

ตารางที่ 4.25 ผลการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบโดยสารสกัดจากราเอนโดไฟต์

ราเอนโดไฟต์	จุลินทรีย์ทดสอบ				
สายพันธุ์	*B. subtilis*	*S.aureous*	*P. aeroginosa*	*E. coli*	*C. albicans*
DTD 1	+++	+	-	-	-
DTD 3	+	-	-	-	-
DTD 4	+	+	-	-	+
DTD 6	+++	++	+	+	+
DTD 8	+++	++	+	-	+
DTW 1	++	+	-	-	-
DTW 3	++	+	-	-	-
DTW 8	++	+	+	-	++
DTW11	+	-	-	-	+
DTW23	++	++	+	+	+
DPD 1	++	+	-	-	-
DPD 3	+	+	-	-	-
DPD 5	+	+	-	-	-
DPD10	++	+	-	+	-
DPW 1	-	-	-	-	-
DPW 3	+	+	-	-	+
DPW 7	-	-	-	-	-
DPW 8	+	+	-	-	-
DPW17	++	++	+	-	-
SSD 1	-	-	-	-	-
SSD 2	+	+	-	-	-
SSD 5	++	+	-	-	+
SSD 7	+++	++	-	+	-
SSD 18	++	+	-	-	-
SSW 1	+	+	-	-	-
SSW 4	+	++	-	-	-
SSW 5	-	-	-	-	-
SSW 8	+	++	-	-	-

ตารางที่ 4.25 (ต่อ) ผลการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบโดยสารสกัดจากราเอนโดไฟต์

ราเอนโดไฟต์	จุลินทรีย์ทดสอบ				
สายพันธุ์	*B. subtilis*	*S.aureous*	*P. aeroginosa*	*E. coli*	*C. albicans*
SSW11	+++	++	+	-	-
SSW12	-	-	-	-	-
GND 1	+	+	-	-	-
GND 3	++	+	-	-	-
GND 4	-	+	-	-	+
GND 8	-	-	-	-	-
GNW 1	+++	+	-	-	+
GNW 5	-	-	-	-	-
GNW12	+	-	-	-	-
GNW13	++	+	-	-	-
SOD 1	++	++	+	-	-
SOD 2	++	+	-	-	-
SOD 4	+	+	-	-	-
SOD 5	++	++	-	+	+
SOW 2	+	+	-	-	-
SOW 4	-	-	-	-	-
SOW11	+	++	-	-	-
SOW13	++	+	-	-	-
SOW14	+	+	-	-	-
BAD 1	+	++	-	-	-
BAD 2	++	++	-	-	-
BAD 3	++	+	-	-	-
BAD 9	++	++	-	-	-
BAD 10	+	+	+	-	-
BAW 1	++	+	-	-	-
BAW 2	+	-	-	-	-
BAW 6	-	+	+	-	-
BAW 10	+	+	-	-	-
BAW11	++	+	-	-	+

ตารางที่ 4.25 (ต่อ) ผลการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบโดยสารสกัดจากราเอนโดไฟต์

ราเอนโดไฟต์	จุลินทรีย์ทดสอบ				
สายพันธุ์	*B. subtilis*	*S.aureous*	*P. aeroginosa*	*E. coli*	*C. albicans*
BAW16	+	-	-	-	-
AMD 2	++	+	-	+	+
AMD 3	-	-	-	-	-
AMD 4	-	+	-	-	-
AMD 6	++	+	-	-	+
AMD 8	+	++	-	-	-
AMW 1	-	-	-	-	-
AMW 4	+	++	-	+	-
AMW 7	++	+	+	-	-
AMW 8	-	+	-	-	-
AMW11	+	-	-	-	-
DID 1	+	-	-	-	-
DID 2	-	+	-	-	+
DID 7	-	-	-	-	+
DID 10	-	-	-	-	-
DID11	-	+	-	-	-
DIW 1	-	-	-	-	-
DIW 4	++	++	-	+	-
DIW 6	+	-	-	-	-
DIW12	-	-	-	-	-
DIW15	-	-	-	-	-
FID 1	+	-	+	-	-
FID 2	+++	++	-	-	+
FID 3	+	-	-	-	-
FID 4	+	-	-	-	-
FID 6	-	-	-	-	-
FID 7	+	++	-	-	-

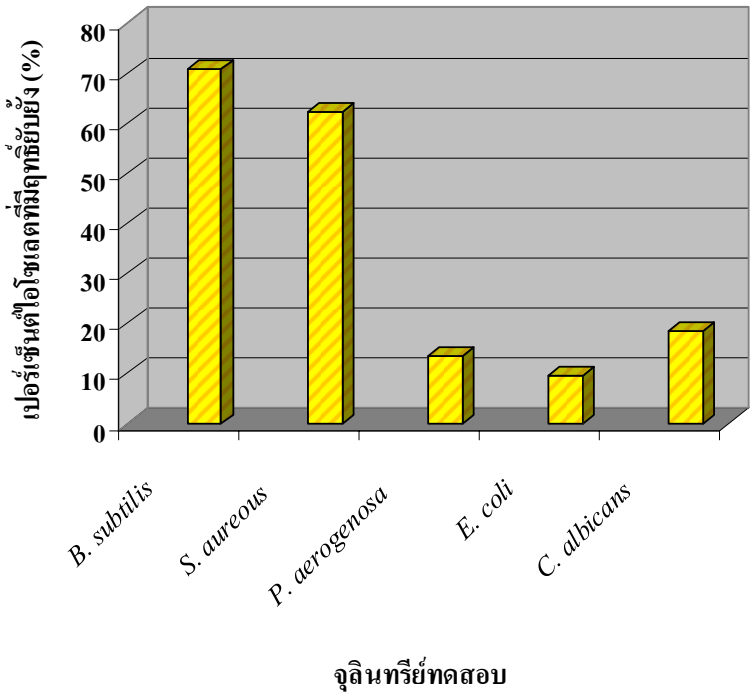
ตารางที่ 4.25 (ต่อ) ผลการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบโดยสารสกัดจากราเอนโดไฟต์

ราเอนโดไฟต์	จุลินทรีย์ทดสอบ				
สายพันธุ์	*B. subtilis*	*S.aureous*	*P. aeroginosa*	*E. coli*	*C. albicans*
FID 15	+++	++	-	-	-
FIW 1	+	-	-	-	-
FIW 2	-	-	-	-	-
FIW 3	++	+	-	-	-
FIW 6	-	-	-	-	-
FIW 11	-	-	-	-	-
FIW 17	++	+	+	-	-
DOD 1	-	-	-	-	-
DOD 2	++	++	-	+	+
DOD 5	++	-	-	-	-
DOD 9	+	-	-	-	+
DOD10	++	+	+	-	-
DOD 11	++	++	-	+	-
DOW 1	+	-	-	-	-
DOW 2	-	-	-	-	-
DOW 4	-	-	-	-	-
DOW 5	-	-	-	-	-
DOW18	++	+	+	-	-
DOW20	-	-	-	-	-

หมายเหตุ	-	หมายถึง	ไม่ยับยั้ง
	+	หมายถึง	บริเวณยับยั้ง 1-7 มิลลิเมตร
	++	หมายถึง	บริเวณยับยั้ง 7-15 มิลลิเมตร
	+++	หมายถึง	บริเวณยับยั้งมากกว่า 15 มิลลิเมตร

ตารางที่ 4.26 จำนวนราเอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ

	จุลินทรีย์ทดสอบ	จำนวนไอโซเลต ทีมีฤทธิ์ยับยั้ง	เปอร์เซ็นต์ (%)
แบคทีเรียแกรมบวก	*Bacillus subtilis* ATCC6633	73	70.87
	Staphylococcus aureus ATCC25923	64	62.13
แบคทีเรียแกรมลบ	*Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027	14	13.59
	Escherichia coli ATCC25922	10	9.70
ยีสต์	*Candida albicans* ATCC70014	19	18.44



รูปที่ 4.18 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ไอโซเลตที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 5 ชนิด

4.4.2 ทดสอบความสามารถส่วนสกัดในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง

นำส่วนสกัดที่ได้จากราเอนโดไฟต์ (crude extract) ที่แยกได้ มาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งต่างๆ 5 ชนิด ได้แก่ เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร KatoIII (HTB-103) เซลล์มะเร็งตับ HepG2 (HB-8065) เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ SW620 (CCL-227) เซลล์มะเร็งเต้านม BT474 (HTB-20) และเซลล์มะเร็งปอด (Chago) ตรวจสอบด้วยวิธี MTT โดยการวัดการดูดกลืนแสง เซลล์ที่มีชีวิตอยู่จะติดสี หลุมที่มีค่าความดูดกลืนแสงสูงแสดงว่ายังมีเซลล์ที่มีชีวิตอยู่มาก ส่วนหลุมที่มีค่าความดูดกลืนแสงน้อยแสดงว่า เซลล์ถูกยับยั้งการเจริญ

เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆของส่วนสกัดจากราเอนโดไฟต์ แสดงดังตารางที่ 4.26 ตัวเลขที่พิมพ์ตัวหนา หมายถึงการยับยั้งแบบจำเพาะเจาะจง จากตารางที่ 4.26 พบว่าราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ DTD 6 และ FID 15 ยับยั้ง เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร KatoIII ได้อย่างจำเพาะ

ตารางที่ 4.27 เปอร์เซ็นต์การการอยู่รอดของเซลล์มะเร็ง

ราเอนโดไฟต์	เปอร์เซ็นต์การอยู่รอด (%)				
สายพันธุ์	Hep-G2	BT 474	KATO III	Chago	SW620
DTD 1	54.12	65.85	46.00	96.16	77.36
DTD 6	51.81	50.40	**29.00**	67.96	42.18
DTD 3	70.06	86.17	51.33	98.08	74.62
DTD 4	14.54	36.99	13.00	18.10	38.66
DTD 8	46.97	78.45	**37.33**	84.29	59.35
DTW 1	34.26	51.62.	28.83	92.68	66.04
DTW 3	53.84	61.38	43.00	77.21	55.84
DTW 8	13.15	37.39	13.16	23.62	12.56
DTW11	66.29	53.25	46.83	97.24	93.03
DTW23	48.25	42.68	32.16	30.93	68.40
DPD 1	14.68	34.55	15.00	51.55	13.93
DPD 3	86.55	131.06	42.93	99.25	48.51
DPD 5	14.82	34.55	15.50	31.77	12.31
DPD 10	18.74	50.00	18.33	24.34	18.28
DPW 3	13.00	33.73	13.50	16.30	10.32
DPW 8	10.48	32.11	12.66	19.66	14.05

ตารางที่ 4.27 (ต่อ) เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์มะเร็ง

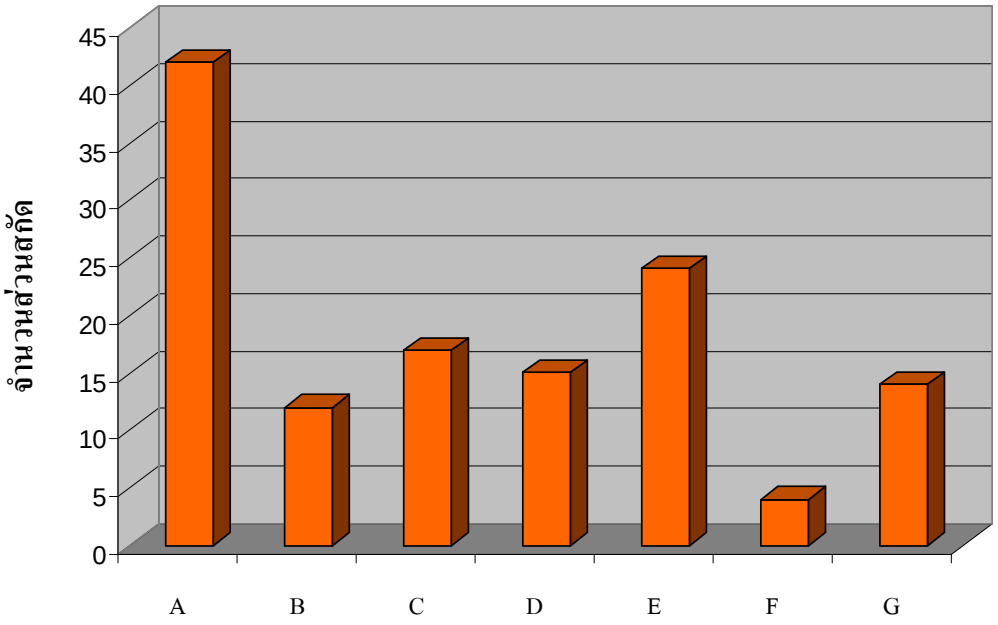
ราเอนโดไฟต์	เปอร์เซ็นต์การอยู่รอด (%)				
สายพันธุ์	Hep-G2	BT 474	KATO III	Chago	SW620
DPW17	54.12	41.59	36.66	99.64	68.65
SSD 2	57.21	49.39	43.30	91.86	59.49
SSD 5	23.21	35.36	22.66	98.32	52.23
SSD 7	21.67	32.11	17.16	49.04	21.64
SSD18	27.18	40.30	31.29	97.40	63.16
SSW 1	100.00	73.93	57.92	96.58	110.50
SSW 4	65.24	77.57	67.60	98.11	112.08
SSW 8	39.47	50.90	37.53	89.26	80.28
SSW11	38.06	51.51	39.96	99.05	68.48
GND 1	64.77	68.78	53.87	97.99	105.03
GND 3	70.21	81.21	61.97	98.93	97.98
GND 4	65.25	50.00	51.05	87.26	68.77
GNW 1	40.89	37.27	30.28	94.69	60.71
GNW12	46.87	43.39	46.49	97.05	64.17
GNW13	67.14	52.72	42.95	96.10	82.87
SOD 1	46.18	69.09	47.71	99.27	71.07
SOD 2	111.11	85.15	54.75	100.11	99.85
SOD 4	74.46	78.84	57.39	98.70	101.29
SOD 5	53.42	42.72	45.70	93.51	61.00
SOW 2	23.64	39.69	33.09	93.51	35.18
SOW11	51.06	57.27	47.17	100.70	95.97
SOW13	88.10	71.54	46.52	96.49	65.50
SOW14	114.31	53.72	54.01	94.86	52.71
BAD 1	48.32	41.75	56.77	57.64	51.42
BAD 2	17.10	26.32	21.15	75.61	16.40
BAD 3	49.25	33.51	33.03	88.44	42.89
BAD 9	65.61	42.55	41.49	93.34	74.09
BAD10	21.56	26.32	29.94	63.12	16.40

ตารางที่ 4.27 (ต่อ) เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์มะเร็ง

ราเอนโดไฟต์	เปอร์เซ็นต์การอยู่รอด (%)				
สายพันธุ์	Hep-G2	BT 474	KATO III	Chago	SW620
BAW 1	81.04	44.94	47.84	90.89	47.80
BAW 2	100.37	64.89	61.83	96.38	94.83
BAW 6	33.08	30.31	32.70	92.06	15.63
BAW10	90.70	74.20	46.21	97.78	93.02
BAW11	16.72	29.52	17.24	14.93	12.40
BAW16	15.61	27.65	17.41	17.03	15.50
AMD 2	70.36	47.60	45.72	97.31	93.79
AMD 4	109.29	77.12	67.69	98.24	88.75
AMD 6	47.95	43.61	41.24	82.49	40.82
AMD 8	112.63	67.28	57.44	98.01	70.54
AMW 4	113.94	64.18	65.58	98.59	103.76
AMW 7	32.03	40.87	39.31	94.78	13.37
AMW 8	11.38	30.06	24.57	27.84	11.04
AMW11	112.86	65.25	48.37	42.53	63.44
DID 1	40.80	30.19	64.18	100.99	16.60
DID 2	12.19	29.05	23.09	42.53	11.77
DID 7	68.60	46.10	53.95	39.62	18.79
DID 11	58.53	76.01	85.25	95.37	93.74
DIW 4	18.04	34.79	37.34	66.58	27.23
DIW 6	59.67	60.47	74.44	95.85	94.23
FID 1	43.09	72.97	78.62	101.65	85.39
FID 2	83.12	83.78	79.36	97.51	94.84
FID 3	66.66	78.37	55.03	97.74	91.28
FID 7	60.00	58.44	65.60	93.72	61.71
FID 15	45.25	57.76	**39.31**	55.90	43.31
FIW 1	83.41	86.82	87.46	97.74	90.79
FIW 3	11.70	27.36	31.94	34.36	12.51
FIW17	13.49	30.06	28.50	13.27	12.02

ตารางที่ 4.27 (ต่อ) เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์มะเร็ง

ราเอนโดไฟต์	เปอร์เซ็นต์การอยู่รอด (%)				
สายพันธุ์	Hep-G2	BT 474	KATO III	Chago	SW620
DOD 1	54.70	75.32	43.48	42.85	52.33
DOD 2	12.30	31.41	29.23	16.11	12.02
DOD 5	12.68	32.43	7.12	19.43	22.20
DOD 9	15.28	34.12	25.79	51.30	12.76
DOD 10	92.84	35.81	86.48	100.00	13.00
DOD 11	102.69	62.98	67.67	94.16	98.52
DOW 1	128.85	113.31	85.81	103.47	70.27
DOW18	35.87	31.49	36.27	70.43	95.10



รูปที่ 4.19 จำนวนส่วนสกัดที่มีการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ

(A) จำนวนส่วนสกัดที่ไม่มีผลยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง

(B) จำนวนส่วนสกัดที่มีผลยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งทุกชนิด

(C) จำนวนส่วนสกัดที่มีผลยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ (Hep-G2)

(D) จำนวนส่วนสกัดที่มีผลยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านม (BT 474)

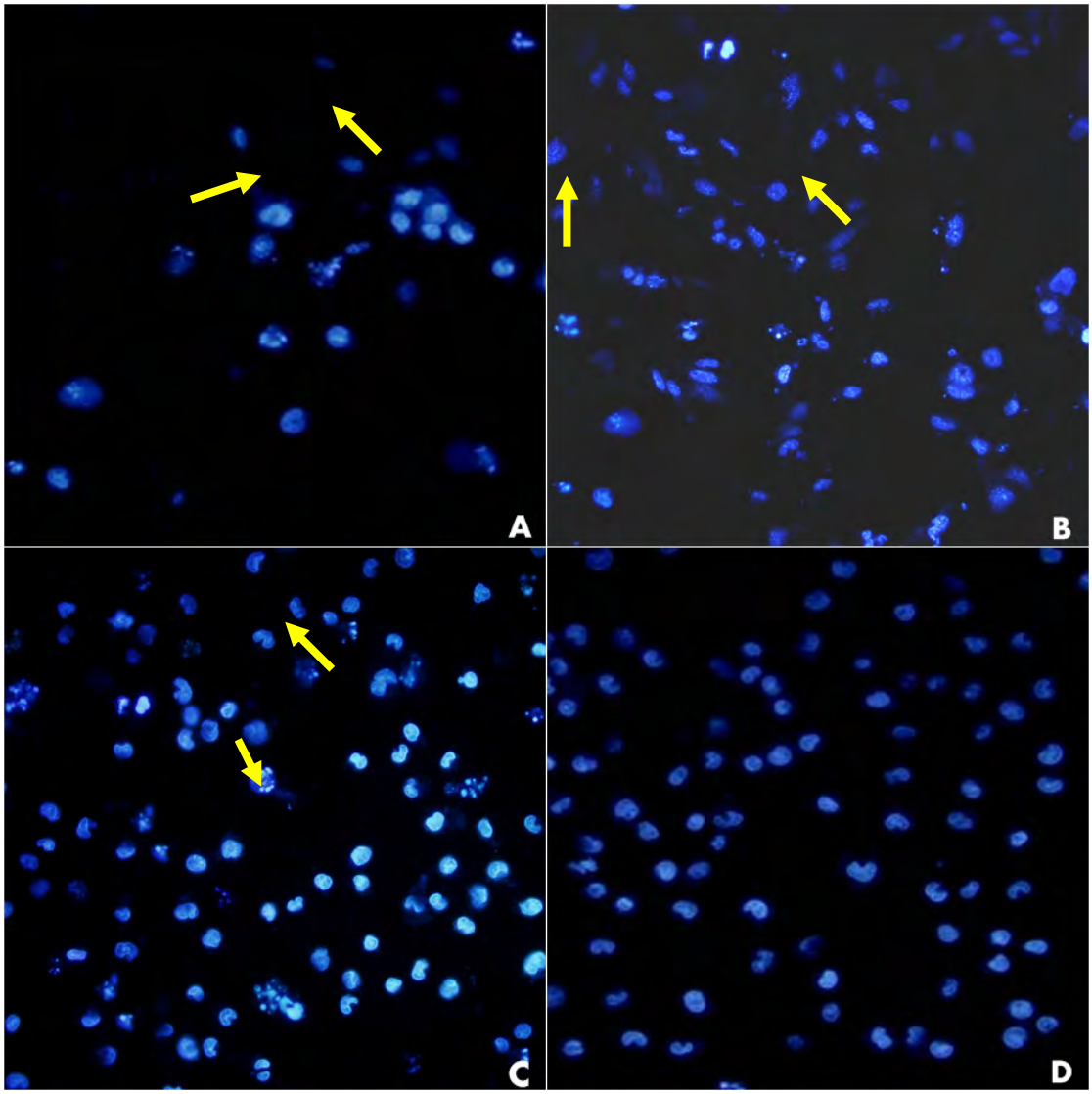
(E) จำนวนส่วนสกัดที่มีผลยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO III)

(F) จำนวนส่วนสกัดที่มีผลยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปอด (Chago)

(G) จำนวนส่วนสกัดที่มีผลยับยั้งการเจริญของเซลล์ลำไส้ (SW 620)

4.4.3 การตรวจสอบการตายแบบอะพ็อบโทซิสของเซลล์มะเร็ง

เมื่อนำส่วนสกัดจากราเอนโดไฟต์ สายพันธุ์ DTD 6 ซึ่งแยกได้จากต้นพลวงและ FID 15 ซึ่งแยกได้จากตะขบป่ามาทดสอบการกระตุ้นให้เซลล์เกิดการตายแบบอะพ็อบโทซิส โดยใช้กล้องฟลูออเรสเซนต์ พบว่าส่วนสกัดทั้งสองสามารถกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO III) เกิดอะพ็อบโทซิสได้ แสดงดังรูป 4.20 ลูกศรสีเหลืองชี้เซลล์ที่เกิดอะพ็อบโทซิส



รูปที่ 4.20 การเกิดอะพ็อบโทซิสของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO III)

(A) เมื่อถูกกระตุ้นด้วยส่วนสกัดของราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ DTD 6

(B) เมื่อถูกกระตุ้นด้วยส่วนสกัดของราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ FID 15

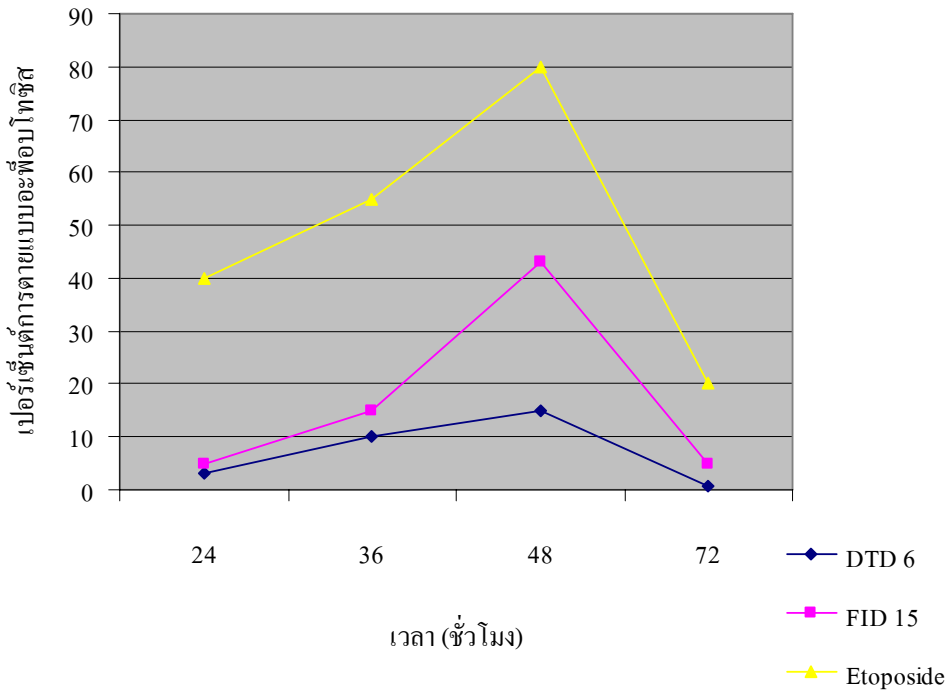
(C) เมื่อถูกกระตุ้นด้วย etoposide (ชุดควบคุมบวก)

(D) เมื่อถูกกระตุ้นด้วย DMSO (ชุดควบคุมลบ)

4.4.4 การหาเวลาที่เหมาะสมในการตรวจสอบการตายแบบอะพ็อบโทซิส

จากการตรวจสอบการตายแบบอะพ็อบโทซิสของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO III) โดยตรวจสอบในช่วงเวลาต่างๆได้แก่ 24, 36, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่าส่วนสกัดจากราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ FID 15 สามารถกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารตายแบบอะพ็อบโทซิสได้สูงสุดที่ 45% ในชั่วโมงที่ 48 และส่วนสกัดจากราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ DTD 6 สามารถกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารตายแบบอะพ็อบโทซิสได้สูงสุดที่ 15% ในชั่วโมงที่ 48 เช่นกัน (รูปที่ 4.21)

จากการศึกษาพบว่าสาร Resveratrol สามารถกระตุ้นเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO III) ให้เกิดอะพ็อบโทซิสได้ และสามารถตรวจสอบได้ในชั่วโมงที่ 48 ได้ถึง 53% ในขณะที่ชั่วโมงที่ 24 สามารถตรวจสอบได้เพียง 8.3% เท่านั้น (Atten และคณะ, 2001) ผลวิจัยดังกล่าวจึงสอดคล้องกับผลของงานวิจัยนี้



รูปที่ 4.21 เปอร์เซ็นการตายแบบอะพ็อบโทซิสสูงสุด

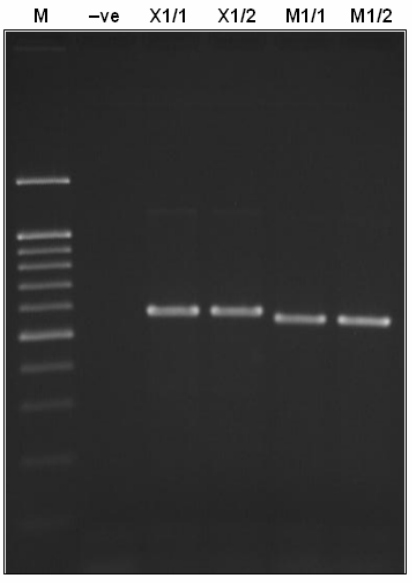
4.5 ราเอนโดไฟต์ที่คัดเลือกได้

ราเอนโดไฟต์ที่คัดเลือกได้คือ ราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ DTD 6 ซึ่งจากการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางสัณฐานวิทยาแล้วพบว่าคือ *Nodulisporium* sp. (รูปที่ 4.2) เนื่องจากการศึกษาพบว่าเป็นราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้ทั้ง 5 ชนิด มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO III) อย่างจำเพาะ และสามารถกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารเกิดการตายแบบอะพ็อบโทซิสได้

ราเอนโดไฟต์ที่คัดเลือกได้อีกสายพันธุ์คือ ราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ FID 15 ซึ่งจากการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางสัณฐานวิทยาแล้วพบว่าคือ *Xylaria* sp.2 (รูปที่ 4.2)เนื่องจากการศึกษาพบว่าเป็นราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ดี มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO III) อย่างจำเพาะ และสามารถกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารเกิดการตายแบบอะพ็อบโทซิสได้เช่นกัน จึงนำราเอนโดไฟต์ทั้งสองชนิดไปพิสูจน์เอกลักษณ์ทางอณูชีววิทยาต่อไป

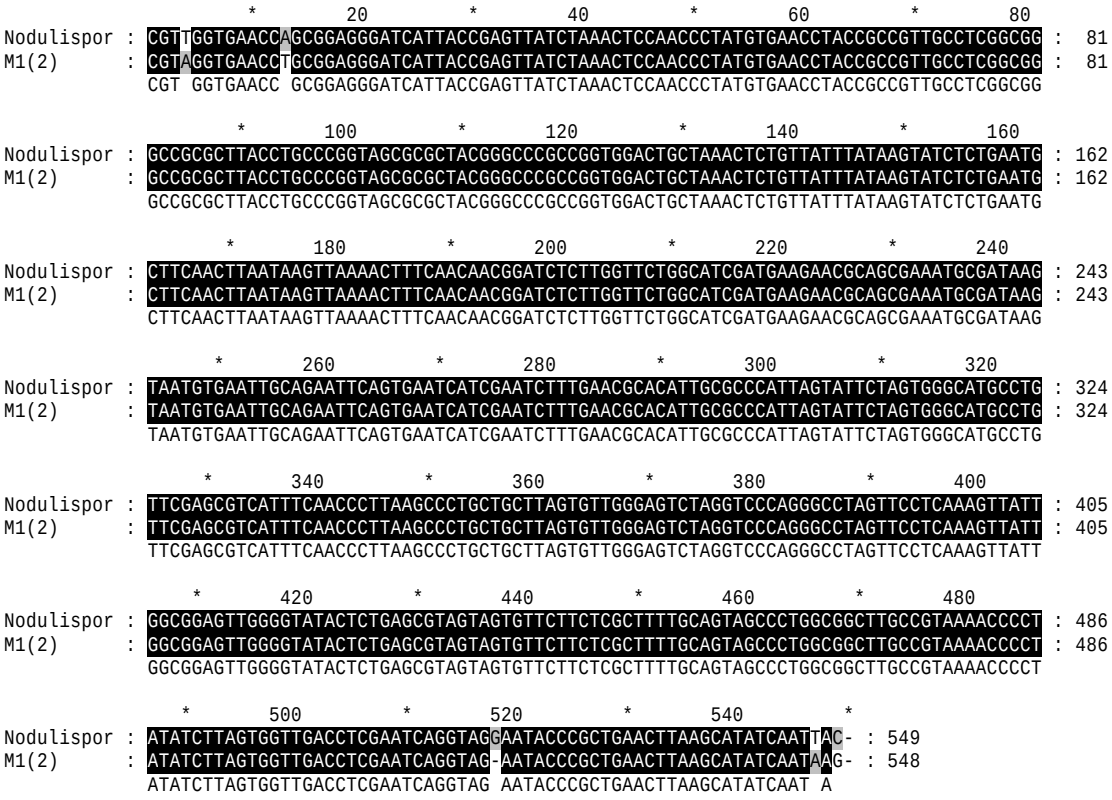
4.6 การพิสูจน์เอกลักษณ์ทางอณูชีววิทยา

ทำการสกัด และเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ ด้วยด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR) ของราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ DTD 6 และ FID 15 ด้วยไพรเมอร์ ITS 1 และ ITS 4 ทำการตรวจสอบ PCR product เบื้องต้นด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็คโทรโฟริซิส ดังแสดงในรูปที่ 4.22

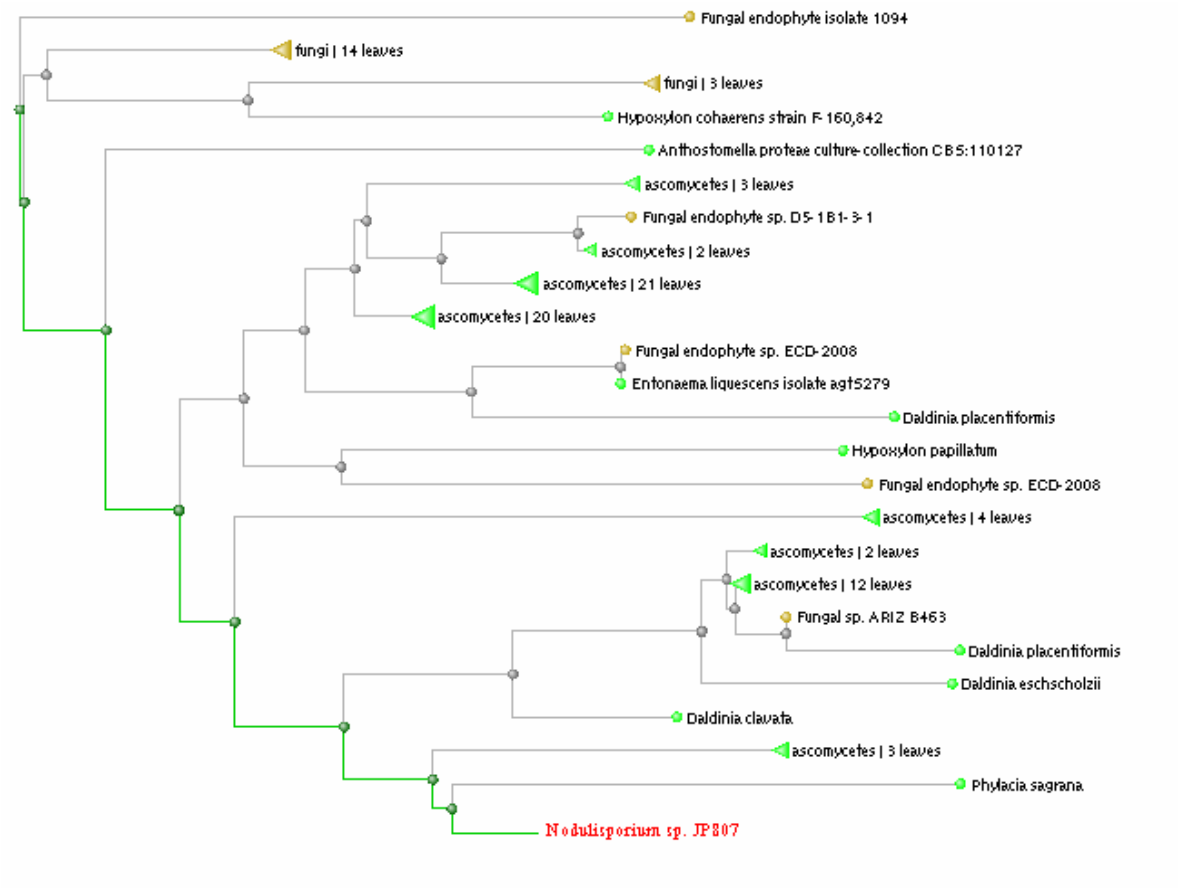


รูปที่ 4.22 PCR product บนอะกาโรสเจลของราเอนโดไฟต์สายพันธุ์DTD 6 (M1) และFID 15 (X1)

จากนั้นวิเคราะห์หาลำดับเบสของยีนประมวลรหัส 18S rRNA ของราเอนโดไฟต์ทั้ง 2 สายพันธุ์ โดยนำลำดับเบสของราเอนโดไฟต์ทั้ง 2 สายพันธุ์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน Genbank และทำ sequence aligment แสดงดังรูป 4.23 - 4.24 พบว่าราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ DTD 6 มีความใกล้เคียงกับ *Nodulisporium* sp. JP807 99% และ ราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ FID 15 มีความใกล้เคียงกับ *Xylaria* sp. T1070911 100%



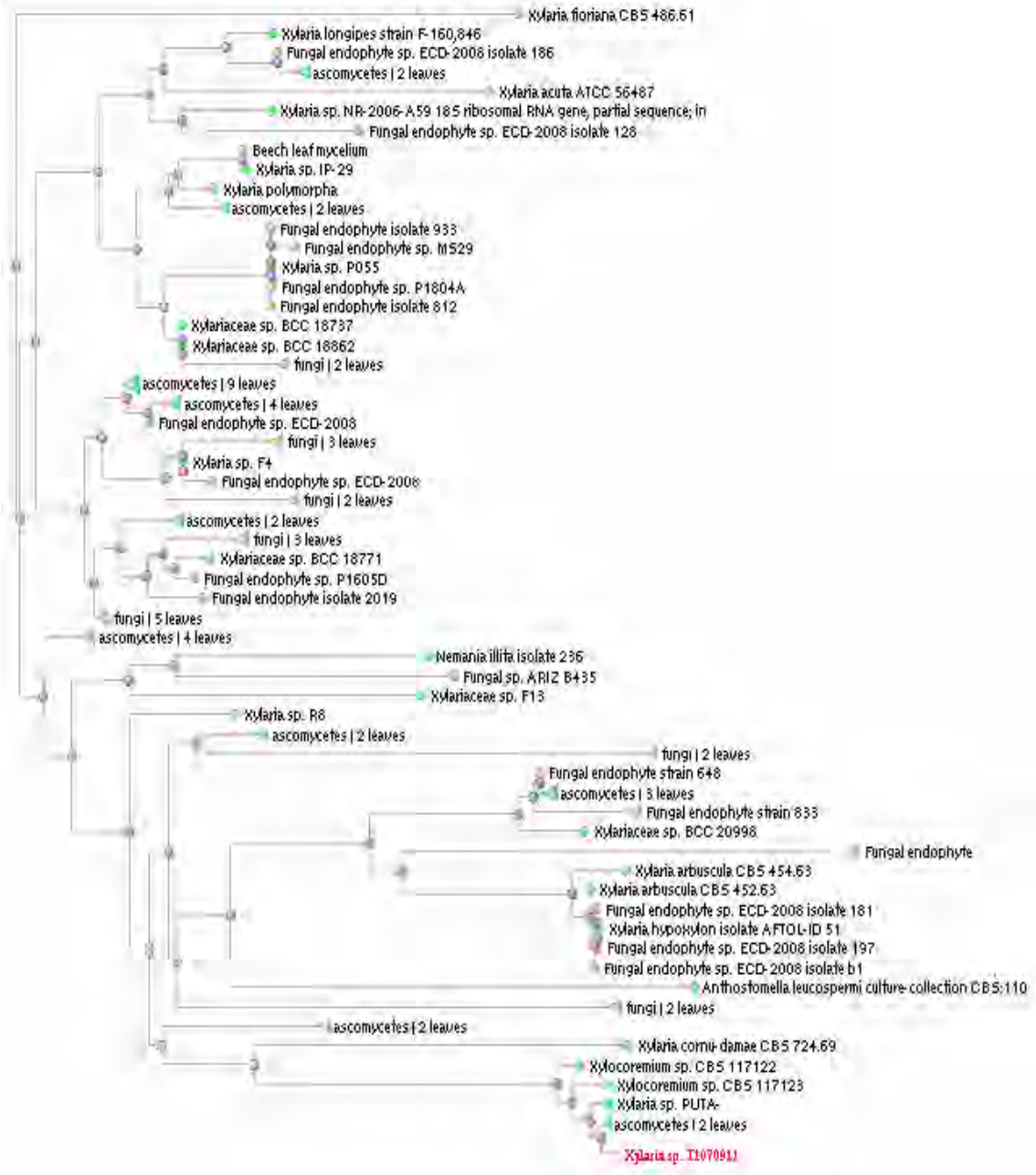
รูปที่ 4.23 เปรียบเทียบลำดับเบสของราเอนโดไฟต์ DTD 6 กับฐานข้อมูล Genbank



รูปที่ 4.24 แผนภูมิ Dendrogram แสดงความสัมพันธ์ของ *Nodulisporium* sp. JP807 กับสายพันธุ์ใกล้เคียง

```
                *        20        *        40        *        60        *        80
Xylaria :  CCCAAACCCCATGTGAACATACCTAACGTTGCCTCGGCGGGTCGTACCTACCCTGTAGTGCACTTACCTGTAAGTGCCTACCCG :  84
X1(2)   :  CCCAAACCCCATGTGAACATACCTAACGTTGCCTCGGCGGGTCGTACCTACCCTGTAGTGCACTTACCTGTAAGTGCCTACCCG :  84
           CCCAAACCCCATGTGAACATACCTAACGTTGCCTCGGCGGGTCGTACCTACCCTGTAGTGCACTTACCTGTAAGTGCCTACCCG

                *       100        *       120        *       140        *       160
Xylaria :  GTAGGCACGGGTAAGCCCGCCGGCGCCCCATTAAACTCTGTTTAATTACTGGATATCTGAATTACAACTAAATAAGTTAAAACT : 168
X1(2)   :  GTAGGCACGGGTAAGCCCGCCGGCGCCCCACGAAACTCTGTTTAATTACTGGATATCTGAACTATAACTAAATGAGTTAAAACT : 168
           GTAGGCACGGGTAAGCCCGCCGGCGCCCCA  AAACTCTGTTTAATTACTGGATATCTGAA TA AACTAAAT AGTTAAAACT

                *       180        *       200        *       220        *       240        *
Xylaria :  TTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAA : 252
X1(2)   :  TTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAA : 252
           TTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAA

                260        *       280        *       300        *       320        *
Xylaria :  TCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCATTAGTATTCTAGTGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTCAACCCTTAAGCCTT : 336
X1(2)   :  TCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCATTAGTATTCTAGTGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTCAACCCTTAAGCCTT : 336
           TCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCATTAGTATTCTAGTGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTCAACCCTTAAGCCTT

                340        *       360        *       380        *       400        *       420
Xylaria :  CTGTTGCTTAGCGTTGGGGGCCTACCGTATGGCGGTAGCCCCTTAAAATTAGTGGCGGAGTCGGTTCACACTCTAGACGTAGTA : 420
X1(2)   :  CTGTTGCTTAGCGTTGGGGGCCTACCGTATGGCGGTAGCCCCTTAAAATTAGTGGCGGAGTCGGTTCACACTCTAGACGTAGTA : 420
           CTGTTGCTTAGCGTTGGGGGCCTACCGTATGGCGGTAGCCCCTTAAAATTAGTGGCGGAGTCGGTTCACACTCTAGACGTAGTA

                *       440        *       460        *       480        *       500
Xylaria :  AATATTATCTCGCCTATTAGTTGGACCGGTCCCCTGCCGTAAAACCCCTAATTTATCAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAAT : 504
X1(2)   :  AATATTATCTCGCCTATTAGTTGGACCGGTCCCCTGCCGTAAAACCCCTAATTTTTCAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAAT : 504
           AATATTATCTCGCCTATTAGTTGGACCGGTCCCCTGCCGTAAAACCCCTAATTT TCAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAAT

                *       520        *
Xylaria :  ACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA : 539
X1(2)   :  ACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA : 539
           ACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA
```

รูปที่ 4.25 เปรียบเทียบลำดับเบสของราเอนโดไฟต์ FID 15 กับฐานข้อมูล Genbank



รูปที่ 4.26 แผนภูมิ Dendrogram แสดงความสัมพันธ์ของ *Xylaria* sp. I1070911 กับสายพันธุ์ใกล้เคียง

4.7 การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่ได้จากราเอนโดไฟต์ที่คัดเลือกได้

4.7.1 การวิเคราะห์หาโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธ์ 1 จากราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ DTD 6

ของแข็งสีขาวที่ได้ 33 มิลลิกรัม (สารบริสุทธิ์ 1) เมื่อนำสารดังกล่าวไปแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง (thin layer chromatography: TLC) โดยใช้ระบบตัวทำละลาย คือ เฮกเซน:เอทิลแอซิเตต ในอัตราส่วน 20:80 จากนั้นนำไปย้อมด้วย vanillin ทำให้แห้งพบว่ามีจุดเดียว มีค่า Rf เท่ากับ 0.78

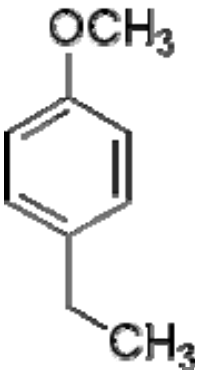
จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอินฟราเรดสเปกโตสโกปี พบว่ามีการดูดกลืนคลื่นแสงที่ FT-IR สเปกตรัม ν_{max} (cm^{-1}): 2855 (s), 1656 (m), 1577 (m), 1460 (m), 1348 (m), 1274 (s), 1169 (m), 1107 (m), 1049 (m), 1016 (m) (รูปในภาคผนวก ง.)

จากนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตรัมทั้ง ^{1}H- NMR และ ^{1}C- NMR พบตำแหน่งของโปรตอน และคาร์บอนดังนี้

^{1}H- NMR spectrum ($CDCl_3$, 400 MHz) δ(ppm) : 3.68(s, 3H, OCH_3-7), 6.84(d, *J* = 3 Hz, 1H, H-2), 6.86(d, *J* = 3 Hz, 1H, H-6), 7.35(dd, *J* = 2.0, 2.0 Hz, 1H, H-3), 7.38(dd, *J* = 4.0,5.0 Hz, 1H, H-5), 7.40(d, *J* = 3.0 Hz, 1H, H-4) (รูปในภาคผนวก ง.)

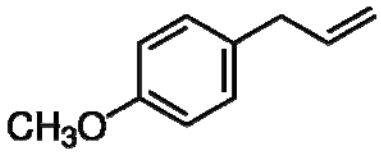
^{1}C- NMR spectrum ($CDCl_3$, 100 MHz) δ(ppm) : 29.65(CH_3 -7), 29.69(CH-6), 56.41(CH-4), 106.08(CH-3), 120.81(CH-5), 120.81(CH-2), 157.02(CH-1) (รูปในภาคผนวก ง.)

จากข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีทั้งหมด (ภาคผนวก ง) สารบริสุทธิ์ 1 คือ 4-ethyl-methoxybenzene หรือ *p*-ethylanisole (รูปที่4.27)



รูปที่ 4.27 โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ 1

ในปี 1979 พบว่า 4-ethylanisole เป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่สามารถสกัดได้จากพืช (*Leptolejeunea elliptica* Schiffn.) (Nakayama และคณะ 1979) สารชนิดนี้ยังสามารถถูกผลิตโดยราเอนโดไฟต์ *Fusarium oxysporum* ที่แยกจาก *Prunus dulcis* (sweet almond) (John และคณะ 2008) สำหรับฤทธิ์ทางชีวภาพ 4-ethylanisole ยังไม่มีการรายงาน แต่มีการรายงานเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพของสารที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกัน ได้แก่ 4-allylanisole (รูปที่ 4.28) โดยสารดังกล่าวสามารถแยกได้จากพืชหลายชนิดเช่น กะเพรา, *Pimpinella anisum* เป็นต้น



รูปที่ 4.28 4-allylanisole (estragole)

4-allylanisole มีฤทธิ์ในการยับยั้งไวรัสโรคเริม (herpes simplex virus type 2) (Koch และคณะ 2008) นอกจากนี้ยังสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการกระตุ้นประสาทบริเวณสะโพกของหนู (Leal-Cardoso และคณะ 2004)

4.7.2 การวิเคราะห์หาโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธ์ 2 จากราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ FID 15

ผลึกรูปเข็มสีขาวที่ได้จากแฟรกชันที่ 5 โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี ผลึกรูปเข็มสีขาวที่ได้ 4.5 มิลลิกรัม

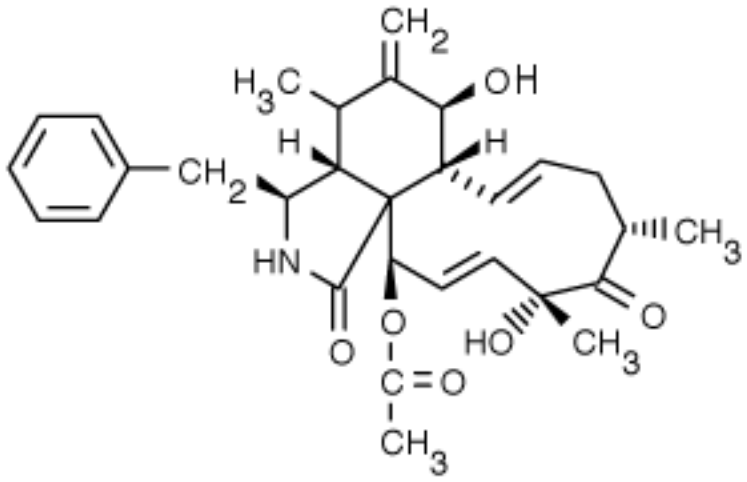
จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอินฟราเรดสเปกโตสโกปี พบว่ามีการดูดกลืนคลื่นแสงที่ FT-IR สเปกตรัม ν_{max} (cm^{-1}) : 3409(s), 1733(m), 1693(m), 1449(s), 1369(s), 1227(w) และ 1008(w) (รูปในภาคผนวก ง.)

จากนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตรัมทั้ง ^{1}H- NMR และ^{1}C- NMR พบตำแหน่งของโปรตอน และคาร์บอนดังนี้

^{1}H- NMR spectrum ($CDCl_3$, 400 MHz) δ(ppm) : 7.332 (2H, dd, J = 7.2 และ 7.6 Hz, 3-H และ 5-H), 7.260 (1H, dd, J = 7.2 และ 7.6 Hz, 4-H), 7.118 (2H, dd, J = 6.8 Hz, 2-H และ 6-H), 6.128 (1H, dd, J = 2.8 และ 12.8 Hz, 20-H), 5.717 (1H, dd, J = 9.6 และ 15.6 Hz, 13-H), 5.693 (1H, t, J = 2.0 และ 2.0 Hz, 21-H), 5.372 (1H, dd, J = 5.2 และ 10.0 Hz, 14-H), 5.333 (2H, s, 12-H), 5.158 (1H, dd, J = 2.4 และ 16 Hz, H-19), 5.118 (2H, s, H-12), 3.819 (1H, d, J = 10.4 Hz, H-7), 3.239 (1H, dt, J = 4.4 และ 9.2 Hz, 3-H), 2.873 (1H, dd, J = 10 และ 9.6 Hz, 8-H), 2.848 (2H, dd, J = 4.8 และ 12.4 Hz, 10-H), 2.794 (1H, 16-H), 2.758 (1H, d, J = 5.6 Hz, 5-H), 2.717 (2H, dd, J = 9.2 และ 1.32 Hz, 10-H), 2.550 (2H, q, J = 11.2 Hz, 15- H), 2.303 (3H, s, H-CH_3 (Ac)), 2.171 (1H, dd, J = 3.6 และ 4.4 Hz, 4-H), 2.044 (2H, dd, J = 5.6 และ 14.4 Hz, 15-H), 1.540 (3H, s, 23-H), 1.246 (3H, d, J = 6.4 Hz, 22-H), 0.959 (3H, d, J = 6.8 Hz, H-11) (รูปในภาคผนวก ง.)

^{1}C- NMR spectrum ($CDCl_3$, 100 MHz) δ(ppm) : 210.319 (C-17), 173.640 (C-1), 169.728 ($CH_3\underline{C}$(O)), 147.460 (C-6), 137.233 (C-1), 134.152 (C-14), 132.268 (C-20), 130.583 (C-13), 129.065 (C-2), 128.943 (C-3), 127.601 (C-19), 127.098 (C-4), 114.538 (C-12), 77.696 (C-18), 77.223 (C-21), 69.810 (C-9), 53.544 (C-3), 53.254 (C-9), 50.013 (C-4), 46.962 (C-8), 45.315 (C-8), 45.315 (C-10), 42.318 (C-16), 37.704 (C-15), 32.656 (C-5), 24.160 (C-23), 2.858 (C-CO), 19.386 (C-22), 13.659 (C-11) (รูปในภาคผนวก ง.)

จากข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีทั้งหมด (ภาคผนวก ง) พบว่า สารบริสุทธิ์ 2 คือ Cytochalasin D (รูปที่4.29)



รูปที่ 4.29 โครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ 2

โดยสาร Cytochalasin D นี้สามารถถูกผลิตได้โดยราหลายสกุลโดยเฉพาะราในกลุ่ม Xylariaceae ได้แก่ *Xylaria* sp., *Daldinia* sp., *Hpoxylon* sp. เป็นต้น นอกจากนี้ยังสามารถผลิตได้จากราชนิดอื่น เช่น *Phomopsis* sp., *Chaetomium* sp. (ทัศวรรณ, 2548)

สำหรับการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารชนิดนี้ สามารถออกฤทธิ์ได้หลากหลาย จากรายงานการวิจัยดังนี้ ในปี 2007 Cytochalasin D ถูกใช้เป็นสารยับยั้งปฏิกิริยา actin polymerization ของเซลล์เม็ดเลือดขาวของหนู (alveolar macrophage cell line, NR 8386) (Haberzettl และคณะ 2007) Cytochalasin D สามารถส่งเสริมการเจริญของ callus แครอท (Scherer, 2006) Cytochalasin D ว่ามีผลต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (jurket)(Bernd และคณะ, 2006) และสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ (human colon adenocarcinoma cell line, HT-29) (Cohen และคณะ, 1999) นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ยับยั้งความสามารถในการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ (Bruijns และ Bult, 2001) และฤทธิ์ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของ *Entamoeba invadens* (Makioka และคณะ 2000)

4.8 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

นำสารบริสุทธิ์ทั้ง 2 ชนิด มาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง 5 ชนิดข้างต้นด้วยวิธี MTT จากนั้นหาค่า IC_{50} (µg/ml) และทดสอบการกระตุ้นการตายแบบอะพ็อบโทซิส

ตารางที่ 4.28 ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆของสารบริสุทธิ์

สารบริสุทธิ์	IC_{50} (µg/ml)				
	Hep-G2	BT-474	KATO III	Chago	SW 620
1	6.777	4.147	3.030	>10	4.964
2	4.799	>10	5.840	>10	4.666

ตารางที่ 4.29 การกระตุ้นการตายแบบอะพ็อบโทซิสของมะเร็งชนิดต่างๆของสารบริสุทธิ์

สารบริสุทธิ์	การตายแบบอะพ็อบโทซิส (%)				
	Hep-G2	BT-474	KATO III	Chago	SW 620
1	-	-	5.71	-	2.38
2	3.03	-	21.09	-	6.49

จากผลการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ พบว่าสารบริสุทธิ์ 1 (4-ethylmethoxybenzene) สามารถยับยั้งมะเร็งได้ทุกชนิดยกเว้นมะเร็งปอด (chago) แต่เมื่อนำมาทดสอบความสามรถในการกระตุ้นให้เกิดการตายแบบอะพ็อบโทซิสพบว่าสามารถกระตุ้นให้เกิดได้เพียง 2 ชนิดเท่านั้น และมีเปอร์เซ็นต์ที่ค่อนข้างต่ำ ได้แก่ KATO III (5.71%) และ SW 620 (2.38%) สำหรับ สารบริสุทธิ์ 2 (cytochalasin D) สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ 3 ชนิด ได้แก่ เซลล์มะเร็งตับ (Hep-G2), เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO III) และเซลล์มะเร็งลำไส้ (SW620) โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 4.779, 5.840 และ 4.666 ตามลำดับ ผลการกระตุ้นให้เกิดการตายแบบอะพ็อบโทซิสพบว่า สารบริสุทธิ์ 2 สามารถกระตุ้นการเกิด อะพ็อบโทซิสได้สูงที่สุดในเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO III) ที่ 21.09% นอกจากเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารแล้วมีรายงานเกี่ยวกับ Cytochalasin D ว่ามีผลต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิดอื่น ได้แก่ มะเร็งเม็ดเลือดขาว (jurket) (Bernd และคณะ, 2006) และสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ (human colon adenocarcinoma cell line, HT-29) (Cohen และคณะ, 1999) ได้อีกด้วย

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

สามารถแยกราเอนโดไฟต์ได้ทั้งหมด 302 ไอโซเลต 10 สกุล 18 ชนิด จากพืชทั้ง 10 ชนิด ในป่าเต็งรังป่าเต็งรัง อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน พบว่าในฤดูแล้งสามารถแยกราเอนโดไฟต์ได้มากที่สุดจากต้นรัง ในฤดูฝนสามารถแยกราเอนโดไฟต์ได้มากที่สุดจากต้นส้านใบเล็ก และยางพลวง โดยราเอนโดไฟต์ที่แยกได้มากที่สุด 3 อันดับแรกจากการเก็บตัวอย่างทั้ง 2 ฤดูได้แก่ *Phyllosticta* sp.1 , *Phomopsis* sp.1 และ *Xylaria* sp. 1 จากการจัดจำแนกกลุ่มของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้ พบว่าราในกลุ่ม Coelomycetes สูงที่สุดทั้งฤดูแล้ง และฤดูฝน ตามด้วยกลุ่ม Hyphomycetes และ Ascomycetes ตามลำดับ

จากการศึกษาการออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ พบว่าราเอนโดไฟต์ที่แยกได้สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้มากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ และยีสต์ สำหรับการออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งทดสอบทั้ง 5 ชนิด พบว่าส่วนสกัดจากราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ DTD 6 และ FID 15 สามารถยับยั้ง เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO III) อย่างจำเพาะ และสามารถกระตุ้นให้เซลล์ดังกล่าวเกิดการตายแบบอะพ็อบโทซิสได้ 15% และ 45% ตามลำดับ โดยสามารถตรวจสอบได้ที่ชั่วโมงที่ 48 เมื่อนำราเอนโดไฟต์ทั้ง 2 สายพันธุ์มาพิสูจน์เอกลักษณ์ทางอณูพันธุศาสตร์พบว่า DTD 6 มีความใกล้เคียงกับ *Nodulisporium* sp. JP807 99% และ ราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ FID 15 มีความใกล้เคียงกับ *Xylaria* sp. T1070911 100%

เมื่อนำราเอนโดไฟต์ทั้ง 2 สายพันธุ์มาเลี้ยงในอาหารเหลว Malt extrac เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ทำการแยกสารบริสุทธิ์ จากน้ำเลี้ยงเชื้อ และเส้นใย ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีและการตกผลึก จากนั้นพิสูจน์โครงสร้างของสาร ด้วยเทคนิคทางสเปกโตรสโคปี ได้สารบริสุทธิ์ 2 ชนิดคือ 4 - ethylmethoxybenzene (สารบริสุทธิ์ 1) และ cytochalasin D (สารบริสุทธิ์ 2) เมื่นำมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง พบว่าสารบริสุทธิ์ 1 สามารถยับยั้งมะเร็งได้ทุกชนิดยกเว้นมะเร็งปอด (chago) สามารถกระตุ้นให้เกิดการตายแบบอะพ็อบโทซิสได้เพียง 2 ชนิดเท่านั้น และมีเปอร์เซ็นต์ที่ต่ำ ได้แก่ เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO III) 5.71% และเซลล์มะเร็งลำไส้ (SW 620) 2.38% สำหรับ สารบริสุทธิ์ 2 สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ 3 ชนิด ได้แก่เซลล์มะเร็งตับ (Hep-G2), เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO III) และเซลล์มะเร็งลำไส้ (SW620) โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 4.779, 5.840 และ 4.666 ตามลำดับ ผลการกระตุ้นให้เกิดการตายแบบอะพ็อบโทซิสพบว่า สารบริสุทธิ์ 2 สามารถกระตุ้นการเกิดอะพ็อบโทซิสได้สูงที่สุดในเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO III) ที่ 21.09%

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

จิตรา เกาะแก้ว. 2550. **ราเอนโดไฟต์ในพืชสมุนไพรและการศึกษาการเป็นปฏิปักษ์ต่อราสาเหตุโรคพืชในห้องปฏิบัติการ**. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาโรคพืช ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เต็ม สมิตินันทน์. 2544. **ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย**. ส่วนพฤษศาสตร์ป่าไม้ สำนักวิชาการป่าไม้ กรมป่าไม้.

นิตยา บุญทิม และ สายสมร ลำยอง. 2541. เชื้อราเอนโดไฟต์ที่ผลิตสาร metabolites บางอย่างและมีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและเชื้อรา. **วารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ**. 1(2): 89-92.

นิตยา บุญทิม และ สายสมร ลำยอง. 2542. การคัดเลือกราเอนโดไฟต์จากไผ่พื้นเมืองที่สร้างกลุ่มเอนไซม์ย่อยโพลีแซคคาไรด์. **วารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ**. 2(2): 1-8.

ทัศวรรณ สมสีมี. 2548. **สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอนโดไฟต์ที่แยกจากใบกระท้อน *Sandoricum koetjape* จังหวัดจันทบุรี**. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วิจัย รักวิทยาศาสตร์. 2546. **ราวิทยาเบื้องต้น**, จามจุรีโปรดักท์, กรุงเทพฯ หน้า187.

สายสมร ลำยอง, พิภพ ลำยอง, นิตยา บุญทิม และ Hyde K.D. 2541. **การสำรวจการกระจายของราที่เจริญในต้นพืชป่าบริเวณดอยสุเทพ-ปุย**. รายงานการวิจัยสำนักงานสนันสนุนงานวิจัย.

ภาษาอังกฤษ

Alexopoulos, C.J., Mims, C.W. and Backwell, M. 1996. **Introductory Mycology**. Jone Wiley & Sons Inc. New York. 869p.

Amal, H.A., Ebel, R. E., Wray, V., Muller, W.E.G., Kozytska, S., Hentschel, U., Proksch, P. and Ebel, R. 2008. Bioactive metabolites from the endophytic fungus *Ampelomyces* sp. isolated from the medicinal plant *Urospermum picroides*. **Phytochemistry**. 69: 1716-1725.

Atten, M.J., Attar B.M., Milson, T and Holian, O. 2001. Resveratrol-induced inactivation of human gastric adenocarcinoma cells through a protein kinase C-mediated mechanism. **Biochemical Pharmacology**. 62: 1423-1432.

Azevedo, J.L., Maccheroni W.,Jr., Pereira J.O. and Araujo W.L. 2000. Endophytic microorganism: a review on insect control and recent advances on tropical plant. **Biotechnonlogy**. 3:40-65.

Bacon, C.W., Porter J.K., Robbins J.D. and Luttrell E.S. 1977. Epichloe typhina from toxic tall fescus grass. **Applied Environmental Microbiology**. 34: 576-581.

Bacon, C.W. 1988. Procedure of isolating the endophyte from tall fescue and screening of it for ergot alkaloid. **Applied Environmental Microbiology**. 54: 2615-2618.

Bacon C.W. and White J.F. Jr. 1994. **Biotechnology of endophytic fungi of grasses**. Florida:CRC press. 518p.

Barnett, H.L. and Hunter, B.B. 1987. **Illustrated Genera of Imperfect fungi**. 4 th ed. MacMillan, New york.

Bills, G., A. Dombrowski, F. Pelaez, J. Polishook, and Z. An. 2002. Recent and future discoveries of pharmacologically active metabolites from tropical fungi, p. 165-194. *In* R. Watling, J. C. Frankland, A. M. Ainsworth, S. Issac, and C. H. Robinson. (ed.), **Tropical mycology: Micromycetes**, vol. 2. CABI Publishing, New York, N.Y.

Brady, S.F. and Clardy, J. 2000. CR377, a new pentaketide antifunlgal agent isolated from an edophytic fungus. **Journal of Natuaral product**. 63: 1447-1448.

Breen, J.P. 1994. Acremonium endophyte interactions with enhanced plant resistance to insects. **Annual review of Entomology**. 39: 401-423.

Bruijns, S.F. and Bult, H. 2001. Effect of local Cytochalasin D delivery on smooth muscle cell migration and on collar-induce intimal hyperplasia in the rabbit carotid artery. British **Journal of Pharmacology**. 134: 473-483.

Carroll, G.C. 1988. Fungal endophyte in stem and leaves: From latent pathogen to mutulistic symbiont. **Ecology**. 69: 2-9.

Chareprasert, S., Piapukiew, J., Thienhirun, S., Whalley, A. and Sihanonth, P. 2006. Endophytic fungi of teak leaves *Tectona grandis* L. and rain tree *Samanea saman* Merr. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 22: 481-486.

Cheeptham, N., Lumyong, S. and Tomita, F. 1999. **Anti-yeast from endophytic fungi**. International Conference on Asian Network on Microbial Research. Chiamg Mai, Thailand. p.141.

Clay, K. 1987. Effect of fungal endophytes on the seed and seedling biology of *lolium perenne* and *Festuca arundinacea*. **Oecologi**. 73: 358-362

Cohen, E., Ophir, I. and Shaul, Y.B. 1999. Induced differentiation in HT29, a human adenocarcinoma cell line. **Journal of Cell Science**. 112: 2657-2666.

Dreyfuss, C. H., and Chapela, I. 1994. Potential of fungi in the discovery of novel, low-molecular weight pharmaceuticals, p. 49-80. In: V. P. Gullo, editor. **The discovery of natural products with therapeutic potential**. Butterworth-Heinemann, London, United Kingdom.

Fisher, P.O., Petrini, O., Petrini, L.E. and Sutton, B.C. 1994. Fungal endophytes from leaves and twig of *Quercus ilex* L. from England, Majaorco and Switzerland. **New Phytologist**. 127: 133-137.

Frohlich, J. and Hyde K.J.D. 1999. Biodiversity of palm fungi in the tropics: are global fungal diversity estimated realistic. **Biodiversity and Conservation**, 8: 977-1004.

Grades, M. and Bruns, T.D. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes: application to the identification of mycorrhiza and rusts. **Molecular Biology**. 2: 113-118.

Guo, B., Dai, J., Ng, S., Huang, Y., Leong, C., Ong, W. and Carte, B.K. 2000. Cytonic acid A and B: novel tridepside inhibitors of hCMV protease from the endophytic fungus Cytonaema species. **Jounal of Natural Product**. 63: 602-604.

Haberzettl, P., Duffin, R., Kramer, U., Hohr, D., Schins, P.F., Borm, J.A., and Albrecht, C. 2007. Actin plays a crucial role in the phagocytosis and biological response to respirable quartz particles in macrophages. **Archives of Toxicology**. 81:459–470.

Hallmann, J. and Sikora, R.A. 1996. Toxicity of fungal endophyte secondary metabolites to plant parasitic nematodes and soil-borne plant pathogenic fungi. **European Journal of Plant Pathology**. 102: 155-162.

Hawksworth, D. C.and Rossman A.Y. 1987. Where are the undescribed fungi. **Phytopathology**. 87: 888-891.

Horn, W.S., Simmonds, M. S.J., Schwartz, R.E. and Blaney, M.W. 1995. Phomopsichalasin, a novel antimicrobial agent from an endophytic *Phomopsis* sp. **Tetrahedron**. 51: 3969.

Isaka, M., Jaturapat, A., Rukseree, K., Danwisetkanjana, K., Tanticharoen, M. and Thebtanonth, Y. 2001. Phomopxanthones A and B, Novel Xanthone Dimers from the Endophytic Fungus *Phomopsis* Species. **Journal of Natural Product**. 64 : 1015-1018.

John J.B., Glory B. M., Jeffrey D.P.and Teresa L.O. 2008. Strain of *Fusarium oxysporum* isolated from Almond Hulls Produces Styrene and 7-Methyl-1,3,5-cyclooctatriene as the Principal Volatile Components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 56: 11392-11398.

Johnson, M.C., Dahlman D.L., Siegel M.R., Bush L.P., Latch G.C., Portter, D.A. and Verney, D.R. 1985. Insect feeding deterents in endophyte-infected tall fescue. **Applied Environmental Microbiology**. 49: 568-571.

Kanchanaprayudh, J., Zhou, Z., Yomyart, S., Srihanonth and Hogetsu, T. 2003. Molecular phylogeny of ectomycorrhiza *Pisolithus* fungi associated with pine, dipterocarp and eucalyptus trees in Thailand. **Mycoscience**. 44: 287-294.

Kaseettrathat, C., Ngamrojanavanich, N., Wiyakrutta, S., Mahidol, C., Ruchairawat, S. and Kittakoop, P. 2008. Cytotoxic and antiplasmodial substances from marine-derived fungi, *Nodulisporium* sp. And CRI247-01. **Phytochemistry**. 69: 2621-2626.

Kerr, JFR. and Harmon, B.V. 1965. Apoptosis. In: Tomei L.D., Cope F.C., editors. **The molecular basis of cell death**. Cold Spring Harbor Laborotory Press. 90: 419.

Khan, R., Shahzard, S., Choudhary, M.I., Khan, S.A., and Aamad, A. 2007. Biodiversity of endophytic fungi isolated from *Calotropis procera* (AIT.) R. BR. **Pakistan Journal of Botony**. 39: 2233-2239.

Koch, C., Reichling, J., Schneele, J. and Schnitzler, P. 2008. Inhibitory effect of essential oils against herpes simplex virus type 2. **Phytomedicine**. 15: 71-78.

Kolattukudy, P. 1985. Enzymatic prenetgration of the plant cuticle by fungal pathogen. **Annual Research Phytopathology**. 23: 233-250.

Leal-Cardoso, J.H., Matos-Brito, B.G., Lopes-Junior, J.E.G., Viana-Cardoso, K.V., Sampaio-Freitas, A.B., Brasil, R.O., Coelho-de-Souza, A.N. and Albuquerque, A.A.C. 2004. Effect of estragole on the compounds action potential of the rat sciatic nerve. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 37: 1193-1198.

Leuchtmann, A., Petrini, O., Petrini, L.E. and Carroll, G.C. 1992. Isozyme polomorphism in six endophytic *Phyllosticta* sp. **Mycological Research**. 96: 287-294.

Li, H., Qing, C., Zhang, Y. and Zhao, Z. 2005. Screening for endophytic fungi with antitumour and antifungal activities from Chinese medicinal plants. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 21: 1515-1519.

Liu, H., Wang, S., Cia, B. and Yao, X. 2004. Anticancer activity of com[pounds isolated from *Engelharbtia serrata* stem bark. **Pharmaceutical Biology**. 42: 475-477.

Liu, J.Y., Song, Y.C., Zhang, Z., Wang, L., Guo, Z.J., Zou, W.X. and Tan, R.X. 2004. *Aspergillus fumigatus* CY018, an endophytic fungusin *Cynodon dactylon* as a versatile producer of new and bioactive metabolites. **Biotechnology**. 114: 279-287.

Lumyong, S. and Lumyong, P. 1999. **Endophytic fungi in leaves and twigs of *Cinnamomum inners***. International Conference on Asian Network on Microbial Research. Chiamg Mai, Thailand. p.150.

Lumyong, S., Lumyong, P., Tanaka, K., Tomita, F. and Hyde, K.D. 2000**. Phylogenetic studies of endophytic fungi : amplification of 18S ribosomal DNA of endophytic fungi**. Asian Mycological Congress, Hong Kong SAR, China. p.98.

Makioka, A., Kumagai, M., Ohtomo, H., Kobayashi, S. and Takeuchi, T. 2000. Effect of Cytochalasin D on the growth, encystations and multinucleation of Entamoeba invadens. **Parasitological Research.** 86: 599-602.

Mekkamol, S., Jonglaekha, N. and Whalley A.J.S. 2000. **Endophytic fungi from teak leaves**. BMS/Trppical Mycology Symposium. Liverpool John Moores University, Liverpool, U.K.

Munday-Finch, S.C., Wilkins, A.L. and Miles, C.O. 1998. Isolationof Loicine A, Loicine B, Lolotriol and Lolitrem N from *Lolium perenne* infected with *Neotyphodium lolii* and evidence for natural occurrence of 31-Epilolitrem N and 31-Epilolitrem F.J. **Agricultural and Food Chemistry**. 46:590.

Mysore, V., Tejesvi, B., Mahesh, M., Nalini, S., Harishchandra, S.P., Kukkundoor, R.K., Ven, S. and Hunthrike, S.S. 2005. Endophytic fungal assemblages from inner bark and twig of *Terminalia arjuna* W.&A. (Combretaceae). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 21: 1535-1540.

Nakayama, M., Matsuo, A., Kami, T. and Hayashi, S. 1979. Volatiles from *Leptolejeunea elliptica* Schiffn. **Phytochemistry**. 18: 328.

Norkeaw, K. and Lumyong, S. 1999. **Enzyme activities of endophytic fungi**. International Conference on Asian Network on Microbial Research. Chiamg Mai, Thailand. p.151.

Palaga, T., Kataoka, T., Woo, J.T. and Nagai, K. 1996. Suppression of apoptotic cell death of IL-3-dependent cell lines by ER/SR Ca^{2+}-ATPase Inhibitors upon IL-3 Deprivation. **Experimental Cell Research**. 228: 92-97.

Petrini, O. 1986. Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissues. In: Van den Heuvel, N.J., editors. **Microbiology of Phylosphere**. Cambridge University Press. p. 175-187.

Petrini, O. and Fisher P.J. 1990. Occurance of fungal endophyte in twigs of palm leaf spots in north Queensland, Australia. **Mycological Research**. 94: 1077-1080.

Petrini, L.E., Petrini, O., Leuchmann , A. and Carroll, G.C. 1991. Conifer inhabiting species of Phyllosticta. **Sydowia**. 13: 148-169.

Photita, W., Lumyong, S., Lumyong, P. and Hyde, K.D. 2001. Endophytic fungi of wild banana (Musa acuminata) at Doi Suthep Pui National Park, Thailand. **Mycological Research**. 12:1508-1513.

Pimolsri, U. and Lumyong, S. 1999. **Screening of antifungal activity against *Pyricularia* sp. from endophytic fungi**. International Conference on Asian Network on Microbial Research. Chiamg Mai, Thailand. p.161.

Pongputthachart, D. and Lumyong, S. 1999. **Distribution of endophytic fungi from oak tree**. International Conference on Asian Network on Microbial Research. Chiamg Mai, Thailand. p.145.

Powell, R.G. and Petroski, R.J. 1922. **Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives**. Springer - Verlag. New York. p. 320–326.

Rarunee, S., Lumyong, S., Lumyong, P. and Dell, B. 1999. **Distribution of edible ectomycorrhiza in Chaing Rai Province**. International Conference on Asian Network on Microbial Research. Chiamg Mai, Thailand.

Redell, P., and V. Gordon. 2000. Lessons from nature: can ecology provide new leads in the search for novel bioactive chemicals from rainforests?, p. 205-212. In: S. K. Wrigley, M. A. Hayes, R. Thomas, E. J. T. Chrystal, and N. Nicholson editors., **Biodiversity: new leads for pharmaceutical and agrochemical industries**. The Royal Society of Chemistry press. Cambridge, United Kingdom.

Rukachaisirikul, V., Sommart, U., Phongpaichit, S., Sakayaroj, J. and Kirtikara, K. 2007. Metabolites from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. PSU-D15. **Phytochemistry**. 69: 183-187.

Scherer, G.F.E. 2006. Halotolerance is enhanced in carrot callus by sensing hypergravity: influence of calcium modulators and cytochalasin D**. Protoplasma**. 229: 149-154.

Sieber, T.N. Sieber, C.F., Petrini, O., Ekramoddoullah, A.K.M. and Dorworth C.E. 1991. Characterization of Canadian and European Melanconium from some Alnus species by morphological, cultural and biochemical studies. **Canadian Journal of Botany**. 69: 2170-2176.

Stierle, A.A., Sterle, D.B. and Buginis, T. 1999. Sequiatones A and B: Novel antitumour metabolites isolated from a red wood endophyte. **The Journal of Organic Chemistry**. 64: 5479-5484.

Strobel, G., Ford, E., Worapong, J., Harper, J.K., Arif, A.M., Grant, D.M., Fung, P.C.W. and Chau, R.M.W. 2002. Isopestacin, an isobenzofuranone from *Pestalotiopsis microspora*, possessing antifungal and antioxidant activities. **Phytochemistry**. *60: 179-183.*

Strobel, G., Yang, X., Sears,J.,Kramer, R., Sidhu,R.J., and Hess, W.M. 1996.Taxol from *Pestalotiopsis microspora* , an endophytic fungus of *Taxus wallachina*. **Microbiology**. 142 : 435-440.

Strobel, G. and Daisy, B. 2003. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. **Microbiology and Molecular Biology Review**. 67: 491 – 502.

Techa, W., Lumyong, S., Lumyong, P. and Hyde, K.D. 1999. **Isolation and collection of endophytic fungi from two species of palm in Doi SUTHEP Pui National Park**. International Conference on Asian Network on Microbial Research. Chiamg Mai, Thailand. p. 155.

Von Arx J.A. 1978. **The genera of fungi sporulation in pure culture**. AR Gantner Verlag KG (ed) FL-9490. Vaduz. Liechtenstein. 424 p.

Wagenaar, M.M. and Clardy, J. 2001. Dicerandrols, new antibiotic and cytotoxic dimers produced by the fungus *Phomopsis longicolla* isolated from an Endengered Mint. **Journal of Natural Product**. 64: 1006-1009.

Wang, J., Huang, Y., Fang, M., Zhang, Y., Zhang, Z., Zhao, Y. and Su, W. 2002. Brefeldin A, a cytotoxin produced by *Paecilomyces* sp. and *Aspergillus clavatus* isolated from *Taxus mairei* and *Torreya grandis*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. 34: 51-57.

Wang, F.W., Jiao, R.H., Cheng, A.B., Tan, S.H. and Song, Y.C. 2007. Antimicrobial potentials of endophytic fungi residing in *Quercus variabilis* and brefeldin A obtained from *Cladosporium* sp. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 23: 79-83.

Whalley, A.J.S. 1996. The Xylariaceous way of life. **Mycological Research**. 100: 897-922.

Yoshihito, S., Shimanuki, K., Hiramatsu, F., Koseki, T., Tetsuya, M., Fujisawa, N. and Kimura, K. 2008. Pyrrospirones A and B, apoptosis inducers in HL-60 cells, from an endophytic fungus, *Neonectria ramulariae* Wollenw KS-246. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. 23: 6050-6053.

Zhou, Z., Miwa, M. and Hogestsu, T. 1999. Analysis of genetic structure of *Suilus greviliei* population in a *Larix kaempferi* stand by polymorphism of inter simple sequence repeat (ISSR). **New Phytologist**. 144: 55-63.

Zou, W.X., Meng, J.C., Lu, H., Chen, G.X., Shi, G.X., Zhang, T.Y. and Tan, R.X. 2000. Metabolites of *Collectotrichum gloeosporiodes*, an endophytic fungus in *Artemisia annua*. **Journal of Natural Product**. 36:1529-1530.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรอาหาร สารเคมี และการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

1. PDA (Potato dextrose agar)

Potato	200.0	กรัม
Glucose	20.0	กรัม
Agar	20.0	กรัม
Water	1,000	มิลลิลิตร

ปรับ pH เป็น 7.0 นึ่งฆ่าเชื้อเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน

2. PDB (Potato dextrose agar)

Potato	200.0	กรัม
Glucose	20.0	กรัม
Water	1,000	มิลลิลิตร

ปรับ pH เป็น 7.0 นึ่งฆ่าเชื้อเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน

3. MEB (Malt Extract Broth)

Malt extract	2.0	กรัม
Peptone	1.0	กรัม
Glucose	20.0	กรัม
Water	1,000	มิลลิลิตร

ปรับ pH เป็น 6.8 – 7.0 นึ่งฆ่าเชื้อเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน

4. NA (Nutrient Agar)

Beef extract	1.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
NaCl	8.0	กรัม
Agar	18.0	กรัม
Water	1,000	มิลลิลิตร

ปรับ pH เป็น 6.8 – 7.0 นึ่งฆ่าเชื้อเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน

5. Sabouraud Broth

Bacto peptone	10.0	กรัม
Glucose	4.0	กรัม
Water	1,000	มิลลิลิตร

ปรับ pH เป็น 5.6 นึ่งฆ่าเชื้อเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน

6. 0.5 McFarland Standard

$BaCl_3$	0.048	M	ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร
H_2SO_4	0.36	M	ปริมาตร 99.5 มิลลิลิตร

อ่านค่าความดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร ให้อยู่ในช่วง 0.08 – 0.10

7. Vanillin solution

Vanillin	4.5	กรัม
95% ethanol	95	มิลลิลิตร
Sulfuric acid	0.5	มิลลิลิตร

ละลายให้เข้ากัน เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้องในขวดสีชา

ภาคผนวก ข
อาหาร สารเคมี และวิธีเตรียมที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์เกาะผิว

1. RPMI1640 (stock reagent)

อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ผงสำเร็จรูป	10.4	กรัม
โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต	2	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำปลอดประจุ ปริมาตร 800 มิลลิลิตร กวนให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้มีค่าประมาณ 6.9-7.4 ด้วย 1 N HCl ปรับให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองผ่านหัวกรองอาหารเลี้ยงเซลล์ปราศจากเชื้อขนาด 0.22 ไมโครเมตร ลงในขวดใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ปราศจากเชื้อขวดละ 90 มิลลิลิตร ปิดฝาและพันพาราฟิล์ม เก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI1640 ที่มี 10 % Fetal bovine serum (working medium)

อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 (stock reagent)	90	มิลลิลิตร
Fetal bovine serum	10	มิลลิลิตร
Gentamycin (100 mg/ml)	100	ไมโครลิตร

3. MTT solution

MTT	50	มิลลิกรัม
PBS (สำหรับทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เท่านั้น)	10	มิลลิลิตร

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

หมายเหตุ MTT เป็นสารก่อมะเร็ง ต้องสวมทุกมือก่อนชั่งหรือเตรียมสารทุกครั้ง

4. 1 X PBS ปริมาตร 1 ลิตร

NaCl	8	กรัม
KCl	0.2	กรัม
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	3.63	กรัม
KH_2PO_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

5. 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

ภาคผนวก ค
สารเคมี และวิธีการเตรียมที่ใช้ในเทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์

1. 1 M Tris-HCl (pH 8) ปริมาตร 1 ลิตร

Tris base	121	กรัม
น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร

ละลาย Tris base ให้เข้ากัน ปรับ pH ให้เท่ากับ 8 จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. 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

3. Washing buffer ปริมาตร 200 มิลลิลิตร

PVP (Polyvinylpyrrolidone)	2	กรัม
Ascorbic acid	1.76	กรัม
1 M Tris-HCl (pH 8.0)	20	มิลลิลิตร (ภาคผนวก ค หมายเลข 1)
2-mercaptoethanol	4	มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อจนได้ปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4. 2 X CTAB lysis buffer ปริมาตร 200 มิลลิลิตร

CTAB	4	กรัม
1 M Tris-HCl (pH 8.0)	20	มิลลิลิตร (ภาคผนวก ค หมายเลข 1)
0.5 M EDTA (pH 8.0)	8	มิลลิลิตร (ภาคผนวก ค หมายเลข 2)
NaCl	16.36	กรัม
2-mercaptoethanol	1	มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ จนได้ปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

5. Choloroform/isoamyl alcohol (24: 1 v/v) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร

Choloroform	192	มิลลิลิตร
Isoamyl alcohol	8	มิลลิลิตร

6. 20 % Polyethylene glycol 6000 (PEG) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร

Polyethylene glycol 600020	กรัม	
NaCl	14.61	กรัม

เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อจนได้ปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

7. Tris-EDTA buffer (TE buffer) ปริมาตร 1 ลิตร

1 M Tris-HCl (pH 8)	10	มิลลิลิตร (ภาคผนวก ค หมายเลข 1)
0.5 M EDTA (pH 8)	2	มิลลิลิตร (ภาคผนวก ค หมายเลข 2)

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรเป็น 1 ลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

8. Ethidium brom 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 มิลลิลิตร

Ethidium bromide	0.2	กรัม
น้ำกลั่น	20	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากันเก็บรักษาไว้ในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

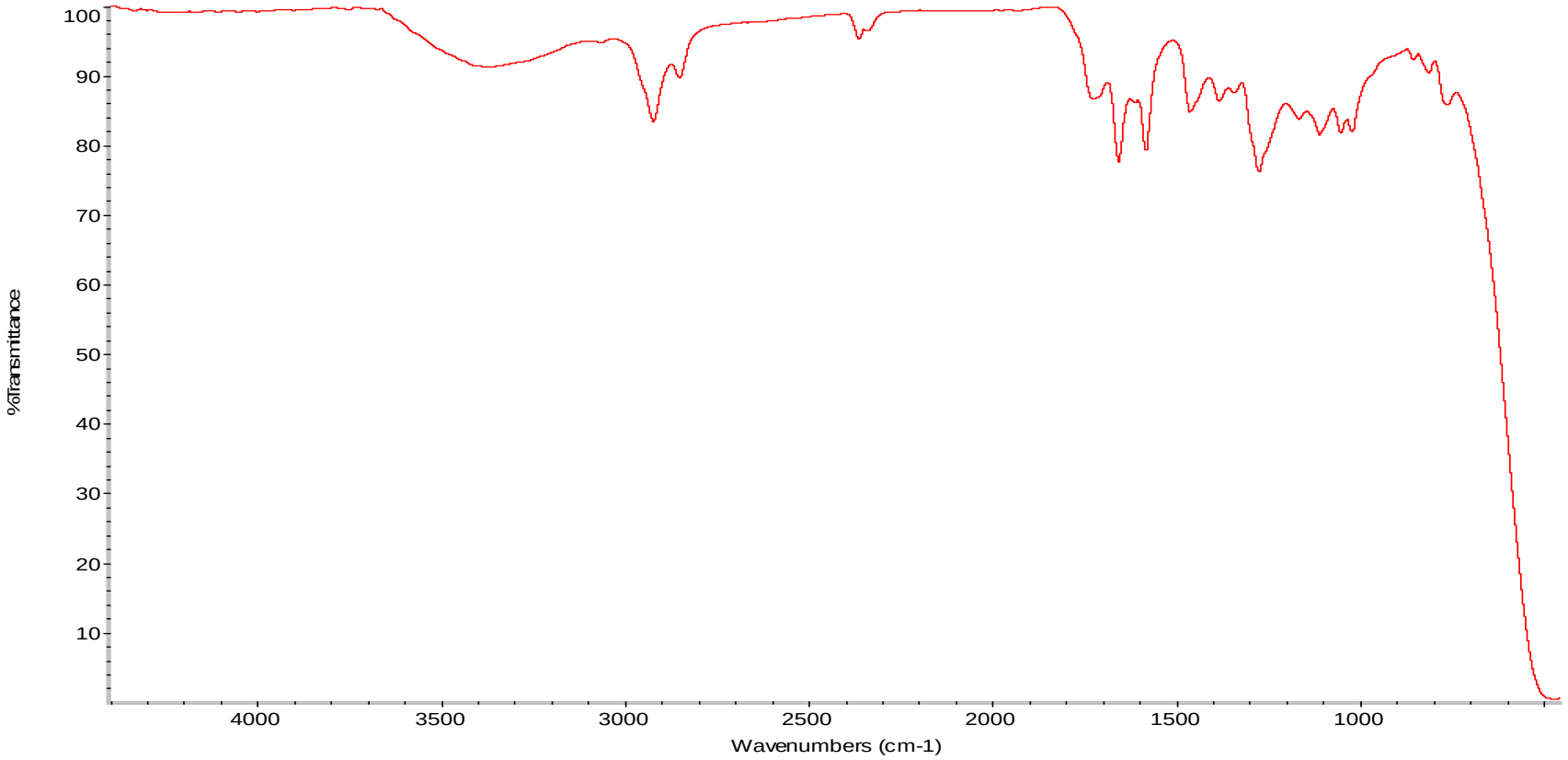
9. 1.5% Agarose gel (w/w)

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

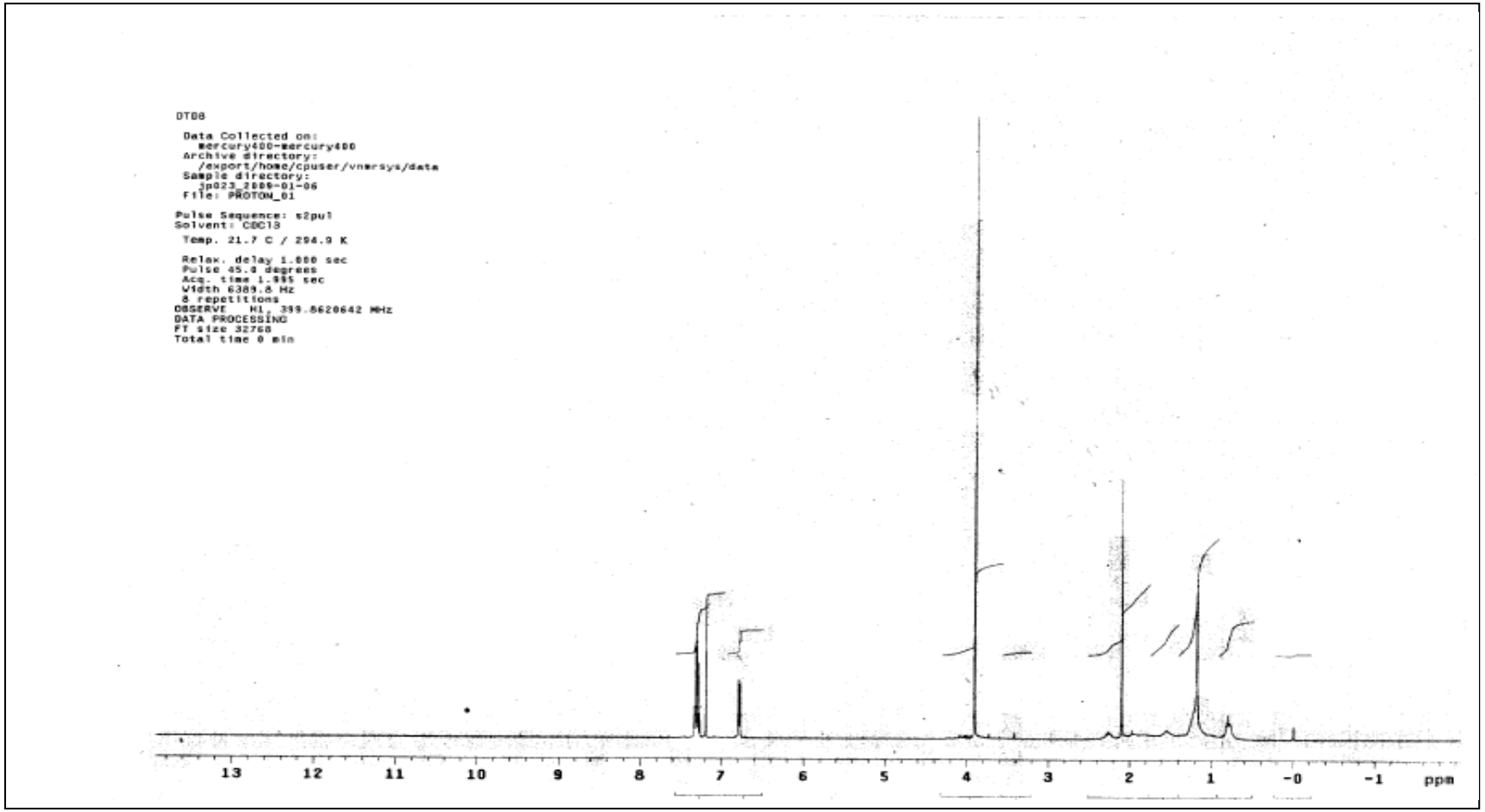
ผสมให้เข้ากันแล้วหลอมโดยใช้ความร้อนจนใสเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

ภาคผนวก ง

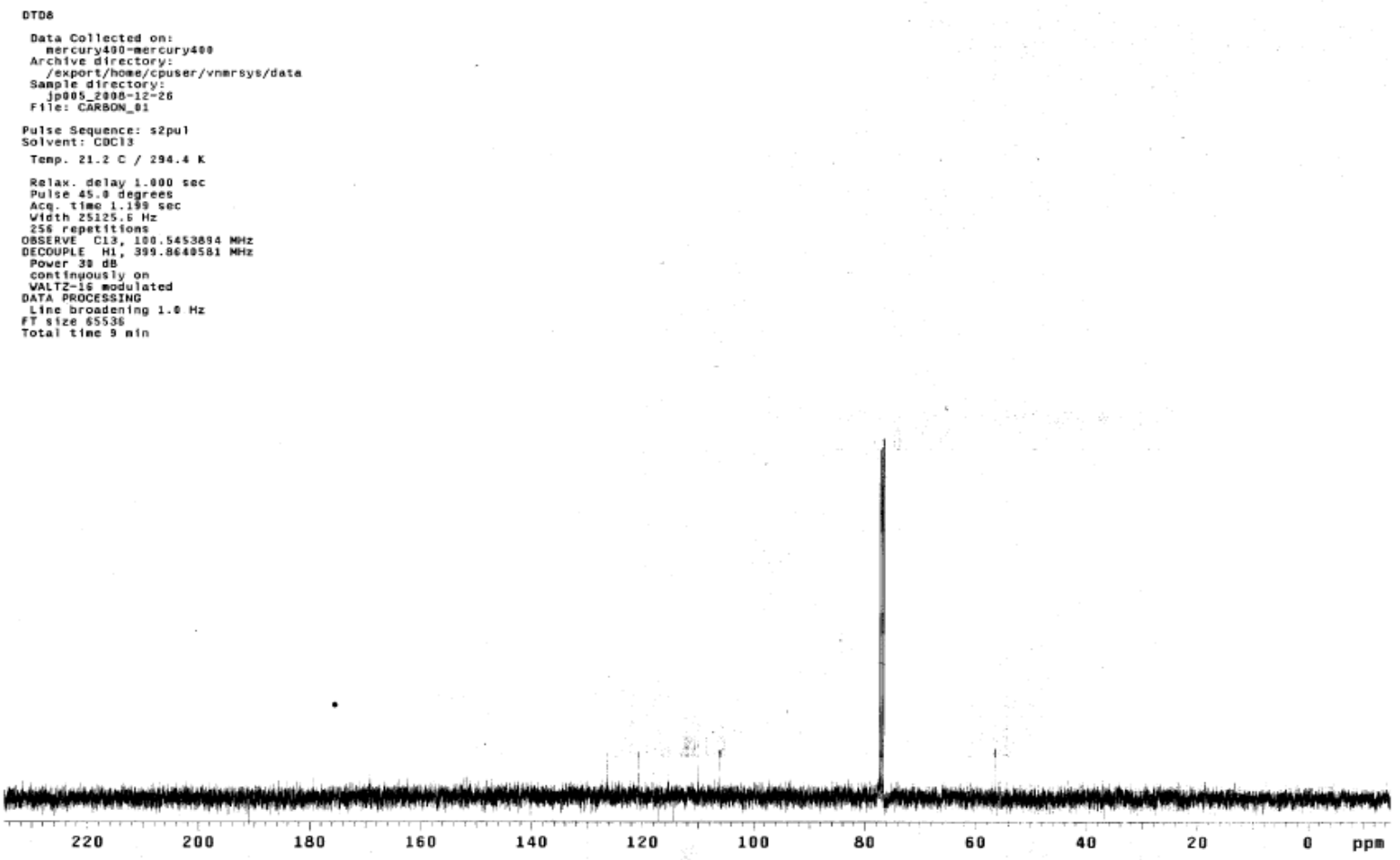
ข้อมูลสเปกโตรสโคปี



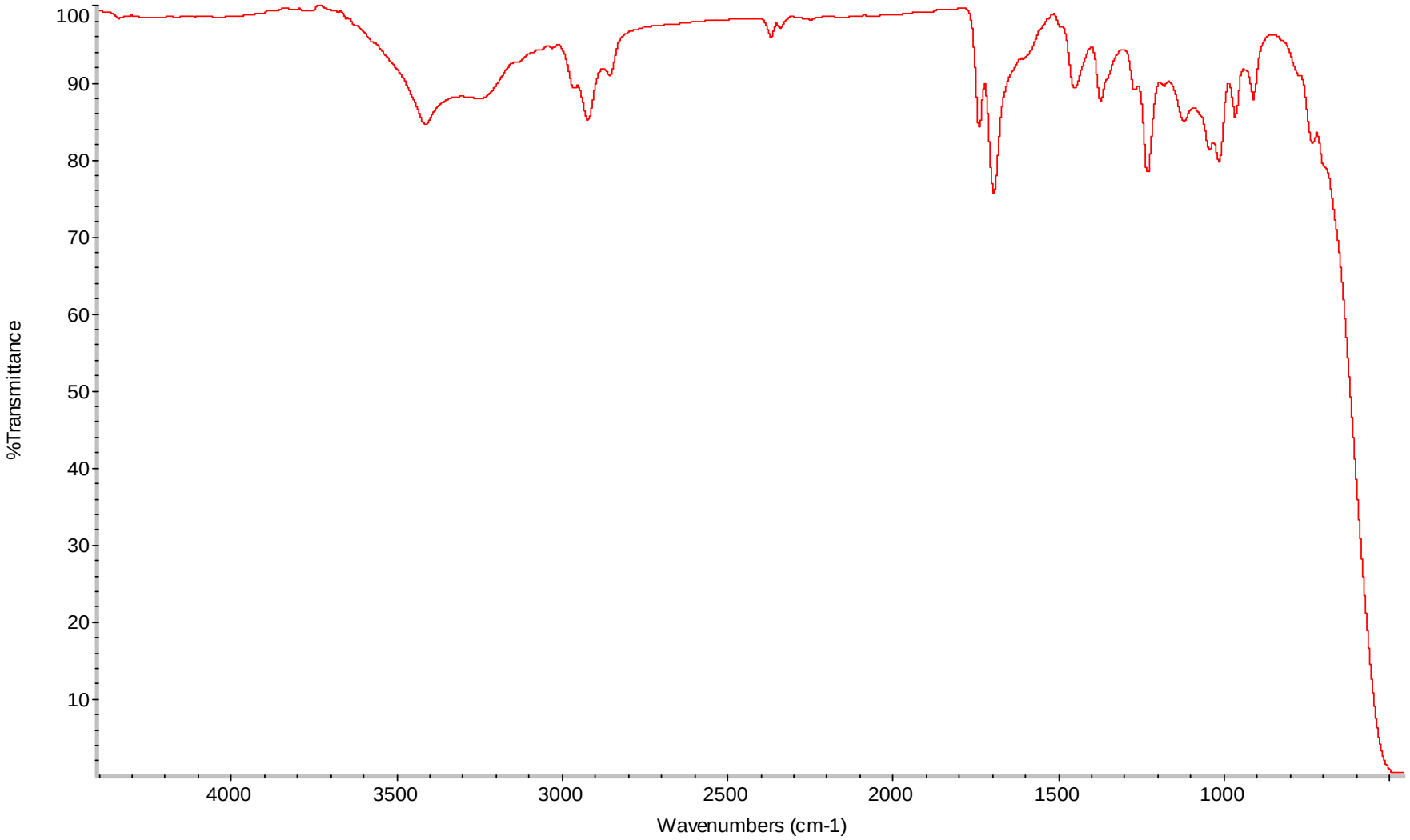
รูปที่ 1 IR สเปกตรัมของสารบริสุทธิ์ 1



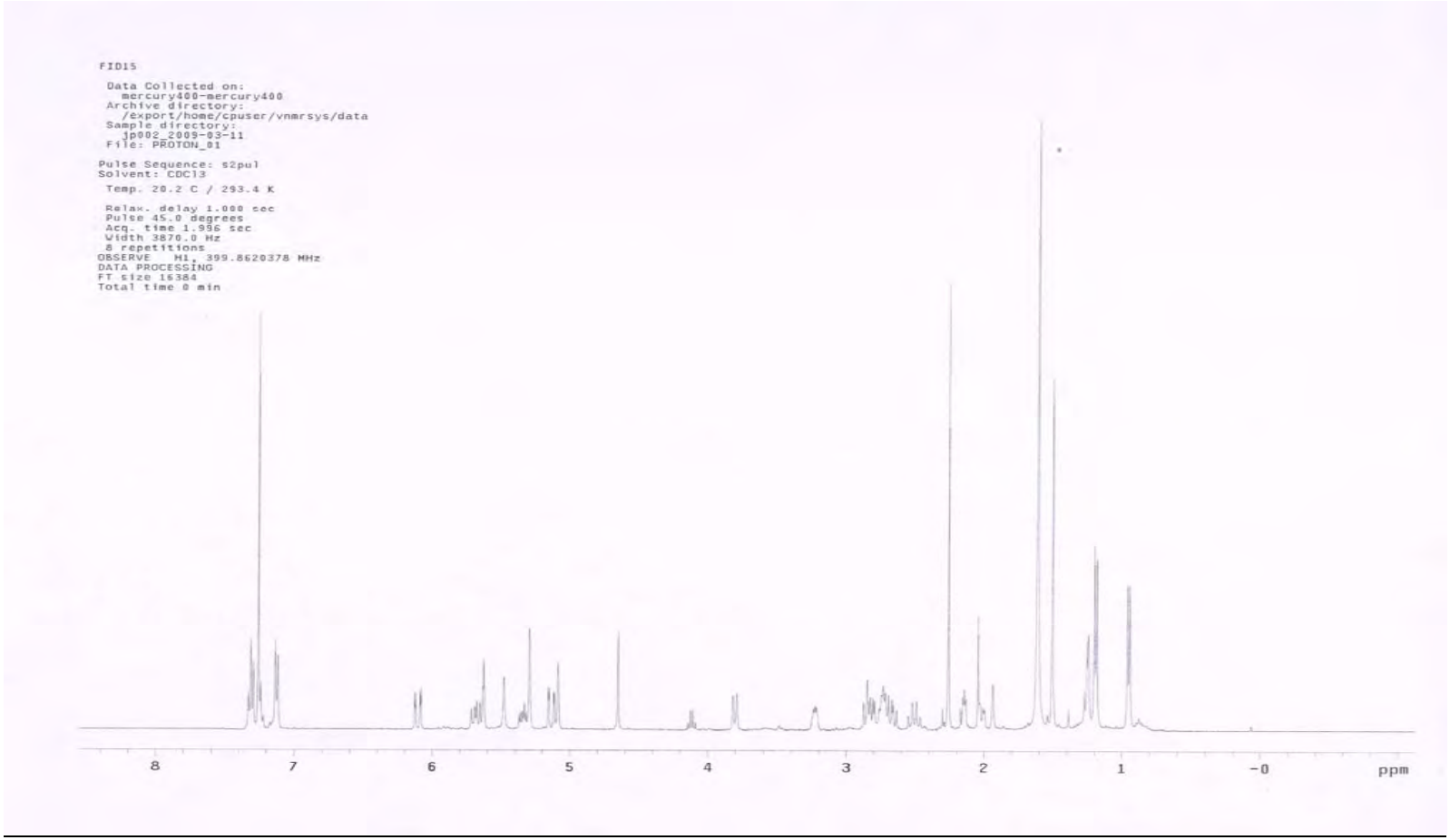
รูปที่ 2 ^{1}H- NMR สเปกตรัมของสารบริสุทธิ์ 1



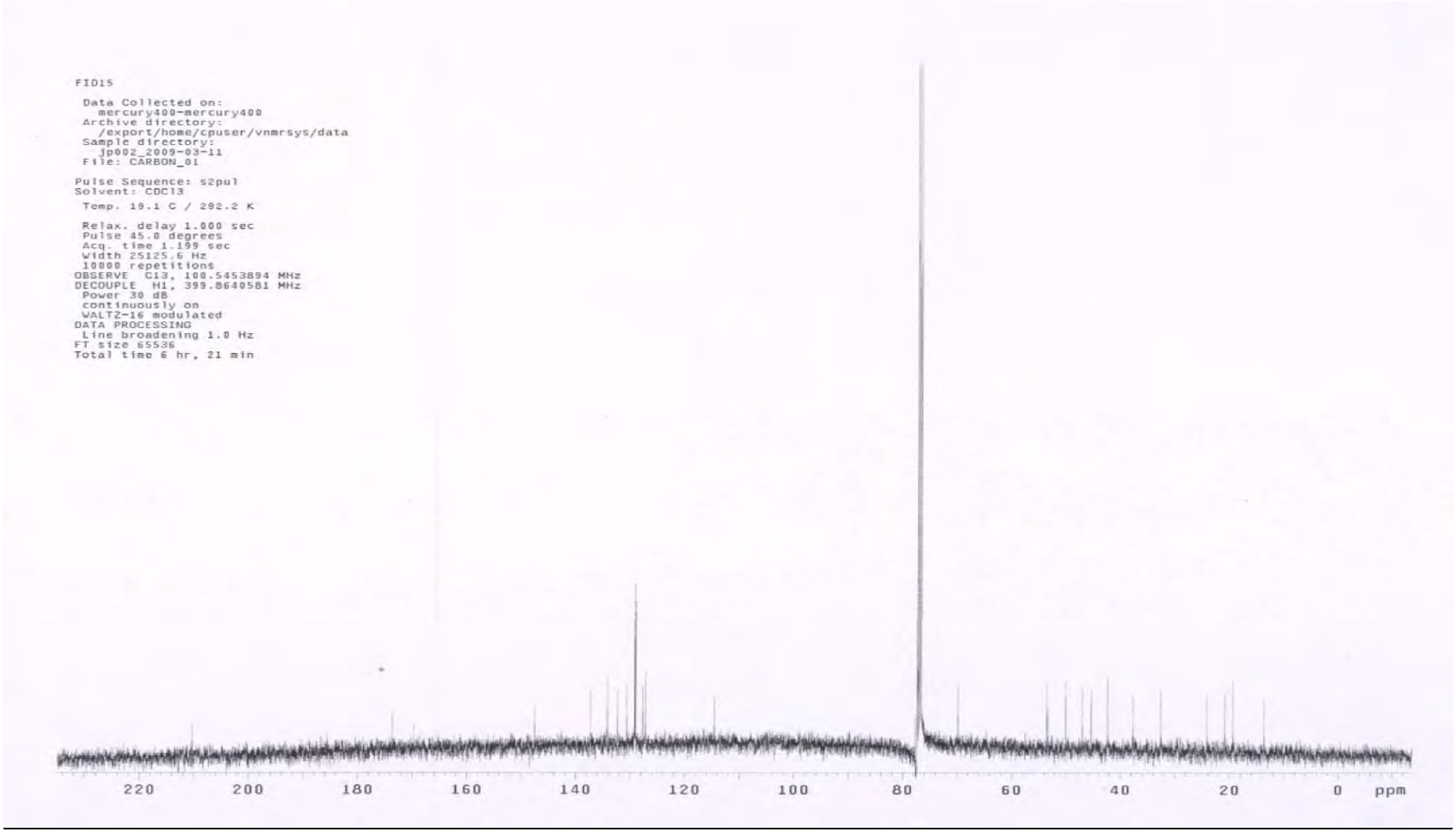
รูปที่ 3 ^{13}C- NMR สเปกตรัมของสารบริสุทธิ์ 1



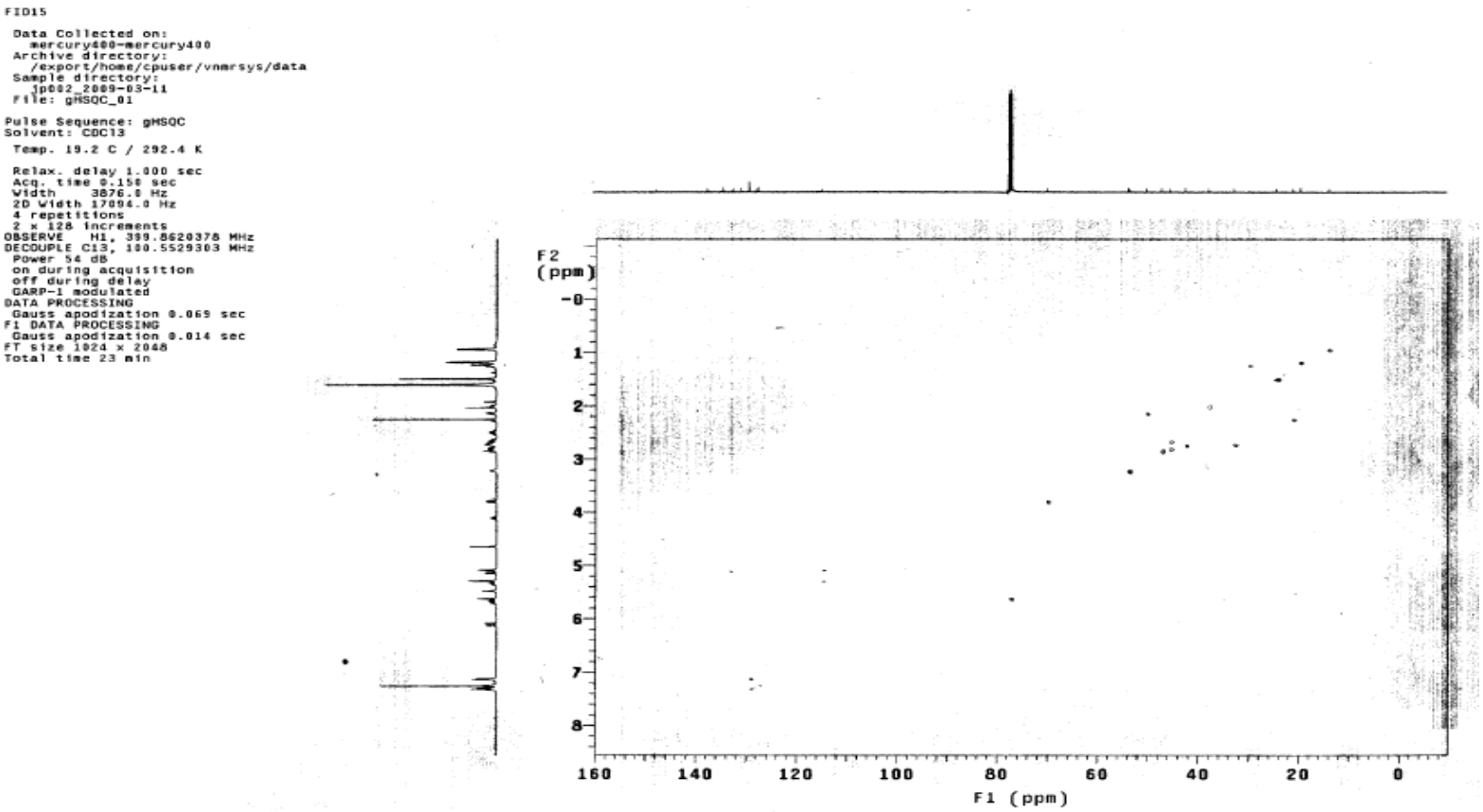
รูปที่ 4 IR สเปกตรัมของสารบริสุทธิ์ 2



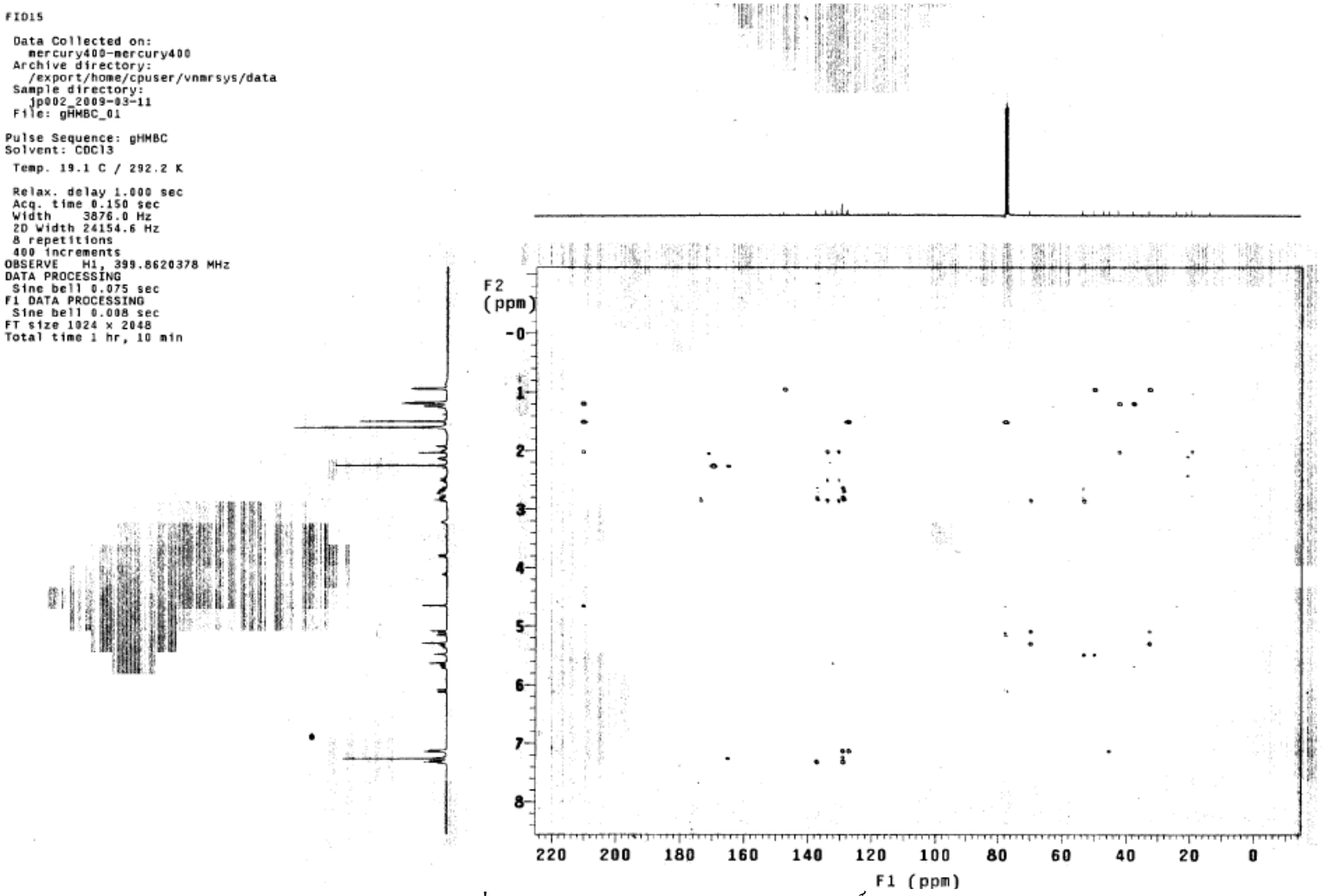
รูปที่ 5 ^{1}H- NMR สเปกตรัมของสารบริสุทธิ์ 2



รูปที่ 6 ^{13}C- NMR สเปกตรัมของสารบริสุทธิ์ 2

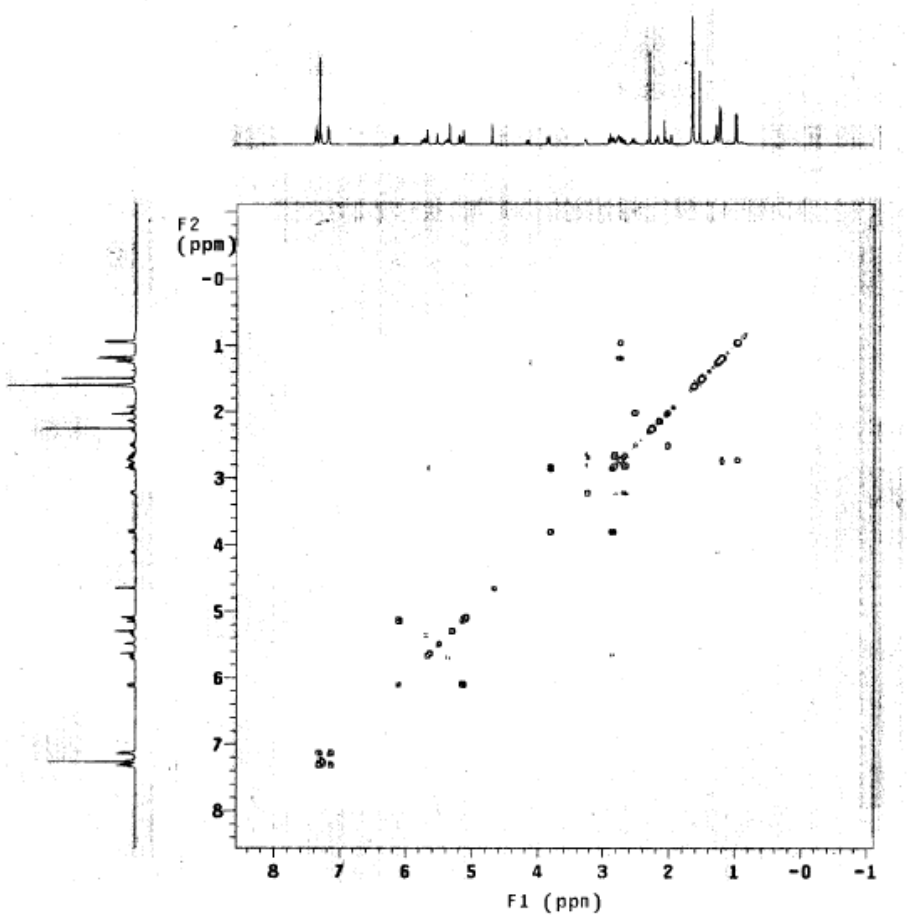


รูปที่ 7 HSQC สเปกตรัมของสารบริสุทธิ์ 2



รูปที่ 8 HMBC สเปกตรัมของสารบริสุทธิ์ 2

```
FID15

 Data Collected on:
   mercury400-mercury400
 Archive directory:
   /export/home/cpuser/vnmrsys/data
 Sample directory:
   jp002_2009-03-11
 File: gCOSY_01

Pulse Sequence: gCOSY
Solvent: CDCl3
 Temp. 19.1 C / 292.2 K

 Relax. delay 1.000 sec
 Acq. time 0.150 sec
 Width     3876.0 Hz
 2D Width 3876.0 Hz
 Single scan
 128 increments
OBSERVE   H1, 399.8620378 MHz
DATA PROCESSING
 Sq. sine bell 0.075 sec
F1 DATA PROCESSING
 Sq. sine bell 0.033 sec
FT size 1024 x 1024
Total time 3 min
```



รูปที่ 9 COSY สเปกตรัมของสารบริสุทธิ์ 2

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายธนวัช สุจริตวรกุล สำเร็จการศึกษาระดับชั้นมัธยมศึกษาจากโรงเรียนอัสสัมชัญ สำโรง จังหวัดสมุทรปราการ ปีการศึกษา 2543 สำหรับระดับอุดมศึกษาสำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี วิทยาศาตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ จากภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ปีการศึกษา 2547 และ ในปีการศึกษา 2549 ได้เข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ที่หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลงานทางวิชาการ

ธนวัช สุจริตวรกุล, ประกิตติ์สิน สีหนนทน์ และ โสภณ เริงสำราญ. 2551. ความหลากหลายทางชีวภาพของราเอนโดไฟต์ที่แยกจากใบพืชในป่าเต็งรัง อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน. การประชุมวิชาการระดับบัณฑิตศึกษาครั้งที่ 2 มหาวิทยาลัยศิลปากร. 576-584.

ธนวัช สุจริตวรกุล, ทรงจันทร์ ภู่ทอง ,ประกิตติ์สิน สีหนนทน์ และ โสภณ เริงสำราญ. 2552. ฤทธิ์ทางชีวภาพของราเอนโดไฟต์ที่แยกจากใบพืชในป่าเต็งรัง อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน. การประชุมวิชาการพฤกษศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 3 มหาวิทยาลัยมหิดล.