

ราเอนโดไฟต์จากไบปาล์ม *Arenga pinnata* (Wurmb) Merrill. และ
Borassodendron machadonis (Ridley) Becc.



นางสาวกฤษณา นุราช

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต


สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2552

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ENDOPHYTIC FUNGI FROM PALM LEAVES *Arenga pinnata* (Wurmb) Merrill. AND
Borassodendron machadonis (Ridley) Becc.



Miss Krissana Nurat

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

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2009

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

ราเอนโดไฟต์จากใบปาล์ม *Arenga pinnata*
(Wurmb) Merrill และ *Borassodendron*
machadonis (Ridley) Becc

โดย

นางสาวกฤษณา นุราช

สาขาวิชา

จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

รองศาสตราจารย์ ดร.ประภิตดีสิน สีนันทน์

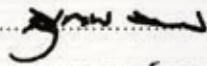
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้
เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต



.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

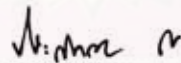
(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์



.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธานีวัน)



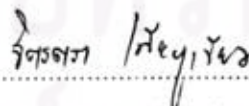
.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ ดร.ประภิตดีสิน สีนันทน์)



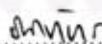
.....กรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร.โสภณ เริงสำราญ)



.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิตรตรา เพ็ญเขียว)



.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธนาภัทร ปาลกะ)

กฤษณา นุราช : ราเอนโดไฟต์จากใบปาล์ม *Arenga pinnata* (Wurmb) Merrill. และ *Borassodendron machadonis* (Ridley) Becc. (ENDOPHYTIC FUNGI FROM PALM LEAVES *Arenga pinnata* (Wurmb) Merrill. และ *Borassodendron machadonis* (Ridley) Becc. อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ.ดร.ประภคิต์สิน สีหนนทร์, 134 หน้า.

แยกราเอนโดไฟต์จากใบปาล์ม 2 ชนิด (*Arenga pinnata* (Wurmb) Merrill. และ *Borassodendron machadonis* (Ridley) Becc. จากอุทยานแห่งชาติเขานหลวง จังหวัด นครศรีธรรมราช ในช่วงฤดูแล้งและฤดูฝนของปี พ.ศ 2550 ได้ราเอนโดไฟต์จำนวน 516 ไอโซเลต ประกอบด้วย ราในสกุล *Xylaria* 363 ไอโซเลต และราสกุลอื่นได้แก่ *Collectotrichum* spp., *Pestalotiopsis* spp., *Phomopsis* spp., *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. 153 ไอโซเลต ราเอนโดไฟต์ *Xylaria* spp. พบในฤดูฝนมากกว่าฤดูแล้ง และ จัดจำแนกได้ 15 กลุ่ม โดยอาศัย ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และเมื่อนำสารสกัดของราเอนโดไฟต์มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในคน ได้แก่ *Bacillus cereus* *Staphylococcus aureus* *Escherichia coli* *Pseudomonas aeruginosa* และ *Candida albicans* และทดสอบความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้แก่ มะเร็งผิวหนัง(A375) มะเร็งกระเพาะอาหาร (KatolIII) มะเร็งลำไส้ (SW620) มะเร็งตับ (HepG2) มะเร็งเต้านม (BT474) มะเร็งปากมดลูก (Caski) มะเร็งเม็ดเลือดขาว(Jurkat) โดยวิธี MTT พบว่าสารสกัดจากรา *Xylaria* B316-1^R และ A116-2^R มีความสามารถสูงในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคที่ใช้ทดสอบทุกชนิด สารสกัดจากรา A317^R A518-2^R B115^R B127^R มีความจำเพาะสูงในการยับยั้งเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (Jurkat) *Xylaria* B419^R มีความจำเพาะในการยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านม (BT474) และสารสกัดจากราเอนโดไฟต์ในสกุล *Xylaria* sp. ชักนำให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวและเซลล์มะเร็งเต้านมเกิดการตายแบบอะพอพโทซิส (apoptosis)

ภาควิชา จุลชีววิทยา

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม

ปีการศึกษา 2552

ลายมือชื่อนิสิต.....*กฤษณา นุราช*
ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....*Dr. Prapatsin*

4872576923 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEYWORDS : ENDOPHYTE / PALMS LEAVES / BIOACTIVE COMPOUND

KRISSANA NURAT: ENDOPHYTIC FUNGI FROM PALM LEAVES *Arenga pinnata* (Wurmb) Merrill. AND *Borassodendron machadonis* (Ridley) Becc.

THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. PRAKITSIN SIHANONTH, 134 pp.

Endophytic fungi were isolated from two kinds of palm leaves (*Arenga pinnata* (Wurmb) Merrill and *Borassodendron machadonis* (Ridley) Becc from Kao Loung National Park at Nakorn Srithamarat Province during dry and wet season in 2008. Five hundred and sixteen endophytic fungi were isolated out of which three hundred and sixty three isolates were belonging to genus *Xylaria* and one hundred and fifty three isolates were belonging to other genera including *Collectotichum* spp., *Pestalotiopsis* spp., *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. *Xylariaceae* fungi were the most found species among the isolates. The occurrence of *Xylaria* spp. were higher in wet season than in dry season. They were further classified into 15 taxa group by using morphological characteristics. Crude extracts of *Xylaria* spp. were tested for antimicrobial activity against reference microorganisms which included *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Candida albicans*, by agar well diffusion test and anticancer human cell lines including A375 (malignant melanoma), Kat0III (gastric carcinoma), SW620 (colorectal adenocarcinoma), HepG2 (liver hepatoblastoma), BT474 (breast carcinoma), Caski (cervical carcinoma cells) and Jurkat (T cell leukemia) by MTT method. The results show that *Xylaria* strain B316-1^R and A116-2^R were exhibited the highest broad-spectrum to indicator microorganisms. *Xylaria* strain A 317^R A518-2^R B115^R B127^R showed specific anti T- cell leukemia cell line (Jurkat) while strain B419^R showed specific activity against breast cancer cell line (BT474). Most of these strains induced apoptosis as determined by Hoechst stain under a fluorescent microscope.

Department : Microbiology

Student's Signature *Krisana Nurat*

Field of Study : Industrial Microbiology

Advisor's Signature *Prakitsin Sihanonth*

Academic Year : 2009

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ประทีปดีลีน สีหนนทน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่เมตตาเอาใจใส่ตลอดระยะเวลาที่ผู้เขียนกำลังศึกษาอยู่ตลอดจนการให้คำแนะนำชี้แนะในการทำวิจัยครั้งนี้และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ Professor Anthony J S Whalley ที่ช่วยให้คำปรึกษา คำแนะนำ และความเมตตากับผู้เขียนด้วยดีเสมอมาตลอดระยะเวลาการทำงานวิจัยและการเขียนวิทยานิพนธ์เล่มนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิตรตรา เพ็ญเขียว คอยให้คำแนะนำช่วยเหลือและความเมตตาห่วงใยกับผู้เขียนด้วยดีเสมอมาตลอดระยะเวลาการศึกษา

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธนาภัทร ปาลกะ ที่ได้ให้คำแนะนำและความช่วยเหลือด้านการทดสอบฤทธิ์การต่อต้านเซลล์มะเร็ง

ขอขอบพระคุณคุณคณาจารย์ภาคจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ อบรมสั่งสอน และให้ความเมตตาเสมอมา

ขอขอบคุณพี่ๆ ห้องปฏิบัติการ 401 ที่ให้ความช่วยเหลือและให้คำแนะนำตลอดระยะเวลาที่ผู้เขียนกำลังศึกษา และน้อง ๆ ทุก ๆ คนที่เป็นกำลังใจให้ด้วยดีเสมอมา

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาคจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการเรียนและการทำวิจัยด้วยดีมาโดยตลอด

ขอขอบคุณเพื่อน ๆ พี่ ๆ น้อง ๆ ภาควิชาจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ร่วมเรียน ร่วมทำกิจกรรมด้วยกันมา ทั้งยังให้ความช่วยเหลือและให้คำปรึกษาในเรื่องต่าง ๆ

ท้ายสุดนี้ ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัวของข้าพเจ้าที่คอยให้ความรัก ความห่วงใย เป็นกำลังใจ และให้ความช่วยเหลือด้านต่าง ๆ ตลอดระยะเวลาที่ใช้ชีวิตในการศึกษาอยู่ในรั้วจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยและตลอดระยะเวลาการทำวิทยานิพนธ์และตลอดชีวิตของข้าพเจ้า

ขอขอบคุณทุกคนที่ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยความช่วยเหลือเป็นอย่างดี

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ณ
สารบัญรูป.....	ญ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 เอนโดไฟต์.....	4
2.2 ลักษณะทางชีววิทยาและนิเวศวิทยาของราเอนโดไฟต์.....	5
2.3 การแพร่กระจายของราเอนโดไฟต์.....	10
2.4 ความสัมพันธ์ของราเอนโดไฟต์และพืชเขตร้อน.....	11
2.5 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของราเอนโดไฟต์.....	18
2.6 ราเอนโดไฟต์ในพืชวงศ์ปาล์ม.....	21
3. วิธีดำเนินงานวิจัย.....	26
3.1 อุปกรณ์.....	26
3.2 สารเคมี.....	27
3.3 สำรวจและเก็บตัวอย่าง.....	29
3.4 แยกราเอนโดไฟต์ให้บริสุทธิ์.....	31
3.5 เก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์.....	31
3.6 ศึกษาความหลากหลายของราเอนโดไฟต์.....	32
3.7 การคัดเลือกราเอนโดไฟต์ที่มีความสามารถ ในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ.....	33
3.8 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญ กับการสร้างสารออกฤทธิ์ ทางชีวภาพของ ราเอนโดไฟต์ A116-1 ^R และ B316-2 ^R	40
3.9 การแยกและทำให้สารสกัดบริสุทธิ์เบื้องต้น.....	41

บทที่	หน้า
3.10 การพิสูจน์เอกลักษณ์สายพันธุ์ราเอนโดไฟต์.....	42
4. ผลการทดลอง.....	46
4.1 การแยกราเอนโดไฟต์จากใบปาล์ม.....	46
4.2 ความหลากหลายทางชีวภาพของราเอนโดไฟต์.....	48
4.3 ทดสอบความสามารถของสารสกัดในการออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์.....	52
4.4 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญ กับ การสร้างสารออกฤทธิ์ ยับยั้งจุลินทรีย์ของสายพันธุ์ A116-1 ^R และ B316-2 ^R	70
4.5 การแยกและทำให้สารปฏิชีวนะบริสุทธิ์เบื้องต้นด้วยวิธี TLC.....	76
4.6 การทดสอบราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง.....	77
4.7 การทดสอบการตายแบบอะพอพโทซิสเซลล์มะเร็งด้วยสารสกัดราเอนโดไฟต์ สายพันธุ์ A 317 ^R A518-2 ^R B115 ^R B127 ^R A119-1 ^R B419-1 ^R	92
4.8 การจำแนกสายพันธุ์ของราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ A116-1 ^R B316-2 ^R A 317 ^R A518-2 ^R B115 ^R B127 ^R B419-1 ^R โดยวิธีทางอนุพันธุวิทยา.....	95
5. วิจัยรณและสรุปผลการทดลอง.....	97
รายการอ้างอิง.....	105
ภาคผนวก ก.....	113
ภาคผนวก ข.....	118
ภาคผนวก ค.....	121
ภาคผนวก ง.....	131
ภาคผนวก จ.....	132
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	134

ศูนย์วิทยุทรัพยากร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ชนิดราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากพืชเขตร้อนชนิดต่างๆ.....	13
3.1	จำนวนจุลินทรีย์ทดสอบ (CFU/ml).....	35
3.2	ส่วนประกอบของสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR).....	44
4.1	จำนวนไอโซเลตของราเอนโดไฟต์จากใบปาล์มในฤดูแห้งและฤดูฝน.....	47
4.2	แสดงจำนวนอัตราการเกิดไอโซเลตและอัตราความถี่ของการเกิดโคโลนีราเอนโดไฟต์จากใบปาล์ม <i>A. pinnata</i>	50
4.3	แสดงจำนวนอัตราการเกิดไอโซเลตและอัตราความถี่ของการเกิดโคโลนีราเอนโดไฟต์จากใบปาล์ม <i>B. machadonis</i>	51
44	ความสามารถในการออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของสารสกัดจากราเอนโดไฟต์.....	53
4.5	จำนวนสายพันธุ์ราเอนโดไฟต์ที่คัดเลือกสำหรับใช้ทดสอบสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมีผลต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ.....	63
4.6	ความสามารถในการออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งของสารสกัดจากราเอนโดไฟต์.....	78
4.7	จำนวนสายพันธุ์ราเอนโดไฟต์ที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพยับยั้งเซลล์มะเร็ง.....	84
4.8	แสดงผลการออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวจากสารสกัดราเอนโดไฟต์.....	88
4.9	ผลการพิสูจน์สายพันธุ์ราเอนโดไฟต์กับฐานข้อมูลใน GenBank.....	96

ศูนย์วิทยทรัพยากร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	ความสัมพันธ์ของรา <i>Epichloe</i> กับพืชตระกูลหญ้า.....	7
2.2	แสดงการกระจายตัวในสภาพแวดล้อมของราเอนโดไฟต์ในแนวราบ.....	8
2.3	ความสัมพันธ์ของรา <i>Neotyphodium</i> spp. กับพืชตระกูลหญ้า.....	8
2.4	แสดงวงจรชีวิตราเอนโดไฟต์แพร่กระจายในสภาพแวดล้อมในแนวตั้ง.....	9
2.5	โครงสร้างทางเคมีของ phomopsin A (1) , B (2) และ C (3).....	19
2.6	โครงสร้างทางเคมีของ cytosporone B (4) C (5).....	19
2.6	โครงสร้างทางเคมีของ penicidones A-C (1-3).....	19
2.8	โครงสร้างทางเคมีของ pyrrospirones A-B.....	20
2.9	โครงสร้างทางเคมีของ Phomoeuphorbins A-D (1-4).....	20
2.10	โครงสร้างทางเคมีของ petalofisiols A-E.....	21
2.11	โครงสร้างทางเคมีของ pullularins A-D.....	21
2.12	แสดงลักษณะตัวอย่างต้นปาล์ม <i>Arenga pinnata</i> (Wurmb) Merrill.....	24
2.13	แสดงลักษณะตัวอย่างต้นปาล์ม <i>Borassodendron machadonis</i>	25
3.1	แสดงตำแหน่งและระยะห่างของต้นปาล์มที่ใช้คัดแยกราเอนโดไฟต์.....	29
3.2	แสดงบริเวณการตัดชิ้นส่วนของใบปาล์มเพื่อนำมาคัดแยก ราเอนโดไฟต์ในปาล์ม <i>A. pinnata</i>	30
3.3	แสดงบริเวณการตัดชิ้นส่วนของใบปาล์มเพื่อนำมาคัดแยก ราเอนโดไฟต์ในปาล์ม <i>B. machadonis</i>	30
4.1	แสดงลักษณะของโคโลนีและลักษณะสโตรมา ราเอนโดไฟต์ <i>Xylaria</i> สายพันธุ์ A116-1 ^R	69
4.2	แสดงลักษณะของโคโลนีและลักษณะสโตรมา ราเอนโดไฟต์ <i>Xylaria</i> สายพันธุ์ B316-1 ^R	70
4.3	กราฟแสดงการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของ ราเอนโดไฟต์ สายพันธุ์ A116-2 ^R ในอาหารน้ำสกัดจากใบปาล์ม.....	71
4.4	กราฟแสดงการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ ของราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ A116-2 ^R ในอาหาร Potato Dextrose Broth.....	72

ภาพที่		หน้า
4.5	กราฟแสดงการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ ของราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ A116-2 ^R ในอาหาร Malt Extract Broth.....	72
4.6	กราฟแสดงการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ ของราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ B316-1 ^R ในอาหารเหลวน้ำสกัดจากใบปาล์ม.....	73
4.7	กราฟแสดงการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ ของราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ B316-1 ^R ในอาหาร Potato Dextrose Broth.....	73
4.8	กราฟแสดงการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ ของราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ B316-1 ^R ในอาหาร Malt Extract Broth.....	74
4.9	กราฟแสดงการเจริญของราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ A116-2 ^R	74
4.10	กราฟแสดงการเจริญของราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ B316-1 ^R	75
4.11	แถบของสารสกัดจากราเอนโดไฟต์ A116-2 ^R และ B316-1 ^R บนแผ่น TLC.....	76
4.12	แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาราเอนโดไฟต์ <i>Xylaria</i> spp. สายพันธุ์ออกฤทธิ์ ยับยั้งเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว.....	90
4.13	แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาราเอนโดไฟต์ <i>Xylaria</i> spp. สายพันธุ์ออกฤทธิ์ ยับยั้งเซลล์มะเร็งเซลล์มะเร็งเต้านม.....	91
4.14	กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์อะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว.....	92
4.15	ผลของสารสกัดจากราเอนโดไฟต์ต่อการตายแบบอะพอพโทซิส ของเซลล์มะเร็ง Jurkat	93
4.16	กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์อะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็ง BT 474.....	94
4.17	ผลของสารสกัดจากราเอนโดไฟต์ต่อการตายแบบอะพอพโทซิส (Apoptosis) เซลล์มะเร็งเต้านม BT474.....	94

บทที่ 1

บทนำ

ราเอนโดไฟต์ (endophytic fungi) คือราที่อาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อพืชและพบได้ในทุกส่วนของพืช ซึ่งจะอาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชในระยะหนึ่งของวงจรชีวิตหรือทั้งหมดของวงจรชีวิตโดยที่ราเอนโดไฟต์จะไม่ก่อให้เกิดโรคใดๆแก่พืช (Petrini, 1991) สามารถพบได้ในพืชเกือบทุกกลุ่ม เช่น ในพืชจำพวกหญ้า (Clay, 1988) สาหร่าย (Cubit, 1974) ไม้ล้มลุก (Pereira และคณะ, 1999) และไม้ยืนต้น (Petrini และ Sutton, 1993; Fisher และคณะ, 1994; Rodrigues, 1994) ความสัมพันธ์ระหว่างราเอนโดไฟต์และพืชจะอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันละกัน (mutualism) (Lane และคณะ, 2000) โดยราจะได้รับสารอาหารและแหล่งที่อยู่อาศัยจากพืชในขณะเดียวกันพืชก็ได้รับประโยชน์จากสาร mycotoxin เอนไซม์ ฮอร์โมน และ วิตามิน ที่ราสร้างออกมา ซึ่งสาร mycotoxin และเอนไซม์ ช่วยในการปกป้องพืชให้ทนต่อการกัดแทะของแมลง สัตว์ และทนต่อการทำลายของเชื้อโรคต่างๆ (Petrini, 1991) ส่วนฮอร์โมน และวิตามินช่วยสนับสนุนให้พืชเจริญเติบโตได้ดีขึ้น (Varma และคณะ, 1999) ราเอนโดไฟต์ที่พบส่วนใหญ่สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือราเอนโดไฟต์ที่มีระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (teleomorphic endophyte) ซึ่งราในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่จัดจำแนกอยู่ในไฟลัม Ascomycota และกลุ่มราเอนโดไฟต์ที่มีพบการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศเท่านั้น (anamorphic endophyte) จึงจัดจำแนกอยู่ในกลุ่มรา fungi imperfecti (Huang และคณะ, 2000)

ราเอนโดไฟต์พบครั้งแรกในพืชตระกูลหญ้า (Breen, 1994) ได้แก่ *Neotyphodium coenophialum* *Neotyphodium lolii* ซึ่งเป็นระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ และ *Epichloe festuca* *Epichloe typhina* เป็นระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ พบได้ในหญ้าหลายชนิด เช่น tall fescue และ perennial ryegrass และพบว่ามีความสามารถในการสร้างสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ได้หลากหลาย เช่น สาร peramine ซึ่งเป็นสารกลุ่ม pyrrolopyrazine alkaloid ที่มีความเป็นพิษต่อแมลงแต่ไม่เป็นพิษต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Scharidl และ Phillips, 1997) นอกจากนี้มีรายงานว่าราเอนโดไฟต์ที่แยกได้ในป่าเขตร้อนหลายชนิดมีความสามารถสูงในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compound) ยับยั้งแบคทีเรียและรา เช่น *Gliocladium* sp. ซึ่งแยกได้จาก *Euoryphia cordifolia* สามารถผลิตสารระเหย (volatile compound) ออกฤทธิ์ในการยับยั้งทั้งแบคทีเรียและรา (Stinson และคณะ, 2003) Li และคณะ, (2000) พบราเอนโดไฟต์ *Pestalotiopsis* spp. และ *Monochaetia* sp. สามารถสร้างสาร Ambuic acid ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งราก่อโรคในพืชหลายชนิด ในปี ค.ศ. 1995 Stierle และคณะ

แยกแยะ *Taxomyces andreanae* จากพืช *Texus brevifolia* และ ในปี ค.ศ. 1996 Strobel และคณะ แยกแยะ *Pestalotiopsis microspora* ได้จากพืช *Texus wallichiana* สามารถสร้างสาร Paclitaxel ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม Taxol ออกฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง ปัจจุบัน

ได้มีผู้สนใจศึกษาแยกแยะราเอนโดไฟต์จากพืชอีกหลายชนิดซึ่งเป็นพืชที่พบในเขตอบอุ่นและพืชในเขตร้อน โดยศึกษาในแง่ของความหลากหลายทางชีวภาพและความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compound) และพบว่าพืชในป่าเขตร้อนมีความหลากหลายของจุลินทรีย์เอนโดไฟต์สูงมากมีจุลินทรีย์อีกหลายชนิดที่เป็นชนิดใหม่แต่ยังไม่สามารถจัดจำแนกได้ (Azevedo และคณะ, 2000) โดยเฉพาะในพืชวงศ์ปาล์มมีรายงานพบว่ามีหลากหลายของราเอนโดไฟต์สูงมากในปี ค.ศ. 1999 Frohlich และ Hyde แยกแยะราเอนโดไฟต์จากปาล์ม *Licuala ramsayi* ในออสเตรเลีย และ *Licuala* sp. ในบรูไน พบราเอนโดไฟต์ 75 ชนิด 48 สกุล ประกอบด้วยราในชั้น Hyphomycota Ceolomycota Ascomycota Basidiomycota และ Zygomycete Pinruan และ คณะ, (2004) รายงานการพบราชนิดใหม่ 3 ชนิด ที่แยกจากพืชวงศ์ปาล์มบริเวณป่าพรุในประเทศไทย เชื้อก่อโรคมะเร็งมีแนวโน้มจะดื้อยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการรักษาเพิ่มมากขึ้น เช่น *Mycobacterium tuberculosis* ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดวัณโรค เกิดการดื้อต่อยาเนื่องจากเชื้อจะไปปรับเปลี่ยน antibiotic target ทำให้ยาที่ใช้อยู่ไม่สามารถทำลายเชื้อได้ และอัตราการตายของคนทั่วโลกจากโรคมะเร็งมีอัตราสูงและมีแนวโน้มจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ดังนั้นการค้นหาแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพจากแหล่งใหม่ๆ จึงมีความจำเป็น และราเอนโดไฟต์คาดว่าจะเป็แหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ที่มีประสิทธิภาพ และแก้ปัญหาการดื้อยาของเชื้อโรคหรืออาจค้นพบสารชนิดใหม่ที่ประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง ประเทศไทยมีพื้นที่ตั้งอยู่ในบริเวณใกล้กับเส้นศูนย์สูตร ดังนั้นลักษณะพืชพันธุ์ธรรมชาติส่วนใหญ่จึงเป็นป่าดิบชื้น โดยเฉพาะทางภาคใต้ของประเทศ ทำให้เหมาะต่อการเจริญของพืชวงศ์ปาล์ม มีรายงานการศึกษาพบว่าปาล์มเป็นพืชที่มีความหลากหลายของราเอนโดไฟต์สูงมาก (Rodrigues และ Samules, 1990; Rodrigues, 1994) แต่มีการศึกษาน้อยมากในแง่ของความหลากหลาย และ ฤทธิ์ทางชีวภาพของราเอนโดไฟต์ที่อาศัยอยู่ในพืชวงศ์ปาล์มในประเทศไทย และ ยังไม่มีรายงานการศึกษาถึงสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของราเอนโดไฟต์ในพืชวงศ์ปาล์มทั้งในและต่างประเทศ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

ศึกษาความหลากหลายของราเอนโดไฟต์ของพืชวงศ์ปาล์ม และคัดเลือกหาราเอนโดไฟต์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ยับยั้งจุลินทรีย์ ยับยั้งเซลล์มะเร็ง

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบความหลากหลายและกลุ่มชนิดของราเอนโดไฟต์ที่อาศัยอยู่ในพืชวงศ์ปาล์มซึ่งกระจายตัวอยู่บริเวณป่าดิบชื้นทางภาคใต้ของประเทศไทยซึ่งจะเป็นองค์ความรู้พื้นฐานของการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของราเอนโดไฟต์ในป่าดิบชื้นบริเวณอื่นๆ และทราบถึงฤทธิ์ทางชีวภาพของราเอนโดไฟต์ที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ และ เซลล์มะเร็งซึ่งอาจเป็นประโยชน์ในการพัฒนาทางด้านเภสัชกรรมต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

1. สุ่มและเก็บตัวอย่างใบปาล์ม
2. แยกราเอนโดไฟต์ให้บริสุทธิ์ และเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์
3. ศึกษาความหลากหลายของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้
4. ทดสอบความสามารถของราเอนโดไฟต์ในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ยับยั้งจุลินทรีย์และสารยับยั้งเซลล์มะเร็ง
5. การแยกองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดโดยใช้โครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง (TLC)
6. พิสูจน์เอกลักษณ์ของราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยศึกษาลักษณะทางชีวโมเลกุล

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เอนโดไฟต์

เอนโดไฟต์ (entophytes) 'endo' มาจากรากศัพท์คำว่า 'endon' ในภาษากรีก มีความหมายว่า ข้างใน ส่วนคำว่า 'phyte' มาจากรากศัพท์คำว่า 'phyton' ซึ่งหมายถึง พืช ดังนั้นเอนโดไฟต์จึงหมายถึงกลุ่มสิ่งมีชีวิต ที่ระยะหนึ่งหรือทั้งหมดของวงจรชีวิตอาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อของพืชและไม่ก่อให้เกิดโรคกับพืชอาศัย (Petrini, 1991) ตัวอย่าง เช่น แบคทีเรีย (Kobayashi และ Palumbo, 2000) แอคติโนมัยซีต ยีสต์ รา (Stone และคณะ, 2000) สาหร่าย (Peter, 1991) และรวมถึงแมลง (Feller, 1995) อาศัยอยู่ในทุกส่วนของพืช ในขณะที่อีพิไฟต์ (epiphyte) คือ กลุ่มสิ่งมีชีวิตที่เจริญอยู่เฉพาะบนผิวนอกของเนื้อเยื่อพืชเท่านั้น และมักก่อให้เกิดโรคกับพืช ส่วนราที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชจะเรียกว่า ราเอนโดไฟต์ (endophytic fungi) ซึ่งจะอาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชที่มีชีวิตพบอาศัยอยู่บริเวณช่องว่างระหว่างเซลล์และภายในเซลล์ของพืช ในส่วน ใบ ก้านใบ เนื้อไม้ กิ่ง และในรากของพืชชั้นสูง (Kumar และ Hyde, 2004; Stone และคณะ, 2000; Suryanarayanan; vijakrishna, 2001) และเป็นสาเหตุของอาการติดเชื้อที่ไม่แสดงอาการของโรคพืช ทั้งนี้ไม่รวม ไมคอร์ไรซา แต่รวมราที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชในระยะเวลายาวนานก่อนก่อให้เกิดโรคในพืชอาศัย

ราเอนโดไฟต์ (entophytes fungi) พบอาศัยอยู่ร่วมกันกับพืช และมีความสัมพันธ์การอยู่ร่วมกันกับพืชหลายรูปแบบ เช่น แบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกัน (mutualism) (Chanway, 1996; Adhikari และคณะ, 2001; Bai และคณะ, 2002) แบบอิงอาศัย (commensalisms) (Sturz และ Nowak, 2000) หรือแม้กระทั่งแอบแฝงอยู่ในพืชเมื่อพืชเกิดภาวะอ่อนแอก็จะกลายเป็นเชื้อก่อโรคพืช (latent pathogen) (Romero และคณะ, 2001) ซึ่งลักษณะของความสัมพันธ์ที่แสดงออกให้เห็นขึ้นอยู่กับ 4 ปัจจัยสำคัญ คือ (Schulz และ Boyle, 2006)

1. ลักษณะทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต 2 ชนิด คือระหว่างพืชและรา
2. ระยะของการเจริญของพืชและรา
3. สภาพของสารอาหาร
4. ปัจจัยทางสภาวะแวดล้อม ทั้งทางด้านกายภาพ และชีวภาพ

ซึ่งโดยทั่วไปการอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัยจะไม่ทำให้เกิดโรคในพืช

2.2 ลักษณะทางชีววิทยาและนิเวศวิทยาราเอนโดไฟต์

ราที่สามารถพบได้ทั่วไปหลายชนิดถูกรายงานว่าเป็นราเอนโดไฟต์ทั้งที่พบว่าช่วงชีวิตหนึ่งเป็นเชื้อก่อโรคในพืช ซึ่งราเอนโดไฟต์ดังกล่าวพบอาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชแต่จะไม่แสดงอาการของโรคให้เห็น แต่เมื่อพืชเกิดสภาวะอ่อนแอและเกิดความเครียดจากปัจจัยต่าง ๆ ทั้งทางกายภาพและชีวภาพ เช่น การขาดน้ำ ขาดสารอาหาร ราที่อาศัยอยู่ในพืชก็จะกลับกลายเป็นราที่ก่อให้เกิดโรคในพืช ซึ่งลักษณะการดำรงชีวิตของราเอนโดไฟต์ไม่มีกฎเกณฑ์ตายตัวในการอาศัยอยู่ร่วมกับพืชอาศัย เช่น อาจก่อให้เกิดโรคกับพืชหรือไม่ก็ได้ หรืออิงอาศัยอยู่กับพืช ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสภาพความแข็งแรงของพืช ดังนั้นร่าก่อโรคในพืชที่พบเจอได้ในสภาวะแวดล้อมโดยทั่วไป จึงเป็นราที่พบได้ในเนื้อเยื่อของพืชแต่จะไม่ปรากฏอาการของโรคพืชให้เห็น หรืออาจจะเป็นราแอบแฝงอยู่ในพืชและก่อให้เกิดโรคพืชในภายหลัง (Stone และคณะ, 2000) ซึ่งความแตกต่างที่เห็นได้ชัดเจนระหว่างราที่แอบแฝงอยู่ในพืชและก่อโรคราภายหลังกับราเอนโดไฟต์ คือ ความจำเพาะระหว่างชนิดของรากับชนิดของพืชที่มีส่งเสริมซึ่งกันและกันทางพันธุกรรม ซึ่งการจำเพาะกันในระดับของยีนมักก่อให้เกิดโรครุนแรง ส่วนราเอนโดไฟต์จะไม่ก่อให้เกิดโรคกับพืชเมื่ออาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืช (Fisher และ Petrini, 1992) ดังนั้นจนถึงปัจจุบันนี้ยังคงไม่ทราบเหตุผลที่แน่ชัดของความหลากหลายของราอิงอาศัยหรือราที่อาศัยอยู่ร่วมกับพืชแบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกัน และรูปแบบการอยู่ร่วมกันที่แน่นอนระหว่างรากับพืชเมื่ออาศัยอยู่ด้วยกัน แต่ในส่วนของราเอนโดไฟต์จะมีลักษณะพิเศษเฉพาะ คือ จะมีระยะการเจริญภายในพืชแต่ไม่แสดงอาการของโรคให้เห็น และสามารถอยู่ร่วมกับพืชได้หลากหลายรูปแบบ เช่น แบบอิงอาศัย ผู้ย่อยสลาย แอบแฝงก่อให้เกิดโรคหรืออยู่ร่วมกับพืชแบบปกป้องพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกัน (protective mutualism)

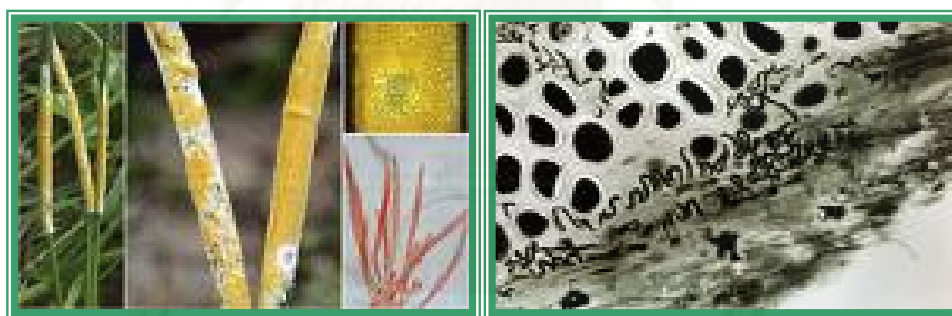
ราเอนโดไฟต์อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชเกือบทุกชนิดและพบอาศัยอยู่ทุกหนทุกแห่งทั้งในพืชเขตอบอุ่น (Scott, 2001) เขตร้อน (Rodrigues, 1996; Penna, 2000) หรือแม้แต่พืชที่อาศัยอยู่ในทะเลทราย (Bill, 1994) นอกจากนี้พบว่าราและพืชส่วนใหญ่มีความสัมพันธ์ในการอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกัน ซึ่งความสัมพันธ์ดังกล่าวอาจเกิดขึ้นตั้งแต่พืชเริ่มเกิดขึ้นบนพื้นดิน หรือบางทีราเอนโดไฟต์และพืชอาจมีการใช้ชีวิตและมีความเป็นมาร่วมกันอย่างใกล้ชิด จนถึงปัจจุบันนี้ ความสำคัญของการอยู่ร่วมกันของราเอนโดไฟต์และพืชยังคงอยู่นอกเหนือความเข้าใจเกี่ยวกับประโยชน์และคุณค่าของการอาศัยอยู่ของราเอนโดไฟต์ภายในเนื้อเยื่อพืช แต่มีการสันนิษฐานว่าราเอนโดไฟต์มีวิวัฒนาการมาจากร่าก่อโรคในพืชซึ่งมีช่วงชีวิตของการแอบแฝงอยู่ภายในพืชยาวนานมากจึงทำให้ความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรคกับพืชลดลง (Kuldau และคณะ, 1997) และด้วยลักษณะการอาศัยอยู่ภายในพืชของราเอนโดไฟต์ที่ไม่แสดงอาการของโรคให้เห็นแสดงให้เห็นว่าพืชเป็นตัวกลางในการควบคุมความสัมพันธ์การแข่งขันระหว่างกันของการเกิดโคโลนีของรา

เอนโดไฟต์ที่อาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อพืช ซึ่งเป็นรูปแบบทั่วไปทางวิวัฒนาการของราก่อโรค (Redman และคณะ, 2001) เกือบทั้งหมดของราเอนโดไฟต์ที่อาศัยอยู่ในไม้ยืนต้นมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับราก่อโรคในพืชและมีความสัมพันธ์แบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกัน (Sieber, 2007) ดังนั้นถ้าราเอนโดไฟต์และไม้ยืนต้นมีความสัมพันธ์คล้ายคลึงกับไมคอร์ไรซา (mycorrhiza) ไลเคน (lichen) และราในกลุ่ม clavicipitaceus ในพืชตระกูลหญ้า ดังนั้นราเอนโดไฟต์อาจไปมีผลทำให้พืชทนต่อสภาวะความเครียดต่าง ๆ ที่เกิดจากทางกายภาพและชีวภาพ (Clay, 1991; Rygielwicz และคณะ, 1994) ถ้าเป็นเช่นนั้นจริงราเอนโดไฟต์จึงเป็นเหมือนตัวช่วยในการขับเคลื่อนให้เกิดวิวัฒนาการของพืช (Kuldau และคณะ, 1997) เช่น ตัวอย่างจากการศึกษาหน้าที่ของราเอนโดไฟต์ในการส่งเสริมกลไกทางชีวภาพของพืช พบราเอนโดไฟต์บางชนิดเมื่ออาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชจะช่วยลดผลกระทบที่เกิดขึ้นกับพืชทั้งทางตรงและทางอ้อม เช่น ราเอนโดไฟต์ *Curvularia* sp. เมื่ออาศัยอยู่ในพืชบางชนิดที่ขึ้นอยู่บริเวณภูเขาไฟทำให้พืชชนิดนั้นสามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้ในดินที่มีอุณหภูมิสูงถึง 50 องศาเซลเซียส (Redman และคณะ, 2002) ราเอนโดไฟต์บางชนิดเมื่ออาศัยอยู่ร่วมกันกับพืชจะช่วยส่งเสริมเกี่ยวกับการดูดซับสารอาหารของพืชทำให้พืชสามารถทนทานต่อสภาวะแห้งแล้ง โดยราพยายามดูดซับสารอาหารเอาไว้และปลดปล่อยออกมาให้แก่พืชทีละน้อย แต่ยิ่งไปกว่านั้นคือมีผลในการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของใบพืชซึ่งจะเป็นการช่วยช่วยลดการคายน้ำของพืช และหากมีภาวะกดดันจากโลหะหนัก ราเอนโดไฟต์ก็ยังสามารถปกป้องพืชโดยจำกัดปริมาณการขนส่งโลหะหนักของพืชและจะเก็บสะสมโลหะหนักไว้ภายในเนื้อเยื่อของพืช (Ligrone และคณะ, 1993) นอกจากนี้ราเอนโดไฟต์ยังช่วยส่งเสริมให้เกิดการเจริญเติบโตในพืช โดยการสร้างฮอร์โมน และเอนไซม์ (Ernst และคณะ, 2003) ซึ่งพบในพืชตระกูลหญ้า (Latch และคณะ, 1985 ; Clay, 1987) และไม้ล้มลุก ราเอนโดไฟต์บางชนิดยังสามารถสร้างสารกลุ่มอัลคาลอยด์ ซึ่งเป็นพิษต่อแมลงจึงช่วยปกป้องพืชจากการกัดแทะของแมลงและสัตว์กินพืช (Scharidl และ Phillips, 1997) ในไม้ยืนต้นก็เช่นเดียวกับราเอนโดไฟต์อาจมีหน้าที่เฉพาะในการปกป้องพืชจากเชื้อก่อโรคเช่นเดียวกับในพืชตระกูลหญ้า (Miller และคณะ, 2002) แต่ทั้งนี้ขอบเขตและหน้าที่ของราเอนโดไฟต์ในไม้ยืนต้นยังไม่ทราบแน่ชัด แต่มีการตั้งข้อสันนิษฐานว่าอาจขึ้นอยู่กับความหลากหลายของชนิดของราและพืชในบริเวณนั้นๆ ในทางนิเวศวิทยาแบ่งราเอนโดไฟต์ได้เป็น 2 กลุ่ม ดังนี้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2.1 Clavicipitaceous grass endophyte

Clavicipitaceous grass endophyte คือ ราเอนโดไฟต์ที่อาศัยอยู่ในหญ้าซึ่งเป็นราในวงศ์ Clavicipitaceae การค้นพบราเอนโดไฟต์ในกลุ่มนี้ เริ่มจากการพบราในเมล็ดหญ้า *Lolium tumulentum* L. โดย Vogl ในปี ค.ศ.1989 ซึ่งหญ้าชนิดนี้เป็นวัชพืชที่เจริญในแปลงเพาะปลูก นับจากนั้นจึงมีรายงานการศึกษาทำให้ทราบว่าราในกลุ่มนี้มีแหล่งอาศัยอยู่ในพืชตระกูลหญ้าอีกหลายชนิด ได้แก่ หญ้าตระกูล Poaceae เช่น หญ้าแห้วหมู (Sedge) หญ้าตระกูล Cyperaceae และหญ้าตระกูล Juncaceae ที่เป็นสกุล (genus) ที่สำคัญ ราเอนโดไฟต์ในกลุ่ม Clavicipitaceous ที่สำคัญ คือ *Epiclhoe* spp. มีการศึกษามากมายเกี่ยวกับความสัมพันธ์ของ *Epichloe* sp. กับพืชตระกูลหญ้า พบว่ามีความสัมพันธ์แบบต่างฝ่ายต่างได้ประโยชน์ (symbiotic) กับพืชตระกูลหญ้า มีระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (teleomorph) แสดงดังภาพที่ 2.1 ซึ่งราอาศัยอยู่ในทุกส่วนของต้นพืชยกเว้นดอก (vegetative phases) และแสดงให้เห็นลักษณะการสร้างแอสโคสปอร์ (ascospore) บริเวณที่ว่างระหว่างปล้องของใบ ปลอกใบ และตาของพืชในระยะ vegetative phases (Scott , 2001) การแพร่กระจายของแอสโคสปอร์ในระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (teleomorphic) ของ *Epichloe* ในสิ่งแวดล้อมเป็นแบบแนวราบ (horizontal transmission) (Saikkonen และคณะ, 2004) แสดงดังภาพที่ 2.2



a

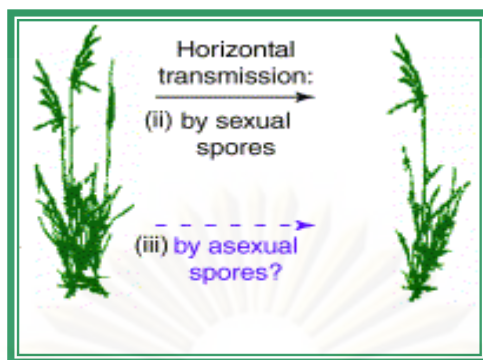
b

รูปที่ 2.1 (a) แสดงราเอนโดไฟต์ *Epichloe* sp. ระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ

jlicheye.free.fr/.../ascomycetes/Ascomycetes.htm

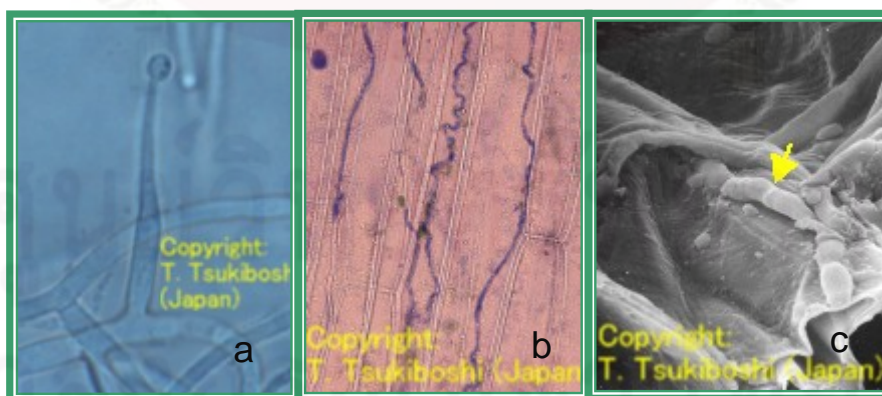
(b) แสดงเส้นใยราเอนโดไฟต์ *Epichloe* sp. ในเนื้อเยื่อหญ้า tall fescue

www.bsu.edu/classes/ruch/msa/porter.html



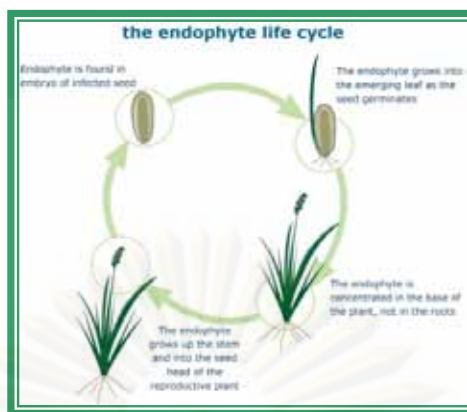
รูปที่ 2.2 แสดง การกระจายตัวในสภาพแวดล้อมของราเอนโดไฟต์โดยอาศัยการสร้างสปอร์ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ (Saikkonen และคณะ, 2004)

Neotyphodium spp. เป็นราที่พบว่ามีระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (anamorphic) ที่มีลักษณะ แสดงดังภาพที่ 2.3 โดยมีรูปแบบการอยู่ร่วมกันกับหญ้าแบบพึ่งพาอาศัยกัน แต่ไม่ปรากฏลักษณะของโครงสร้างราที่ปรากฏให้เห็นภายนอกต้นพืช ซึ่งแตกต่างกับ *Epichloe* sp. ที่มีระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ ในปี ค.ศ.1998 Newsham และคณะ ศึกษาสาเหตุการเจริญลดลงของหญ้าตระกูล *Lolium perenne* ภายใต้แสงยูวี (UV-B) พบมีราเอนโดไฟต์ *Neotyphodium* spp. อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อซึ่งเป็นสาเหตุทำให้หญ้ามีการเจริญเติบโตลดลง และจากการศึกษาพบว่าราเอนโดไฟต์ *Neotyphodium* spp. มีการแพร่กระจายในสิ่งแวดล้อมในแนวตั้ง (vertical transmission) แสดงดังภาพที่ 2.4 โดยราจะอาศัยอยู่ในเมล็ดของหญ้าเมื่อเมล็ดหญ้าเจริญเป็นหญ้าต้นใหม่รากก็จะเจริญพร้อมกับการงอกของเมล็ดหญ้าแพร่ไปอยู่ตามส่วนต่างๆ ของต้นพืช



www.niaes.affrc.go.jp/.../eng/z37e-Neo-endo.html

รูปที่ 2.3 (a) Conidium (b) เส้นใยรา *Neotyphodium* sp. อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อใบของหญ้า (c) ลักษณะเส้นใยรา *Neotyphodium* sp. อาศัยอยู่ในเซลล์ของใบหญ้า



www.grasslanz.com/content/endophytes.htm

รูปที่ 2.4 แสดงวงจรชีวิตราเอนโดไฟต์แพร่กระจายในสภาพแวดล้อมในแนวตั้ง โดยราอาศัยอยู่ในเมล็ดของพืชตระกูลหญ้าและจะเจริญพร้อมกับการงอกของเมล็ด เมื่อเมล็ดพืชงอกเป็นต้นหญ้าราจะเจริญอยู่ทุกส่วนของต้นหญ้า ยกเว้นส่วนของราก

2.1.2. Non-Clavicipitaceous grass endophyte

Non-Clavicipitaceous grass endophyte คือ ราเอนโดไฟต์ที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อไม้ยืนต้นหรือไม้พุ่ม แต่ไม่พบว่าอาศัยอยู่ในพืชตระกูลหญ้าหรือเป็นกลุ่มราที่ไม่ได้อยู่ในวงศ์ Clavicipitaceae ราเอนโดไฟต์ในพืชตระกูลหญ้าเป็นที่รู้จักกันมานานกว่า 70 ปี แล้วแต่การศึกษาราเอนโดไฟต์ในไม้ยืนต้นและไม้พุ่มเพิ่งเริ่มศึกษาและให้ความสนใจอย่างจริงจังเมื่อประมาณ 20 ปี ที่ผ่านมา โดยเริ่มศึกษาจากต้นสนในแถบยุโรป หลังจากนั้นมีการรวบรวมรายชื่อพืชที่พบมีราเอนโดไฟต์อาศัยอยู่ ได้แก่ ไม้พวกจิมโนสเปิร์ม (gymnosperm) และ แองจีโอสเปิร์ม (angiosperm) นอกจากนี้พบว่าราเอนโดไฟต์ที่พบในไม้ยืนต้นมีความหลากหลายทางชีวภาพสูงมาก ราเอนโดไฟต์ที่พบในไม้ยืนต้นและไม้พุ่มจะมีระบบการสืบพันธุ์และแพร่กระจายเชื้อในสิ่งแวดล้อมโดยอาศัยการสร้างสปอร์ ซึ่งมีการสร้างสปอร์ทั้งแบบอาศัยเพศ (sexual state) และไม่อาศัยเพศ (asexual state) (Saikkonen และคณะ, 2004)

2.3 การแพร่กระจายของราเอนโดไฟต์ในไม้ยืนต้น

ในช่วงหลายปีที่ผ่านมาได้มีการแยกราเอนโดไฟต์ในพืชหลายชนิด ทั้งในเขตร้อนชื้น (tropical) เขตอบอุ่น (temperate zone) และบริเวณใกล้กับเขตร้อน (subtropical) สามารถพบราเอนโดไฟต์ได้ในพืชทุกดิวิชัน (Division) ตั้งแต่ สาหร่าย มอส เฟิร์น ไคเคน ไปจนถึงพืชใบเลี้ยงคู่ (Arnold, 2000) ราเอนโดไฟต์ที่พบในไม้ยืนต้นประกอบด้วยราในไฟลัม (phylum) Ascomycotina Basidiomycota Deuteromycota และ Oomycetes (Petri, 1991) การแพร่กระจายของราเอนโดไฟต์ในพืชยืนต้นโดยทั่วไป ยกเว้นพืชตระกูลหญ้า และมีรูปแบบการกระจายตัวในแนวราบจึงมีขอบเขตของการแพร่กระจายกว้างมากซึ่งอาศัยการแพร่โดยลม ผ่น และแมลง ดังนั้นจำนวนชนิดของราเอนโดไฟต์จึงมีความหลากหลายสูงมากโดยเฉพาะในเนื้อเยื่อของพืช แต่จากการศึกษาชนิดของราที่อาศัยอยู่ในพืชกลับพบราชนิดใหม่น้อยลง แสดงให้เห็นว่าการกระจายตัวของราในพื้นที่ใหม่ๆที่ทำการศึกษเป็นราชนิดที่รู้จักกันเป็นอย่างดี แม้ว่าราเอนโดไฟต์ที่พบจะมีความหลากหลายสูง แต่ก็ยังเป็นส่วนน้อยเมื่อเทียบกับพืชที่นำมาศึกษา ดังนั้นราเอนโดไฟต์ที่คัดแยกได้อาจเป็นตัวแทนจำนวนจริง ๆ ของราที่ไม่สามารถพบได้ (Arnold และคณะ, 2000) ดังนั้นการตรวจสอบหาราเอนโดไฟต์อย่างสม่ำเสมอในพืชจึงเป็นวิธีที่ดีสำหรับการศึกษาความถี่ของการเกิดราเอนโดไฟต์ชนิดใหม่ๆ

การศึกษาราเอนโดไฟต์ในพืชได้รับความสนใจมานานแล้วในการคัดแยกราเอนโดไฟต์จากพืชในเขตอบอุ่น โดยข้อมูลส่วนใหญ่เกี่ยวกับราเอนโดไฟต์มีรายงานทางตอนเหนือของยุโรป และนิวซีแลนด์ (Azevedo, 2000) เช่น จากการศึกษาคัดแยกราเอนโดไฟต์จากกิ่งของพืชหลายชนิดแถบยุโรป เช่น *Carpinus betulus* L. *Picea abies* (L.) Karst. *Quercus robur* L. *Fagus sylvatica* L. พบราเอนโดไฟต์สกุลสำคัญ ดังนี้ คือ *Mollisia* spp. *Pezizula* spp. *Phialocephala* spp. *Phomopsis* spp. *Verticicladium trifidum* และราบางสกุลในวงศ์ Xylariaceae ราเอนโดไฟต์ *Mollisia cineria* พบได้มากในพืช *Carpinus betulus* ราเอนโดไฟต์สกุล *Pezizula* sp. *Cryptosporiopsis-anamorphs phomopsis* sp. ราววงศ์ Xylariaceae เป็นราเอนโดไฟต์ที่สามารถพบได้ในพืชเขตอบอุ่นหลายชนิด (Kowalski และ Kehr, 1997) ในช่วง 20 ปี ที่ผ่านมาได้มีผู้สนใจศึกษาคัดแยกราเอนโดไฟต์ในพืชเขตร้อนหลายชนิด พบว่าทั้งจำนวนและชนิดของราเอนโดไฟต์ที่อาศัยอยู่ในพืชเขตร้อนมีความหลากหลายสูงมาก จากรายงานการศึกษาราเอนโดไฟต์ทั้งในพืชเขตอบอุ่น เขตร้อน และบริเวณใกล้กับเขตร้อน พบว่ายังคงมีราเอนโดไฟต์อีกหลายชนิดไม่สามารถจัดจำแนกได้

(Azevedo, 2000) นั้นเป็นเพราะว่ามีราเอนโดไฟต์ชนิดใหม่อาศัยอยู่ในพืช ซึ่งแสดงให้เห็นว่าราเอนโดไฟต์เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของความหลากหลายของจุลินทรีย์เอนโดไฟต์ทั้งหมดที่มีอยู่ในธรรมชาติ

2.4 ความสัมพันธ์ของราเอนโดไฟต์กับพืชเขตร้อน

จากรายงานการศึกษาราเอนโดไฟต์ในป่าเขตร้อนราเอนโดไฟต์มักพบได้ทุกส่วนของเนื้อเยื่อพืช เช่น เมล็ด รังไข่ (Siegel และ Latch, 1987) ผล (Schena และคณะ, 2003) ลำต้น (Gutierrez และคณะ, 2001) ราก (Germida และคณะ, 1998) ใบ (Smith และคณะ, 1996) หัว (Sturz และคณะ, 1999) ตา (Ragazzi และคณะ, 1999) ท่อลำเลียง (Hoff และคณะ, 2004) ก้าน (Rodrigue และ Samuls, 2005) เปลือก (Raviraja, 2005) ปัจจุบันมีการยอมรับว่าจะไม่มีพืชชนิดใดที่ไม่มี

จุลินทรีย์เอนโดไฟต์อาศัยอยู่เลย ป่าเขตร้อนมีความอุดมสมบูรณ์ของทรัพยากรธรรมชาติสูงมาก ทั้ง สัตว์ป่า พรรณไม้ และความหลากหลายของจุลินทรีย์เอนโดไฟต์ โดยเฉพาะราเอนโดไฟต์ แต่ปัจจุบันนี้ข้อมูลน้อยมากเกี่ยวกับประโยชน์และความสัมพันธ์ของราเอนโดไฟต์ที่อาศัยอยู่ในพืชเขตร้อน ดังนั้นจึงมีการเสนอความคิดเห็นหลากหลายเกี่ยวกับรูปแบบของการดำรงชีวิตของราเอนโดไฟต์ในพืช แต่ที่ได้รับการยอมรับมากที่สุดคือ ทฤษฎีวิวัฒนาการการอยู่ร่วมกัน (Carroll, 1998) จากการศึกษาของ Hawksworth ในปี ค.ศ. 1991 และ ปี ค.ศ. 2001 ได้ให้การยอมรับว่าป่าเขตร้อนมีความหลากหลายของราสูงมาก แต่ทั้งนี้ยังไม่ทราบถึงจำนวนที่แน่ชัดของระดับความหลากหลายที่แท้จริงของรายนาดเล็ก (macro fungi) Gilbert, และคณะ (2002) ได้ทำการสำรวจรายนาดใหญ่ (macrofungi) ในป่าเขตร้อนจากข้อมูลแสดงให้เห็นว่าความหลากหลายของราที่พบในป่าเขตร้อนมีจำนวนเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับข้อมูลที่มีอยู่จากการศึกษาของ May, ในปี ค.ศ 1991 และจากรายงานการศึกษาอื่นๆชี้ให้เห็นเช่นเดียวกันว่าราที่แอบแฝง (cryptic microfungi) ในป่าเขตร้อนก็มีความหลากหลายสูงด้วยเช่นเดียวกัน ซึ่งประกอบด้วยกลุ่มราที่เป็นผู้ย่อยสลาย (Lodge, 1997; Frohlich และ Hyde, 1999; Aptroot, 2001) ราก่อโรค (Shivas และ Hyde, 1997) และราเอนโดไฟต์ที่มีความสัมพันธ์กับพืช (Lodge และคณะ, 1996) ทั้งนี้ราเอนโดไฟต์ที่อาศัยอยู่ในพืชเขตร้อนอาจเป็นตัวแทนของราในชั้น (order) ต่างๆ ซึ่งมีความหลากหลายมากกว่าเมื่อเทียบกับราเอนโดไฟต์ที่พบในพืชเขตอบอุ่น (Dreyfuss และ Chapela, 1994) มีการคัดแยกราเอนโดไฟต์ในพืชหลายชนิดซึ่งมีถิ่นอาศัยอยู่ในสภาพแวดล้อมที่ต่างกัน เช่น พุ่มหญ้า ป่าไม้ ป่าชายเลน และแปลงเพาะปลูกสำหรับทำการเกษตร ซึ่งการสำรวจหาราเอนโดไฟต์ดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงระดับความจำเพาะต่อชนิดของพืชในแต่ละพื้นที่ จากการศึกษาพบว่าราเอนโดไฟต์บางชนิด

สามารถพบได้ในพืชหลากหลายชนิด(Isaac,1992; Azevedo, 1998) ซึ่งจำนวนความหลากหลายของราเอนโดไฟต์ที่อาศัยอยู่ในพืชแต่ละชนิดอาจเกิดจากปัจจัยดังต่อไปนี้ เช่น ส่วนต่างๆพืช อายุของเนื้อเยื่อพืช ฤดูกาลในแต่ละปี และลักษณะจีโนมไทต์ของพืชแต่ละชนิด นอกจากนี้ระดับของความหลากหลายของจุลินทรีย์เอนโดไฟต์ในป่าเขตร้อนอาจขึ้นอยู่กับความหลากหลายทางนิเวศวิทยาทางอนุกรมวิธานของพืช ความสัมพันธ์ทางธรรมชาติของราเอนโดไฟต์กับพืชในป่าเขตร้อน และวิวัฒนาการของการอาศัยอยู่ร่วมกัน ได้มีผู้สนใจศึกษาราเอนโดไฟต์ในพืชเขตร้อนหลายวงศ์ด้วยกัน ตัวอย่าง เช่น พืชในวงศ์ Arecaceae (Rodrigues และ Samuele 1990 และ Rodrigues, 1994;) วงศ์ Bromeliaceae วงศ์ Orchidaceae (Bayman และคณะ,1998) และวงศ์ Piperaceae (Dreyfuss และ Petrini, 1984) ราเอนโดไฟต์ xylariaceous สามารถพบได้มากที่สุดและพบในพืชเขตร้อนเกือบทุกชนิด (Rodrigues, 1991 และ Rodrigues และ Samules, 1992 และ Rodrigues และ Petrini, 1997) ในปี ค.ศ. 1994 Rodrigues คัดแยกราเอนโดไฟต์จากใบปาล์ม *Euterpe oleracea* บริเวณป่าเขตร้อนในประเทศบราซิล พบราเอนโดไฟต์ในวงศ์ Xylaria 15 ชนิด จากจำนวนสกุลราเอนโดไฟต์ที่แยกได้ทั้งสิ้น 21 สกุล *Xylaria cubensis* เป็นราเอนโดไฟต์ในสกุล *Xylaria* ที่พบมากที่สุดใใบปาล์ม *E. oleracea* และ *Licuala ramsayi* (Rodrigues และ Samuels,1990) และจากการศึกษาายังพบราเอนโดไฟต์ *Xylaria* ในพืชเขตร้อนอีกหลายชนิด เช่น *Stylosanthes* (Leguminosae) (Pereira และคณะ,1993) *Manilkara* (Sapotaceae) (Lodge และคณะ, 1996) Orchids (Bayman และคณะ, 1998) และ *Heliconia* (Heliconiaceae) (Bills และ Polishook, 1994) นอกจากนี้ยังพบราเอนโดไฟต์สกุลอื่นซึ่งเป็นราเอนโดไฟต์ในกลุ่มของร่าก่อโรค เช่น *Colletotrichum*, *Idriella*, *Phoma*, *Phomopsis*, และ *Phyllosticta* (Rodrigues และ Petrini, 1997) ราเอนโดไฟต์ในกลุ่มผู้ย่อยสลายที่สำคัญ ได้แก่ *Cladosporium herbarum*, *Aureobasidium pullulans* และ *Alternaria alternata* (Rodrigues และ Petrini, 1997) ตัวอย่างราเอนโดไฟต์อื่นๆที่คัดแยกได้จากพืชเขตร้อนชนิดต่างๆได้สรุปและแสดงไว้ดังใน ตารางที่ 2.1 (Azevedo และ Araujo, 2001)

ศูนย์วิทยุทรัพยากร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.1 แสดงชนิดราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากพืชเขตร้อนชนิดต่างๆ

ชนิดของพืช	ราเอนโดไฟต์ที่พบ	เอกสารอ้างอิง
<i>Anacardium occidentale</i>	<i>Acremonium</i> , <i>Alternaria</i> sp., <i>Collectotrichum gloeosporioides</i> <i>Fusarium solani</i> <i>Guignardia</i> sp. <i>Lasiodiplodia</i> sp. <i>Pestalotia</i> sp. <i>Phomopsis</i> sp. <i>P.anacardii</i> <i>Phaeotrichoconis</i> cf. <i>crotalariae</i> <i>Phoma</i> sp. <i>Septoria</i> <i>Stagonospora</i> sp.	Medeios, 1998; Olivera, 1999 และ Freire และ Bezera, 2000
<i>Azadirachta indica</i>	<i>Fusarium avenaceum</i>	Rajagopal และ Suryanarayanan, 2000
<i>Brachiaria brizantha</i>	<i>Acremonium implicatum</i> <i>Rhodotorula glutinis</i> <i>Candida</i> <i>famata</i> (teleomorph <i>Debarymyces hansenii</i>) <i>Cypticoccus laurentii</i> <i>Collectotrichum gloeosporioide</i> <i>Guignardia citricarpa</i> <i>Cladosporium</i> sp.	Kelemuetal, 2001 Gai และคณะ, 2000; Glienke- Blanco และคณะ, 2002 ; Araujo และ คณะ, 2001
<i>Cuscuta reflexa</i>	<i>Phomopsis</i> sp. <i>Cladosporium</i> sp. <i>Collectotrichum</i> sp. <i>Acremonium</i> sp. <i>Alternaria alternate</i> <i>Alternaria</i> <i>longissima</i> <i>Aspergillus flavipes</i> <i>nige</i> <i>Aspergillus</i> <i>terreus</i> <i>Aspergillus versicolor</i> <i>Aureobasidium</i> <i>Alternaria</i> <i>Curvularia lunata</i> , <i>C.tuberculara</i> <i>Dreschlera halodes</i> <i>Dreschlera. Hawaiiensis</i> <i>Fusarium</i> sp. <i>Nigrospora</i> sp. <i>Nudulissporum</i> sp. <i>Penicillum</i> sp. <i>Periconia</i> sp. <i>Pithomyces</i> sp. <i>Thozetellopsis</i> sp, <i>Torula</i> sp. <i>Trichoderma</i> sp. <i>Botryodiplodia</i> sp. <i>Pestalotiopsis</i> sp. <i>Phoma</i> sp. <i>Phomopsis</i> sp. <i>Phyllosticta</i> sp. <i>Pseudoseptoria</i> sp.	Suryanarayanna และคณะ, 2000

ตารางที่ 2.1 (ต่อ) แสดงชนิดราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากพืชเขตร้อนชนิดต่างๆ

ชนิดของพืช	ราเอนโดไฟต์ที่พบ	เอกสารอ้างอิง
<i>Ficus benghalensis</i>	<i>Sporormiella minima Lasiodiplodia theobromae Collectotrichum gloeosporioides Fusicoccum sp. Phoma sp. Phomopsis sp. Phyllosticta sp. Aspergillus niger Aspergillus sp. Aureobasidium pullulans, Curvularia lunata Fusarium sp. Gliocladium roseum, Gliocadium sp. Paecilomyces sp. Penicillium sp. Phialophora sp. Trichoderma sp.</i>	Suryanarayanna และ Vijaykrishma, 2001
<i>Glycine max</i>	<i>Ascochyta sp. Chadosporium sp. Collectotrichum sp. Phyllosticta sp. Xylaria sp.</i>	Pimentel, 2001
<i>Glycine max</i>	<i>Ampelomyces quercinus, Cochiobolus intermedius Collectotrichum gloeosporioides, Didymella bryoniae Eurotium amstelodami Fusarium denticulatum Fusarium. dlamini, Fusarium oxysporum Fusarium sp. vasinfectum, Macrophomina phaseolina, Nectria haematococca Peniophora au rantiaca</i>	Mendes และคณะ, 2001
<i>Garamineas</i>	<i>Acremonium sp. Fusarium sp. Ustilago sp.</i>	Alquati , 1999
<i>Guarea guidonia</i>	<i>Phomopsis Collectotrichum Xylaria Rhizoctocnia-like fungi</i>	Gamboa และ Bayman, 2001
Halophytes from 3 dicotilidon families	<i>Camarosporium Collectotrichum Phomopsis Phyllosticta. Sporormiella minima Xylaria Rhizoctocnia-like fungi Acremonium Alternaria Ampullifera Cladosporium, Fusarium sp. Guignardia sp.</i>	Suryanarayanna และ Kumaresan, 2000

ตารางที่ 2.1 (ต่อ) แสดงชนิดราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากพืชเขตร้อนชนิดต่างๆ

ชนิดของพืช	ราเอนโดไฟต์ที่พบ	เอกสารอ้างอิง
<i>Himanthus sucuuba</i>	<i>Collectotrichum</i> sp. <i>Guignardia</i> sp. <i>Glomerella</i> sp. <i>Phomopsis</i> sp. <i>Pestalotia</i> sp. <i>Xylaria</i> sp.	Megalhaes, 2000
<i>Ilex paraguariensis</i>	<i>Acremonium</i> sp. <i>Aspergillus</i> sp. <i>Collectotrichum</i> sp. <i>Fusarium</i> sp. <i>Guignardia philoprina paecilomyces</i> sp. <i>Papulosporium</i> sp. <i>Penicillium</i> sp. <i>Nudulisporium</i> sp. <i>Xylaria</i> sp. <i>Xylaria cubense</i>	Penna, 2000; Takeda และคณะ, 2003
<i>Lepanthes rupestris</i>	<i>Guignardia Collectotrichum Xylaria</i> sp.	Bayman และคณะ, 2002
<i>Licula</i> sp.	<i>Xylaria</i> sp.	Suryanarayanna และคณะ, 2000
<i>Livistona chinwnsis</i>	<i>Idriella</i> sp. <i>Aspergillus</i> sp.	Southcott และ Johnson, 1997
<i>Mangifera indica</i>	<i>Alternaria arborescens</i> , <i>Alternaria tenuissima</i> <i>Botryosphaeria parva Dipporthe helianthi Eutypella scoparia Glomerella cingulata, Guignardia mangiferae, Hypoxylon stygium, Nodulisporium</i> sp. <i>Stenocarpella maydis, Xylaria longipes</i>	Silva (personal communication)
<i>Manilkara bidentata</i>	<i>Xylaria</i> cf. <i>multiplex Xylaria</i> cf. <i>adscendens</i> <i>Collectotrichum Pestalotiopsis versicolor Fusarium solanum Phylosticta sapotae Glomerella cingulata</i>	Lodge และคณะ, 1996
<i>Musa acuminata</i>	<i>Xylaria</i> spp. <i>Guignardia cocoicola</i> <i>Collectotrichum gloeosporioides Deightoniella torulosa, Pyriculariopsis parasitica, Dactylaria</i> sp.	Photita และคณะ, 2001

ตารางที่ 2.1 (ต่อ) แสดงชนิดราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากพืชเขตร้อนชนิดต่างๆ

ชนิดของพืช	ราเอนโดไฟต์ที่พบ	เอกสารอ้างอิง
<i>Musa sp.</i>	<i>Alternaria sp. Aspergillus sp. Cordana musa Curvularia sp. Dreschlera. Epicoccum purpuracens Fusarium sp. Glomerella cingulada Humicola sp. Nigrospora oryzae Periconia sp. phomopsis sp. Phyllosticta sp. Trichoderma sp. xylaria sp.</i>	Photita และคณะ, 1999
Orchids	<i>Rhizoctonia-like fungi Ceratobasidium Tulasnella Thanatephorus</i>	Otero และคณะ, 2002
<i>Pachystrizus erosus</i>	<i>Mucor and Rhizopus</i>	Stamford, 1997
<i>Parthenium hysterophorus</i>	<i>Alternaria zinniae Alternaria helianthi Chylindrocarpon Curvularia brachyspora Fusarium sp. Nigrospora oryzae Penicillium funiculosum Periconia sp.</i>	Romero และคณะ, 2001
<i>Paulicourea longiflora</i>	<i>Aspergillus niger Collectotrichum sp. Guignardia sp. Glomerella sp. phomopsis sp. Xylaria sp.</i>	Souza, 2001
<i>Paullinia cupana</i>	<i>Guignardia sp. Phomopsis sp. Glomerella cingulada, Xylaria sp.</i>	Guimaraes, 1998
<i>Pueraria phaseoloides</i>	<i>Glomerella cingulada Humicola sp. Xylaria sp.</i>	Galvao, 1998
<i>Rhizophora apiculata</i>	<i>Acremonium sp. Alternaria sp. Aspergillus glaucus Botryotrichum sp. Chaetomium sp. Cladosporium sp. glomerella sp. Nigrospora sp. Penicillium sp. Phialophora sp. Pestalotiopsis sp. Phoma sp. Phomopsis sp. Phyllosticta sp. Pseudeurotium sp. Sporormiella minima Thielavia sp.</i>	Suryanarayanna และคณะ, 1998

ตารางที่ 2.1 (ต่อ) แสดงชนิดราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากพืชเขตร้อนชนิดต่างๆ

ชนิดของพืช	ราเอนโดไฟต์ที่พบ	เอกสารอ้างอิง
<i>Saccharum</i> sp.	<i>Althelia bombacina</i> <i>Cochliobolus homomorphus</i> <i>Cochliobolus intermedius</i> <i>Cochliobolus melinidis</i> <i>Exserohilum mcginnisii</i> <i>Exserohilum rostratum</i> <i>Leptosphaeria bicolor</i> <i>Xylaria longipes</i>	Araujo และ Kuklinsky-Sobral, 2004
<i>Scleria pterota</i>	<i>Curvularia</i> sp. <i>Glomerella cingulata</i> <i>Pestalotia</i> sp.	Galvao, 1998
<i>Spondias mombin</i>	<i>Collectotrichum gloeosporioides</i> <i>Guignardia</i> sp. <i>Phomopsis</i> sp.	Rodrigues และ Samuels, 1999
<i>Stryctupos cugens</i>	<i>Aspergillus niger</i> <i>Collectotrichum</i> sp. <i>Guignardia</i> sp. <i>Trichoderma</i> sp.	Souza, 2001
<i>Stylosanthes</i> sp.	<i>Alternaria</i> sp. <i>Glomerella</i> sp. <i>Nigrospora oryzae</i> <i>Nudulisporium</i> sp. <i>Periconia</i> sp. <i>Phomopsis</i> sp. <i>Phyllosticta</i> sp. <i>Xylaria</i> spp.	Pereira และคณะ, 1999
<i>Subal bermudana</i>	<i>Idriella</i> sp. <i>Aspergillus</i> sp.	Southcott และ Johnson , 1997
<i>Theobroma gradiflorum</i>	<i>Fusarium</i> sp. <i>Glomerella cingulada</i> <i>Guignardia</i> sp. <i>Humicola</i> sp. <i>Pestalotia</i> sp.	Galvao, 1998
<i>Theobroma cacao</i>	<i>Verticillium</i> sp. <i>Gliocadoum</i> sp. <i>Monilochaetes</i> sp. <i>Trichoderma</i> sp. <i>Geotrichum</i> sp. <i>Syncephalastrum</i> sp. <i>Fusarium</i> sp. <i>Acremonium</i> sp. <i>Xylaria</i> sp. <i>Cladosporium</i> sp. <i>Blastomyces</i> sp. <i>Pleurotus</i> sp. <i>Botryosphaeria</i> sp.	Rubini และคณะ, 2002
<i>Vigna unguiculata</i>	<i>Aspergillus</i> sp. <i>Fusarium</i> sp. <i>Fusarium equiseti</i> <i>Fusarium solani</i> <i>Fusarium sentectum</i> ,	Rodrigues, 1999

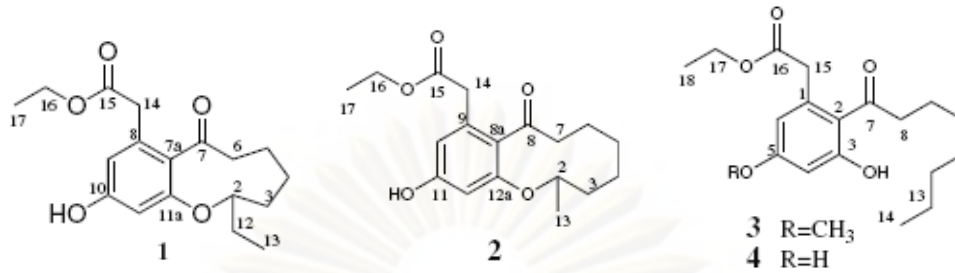
2.5 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของราเอนโดไฟต์

จุลินทรีย์เอนโดไฟต์มีความหลากหลายทางพันธุกรรมและเป็นแหล่งสำคัญของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ ๆ การค้นพบจุลินทรีย์เอนโดไฟต์และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมีเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ อย่างมีนัยสำคัญ โดยปกติราเอนโดไฟต์สายพันธุ์หนึ่ง ๆ สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจำนวนมาก สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีรายงานว่าถูกสร้างโดยราเอนโดไฟต์ เช่น สารยับยั้งแบคทีเรีย สารยับยั้งร่าก่อโรค สารกดภูมิคุ้มกัน สารยับยั้งเซลล์มะเร็ง สารต้านอนุมูลอิสระ และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดอื่น ๆ อีกมากมาย ซึ่งในที่นี้จะขอล่าวเฉพาะตัวอย่างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สร้างจากราเอนโดไฟต์เท่านั้น จำนวนของสารทุติยภูมิที่ราเอนโดไฟต์สร้างขึ้นมีจำนวนมากกว่าสารทุติยภูมิที่สร้างโดยจุลินทรีย์เอนโดไฟต์ชนิดอื่น ๆ ซึ่งบางที่อาจเป็นเพราะความถี่ของการเกิดโคโลนีของราเอนโดไฟต์ที่สามารถแยกได้จากพืชมีความถี่สูงมากกว่าจุลินทรีย์เอนโดไฟต์ชนิดอื่น ๆ นอกจากนี้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตจากราเอนโดไฟต์มีฤทธิ์หลากหลาย และสามารถแบ่งออกได้หลายประเภท เช่น อัลคาลอยด์ (alkaloids) สเตียรอยด์ (steroids) เทอร์ปีนอยด์ (terpenoids) ไอโซโครมาริน (isocoumarins) ควิโนน (quinones) ฟีนิลโพรพานอยด์ (phenylpropanoids) ลิกแนน (lignans) ฟีนอล (phenol) กรดฟีโนลิก (phenolic acid) สารอัลลิฟาติก (aliphatic metabolites) แลคโตน (lactones) และกลุ่มสารอื่น ๆ อีกมากมาย ในปัจจุบันการค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ ๆ เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในด้านเภสัชกรรมและทางการแพทย์มีการพัฒนาอย่างมากและต่อเนื่องได้มีการสนใจนำผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติมาใช้เพื่อแก้ปัญหาค่าการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อจุลินทรีย์ที่เพิ่มมากขึ้น ราเอนโดไฟต์เป็นอีกแหล่งสำคัญอีกแหล่งหนึ่งสำหรับค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ ๆ ที่ดีและมีประสิทธิภาพ เนื่องจากเคยมีรายงานการค้นพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่จากราเอนโดไฟต์อย่างต่อเนื่อง และจากการศึกษาถึงฤทธิ์ทางชีวภาพของสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิจากราเอนโดไฟต์ พบว่ามีสารหลายชนิดที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจและสามารถนำมาพัฒนาเป็นตัวยาชนิดใหม่ ๆ ได้ ตัวอย่าง เช่น

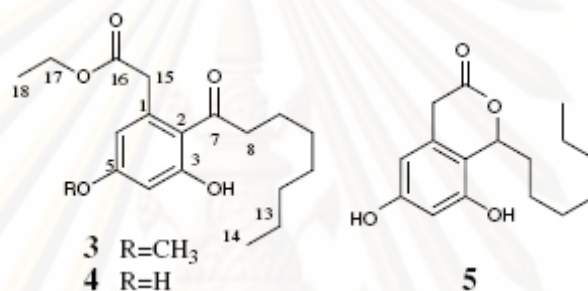
2.5.1 สารต้านเชื้อจุลินทรีย์

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพราเอนโดไฟต์แยกได้จากพืช *Excoecaria agallocha* สารที่แยกได้ คือ phomopsin A(1) , B (2) และ C (3) (รูปที่ 2.5) มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ และ cytosporone B (4) C (5) (รูปที่ 2.6) มีฤทธิ์ในการยับยั้งรา *Candida albicans* และ

Fusarium oxysporum เป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่สกัดได้จากน้ำหมักราเอนโดไฟต์ *Phomopsis* sp. ZSU-H76 (Hung และคณะ, 2008)



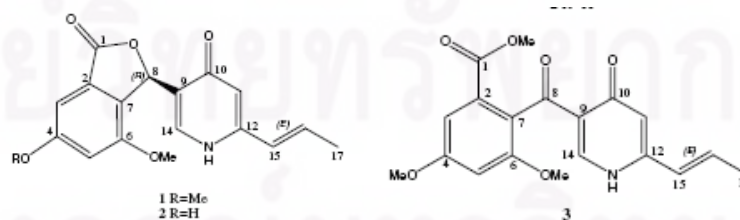
รูปที่ 2.5 โครงสร้างทางเคมีของ phomopsin A(1) , B (2) และ C (3)



รูปที่ 2.6 โครงสร้างทางเคมีของ cytosporone B (4) C (5)

2.5.2 สารยับยั้งเซลล์มะเร็ง (Anticancer Agents)

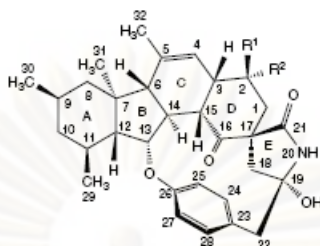
สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพราเอนโดไฟต์แยกได้จากพืช *Quercus variabilis* สารที่แยกได้คือ penicidones A-C (1-3) (รูปที่ 2.7) มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง เป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่สกัดได้จากน้ำหมักราเอนโดไฟต์ *Penicillium* sp. (Ge และคณะ, 2008)



รูปที่ 2.7 โครงสร้างทางเคมีของ penicidones A-C (1-3)

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพราเอนโดไฟต์แยกได้จากต้นข้าว สารที่แยกได้คือ pyrrospirones A-B (รูปที่ 2.8) มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง myelocytic leukemia HL-60 เป็นผลิตภัณฑ์

ธรรมชาติที่สกัดได้จากน้ำหมักราเอนโดไฟต์ *Neonectria ramularia*. Wollow KS.246 (Shiono และคณะ, 2008)

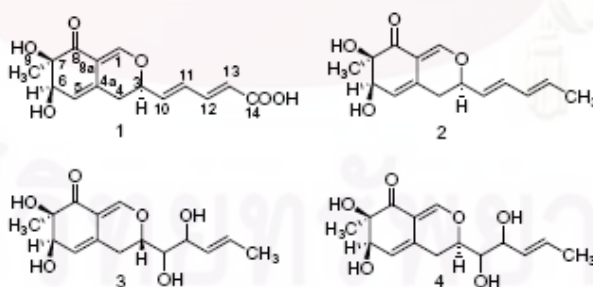


Pyrrospirone A (1): R¹ = H, R² = OH
Pyrrospirone B (2): R¹ = OH, R² = H

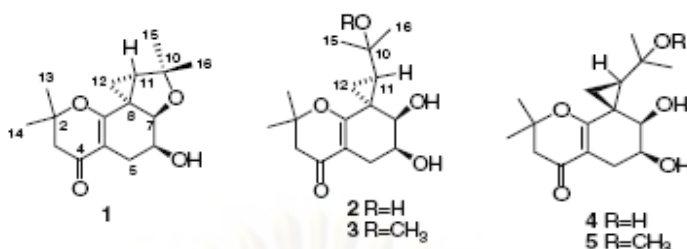
รูปที่ 2.8 โครงสร้างทางเคมีของ pyrrospirones A-B

2.5.3 สารต้านเชื้อไวรัส HIV (Anti-HIV activity)

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพราเอนโดไฟต์แยกได้จาก *Trewia nudiflora* สารที่แยกได้ คือ Phomoeuphorbins A-D (1-4) (รูปที่ 2.9) มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อไวรัส HIV เป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่สกัดได้จากการหมักแบบ Solid -State ของราเอนโดไฟต์ *Phomopsis euphorbiae* (Yu และคณะ, 2008) และสาร petalofisiols A-E (รูปที่ 2.10) แยกได้จากราเอนโดไฟต์ *Pestalotiopsis fisi* เป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่สกัดได้จากน้ำหมักของราเอนโดไฟต์ (Liu และคณะ, 2008)



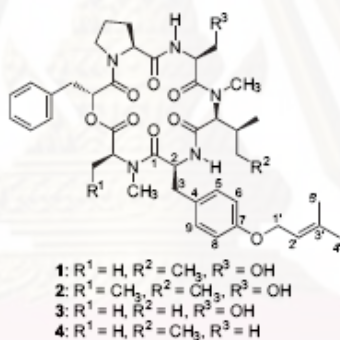
รูปที่ 2.9 โครงสร้างทางเคมีของ Phomoeuphorbins A-D (1-4)



รูปที่ 2.10 โครงสร้างทางเคมีของ petalofisiols A-E

2.5.4. สารต้านเชื้อมาลาเรียและเริม (Anti-malarial and herpes virus)

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพราเอนโดไฟต์แยกได้จากพืช *Culophyllum* sp. สารที่แยกได้คือ pullularins A-D (1-4) (รูปที่ 2.11) มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อมาลาเรีย และไวรัส HSV-1 เป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่สกัดได้จากน้ำหมัก ของราเอนโดไฟต์ *Pullularia* sp. (Isaka และคณะ, 2007)



รูปที่ 2.11 โครงสร้างทางเคมีของ pullularins A-D

2.6 ราเอนโดไฟต์ในพืชวงศ์ปาล์ม

ปาล์มเป็นพืชใบราศนประเภท พืชใบเลี้ยงเดี่ยว (monocotyledon) มีอยู่ประมาณ 28,000 ชนิด มีความหลากหลายทางสัณฐานวิทยามากกว่าพืชใบเลี้ยงเดี่ยววงศ์อื่น ๆ ปาล์มที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดชนิดกันมักมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกัน ส่วนใหญ่พบในแถบร้อนชื้น และบริเวณใกล้กับเขตร้อน ส่วนในเขตอบอุ่นพบเพียงไม่กี่ชนิด และไม่พบปาล์มในแถบแห้งแล้ง เช่น ทะเลทราย ยกเว้นบริเวณที่มีแอ่งน้ำขนาดใหญ่ ราส่วนใหญ่จึงมีความสัมพันธ์กับปาล์ม เพราะบริเวณเขตร้อนมีความชื้นค่อนข้างสูง สภาพอากาศเหมาะกับการเจริญของรา โดยทั่วไปมักจะแบ่งพืชในวงศ์ปาล์มเป็น 3 กลุ่มใหญ่ โดยอาศัยลักษณะของซับสเตรต (substrate type)

กลุ่มราขนาดเล็ก (microfungi) พบเพียงส่วนน้อยที่อาศัยอยู่ในลำต้นของปาล์ม ส่วนใหญ่เป็นกลุ่มราขนาดใหญ่ (macrofungi) โดยเฉพาะราในไฟลัม Ascomycota (Carroll, 1998) ราเอนโดไฟต์หลายชนิดมักพบอยู่ในบริเวณ ก้านใบ (petiole) และก้านทางใบ (rachis) (Hyde, 1990b และ 1994) ส่วนในบริเวณเนื้อเยื่อของใบปาล์มเป็นแหล่งหนึ่งที่พบว่ามีความหลากหลายของราเอนโดไฟต์หลายชนิด ส่วนใหญ่เป็นกลุ่มของราเอนโดไฟต์ที่มีความแตกต่างกัน เช่น กลุ่มราก่อโรค *Colletotrichum gloeosporioides* *Fusarium oxysporum* *Fusarium semitectum* *Lasisodiplodia theobromae* *Pestalotiopsis palmarum* และ *Ustilina deusta* ซึ่งคัดแยกได้จากใบปาล์ม *E. oleracea* (Rodrigues และ Samuels, 1990) และกลุ่มราที่เป็นผู้ย่อยสลายวงศ์ Xylariaceae ซึ่งพบอาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อของใบปาล์มที่สุด โดยเฉพาะราเอนโดไฟต์ *Xylaria cubensis* (Rodrigues, 1984 ; 1990 และ 1992) ทั้งนี้ ก้านใบ ก้านทางใบ และ ใบ อาจเป็นแหล่งของซับสเตรท (substrate) ที่มีความอุดมสมบูรณ์ในการเกื้อหนุนให้เกิดความหลากหลายของราชนิดต่างๆ มีราเอนโดไฟต์จำนวนน้อยมากที่มีการบันทึกว่ามาจากส่วนของลำต้น ส่วนใหญ่มีรายงานการพบราในส่วนของใบปาล์ม (Rodrigues และ Samuels, 1990; Rodrigues, 1994; Rodrigues และ Samuels, 1992) ปาล์มส่วนใหญ่เจริญอยู่ในเขตร้อน แต่เป็นที่น่าแปลกใจที่มีการบันทึกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ ของราชนิดใหม่พบทางตอนใต้ของยุโรปซึ่งสะท้อนให้เห็นว่าการศึกษาราเอนโดไฟต์จากปาล์มในเขตร้อนน้อยมาก

ในปี ค.ศ. 1994 มีรา 1580 ชนิด ได้รับการบันทึกว่าเป็นราที่พบอาศัยอยู่ในปาล์ม ประกอบด้วยราในไฟลัม Ascomycota 650 ชนิด Basidiomycota 270 ชนิด และ Deuteromycota 660 ชนิด นอกจากนี้ได้มีการสำรวจราในปาล์มอีกหลายชนิด พบราประมาณ 75 เปอร์เซ็นต์ที่ได้จากวงศ์ปาล์ม (Hyde และคณะ, 2000a) โดยราสกุลสำคัญที่พบอาศัยอยู่ในปาล์มส่วนใหญ่เป็นราในกลุ่ม Xylariaceae โดยเฉพาะราในสกุล *Xylaria* Xylariaceae เป็นราวงศ์ใหญ่ (family) ประกอบด้วยราประมาณ 40 สกุล (Ju และ Rogers, 1996) หน้าหลักของรา Xylariaceae ในระบบนิเวศนี้คือทำหน้าที่เป็นผู้ย่อยสลายเนื้อไม้ในพืชจำพวกแองจิโอสเปิร์ม และมีรายงานว่าราในกลุ่มนี้อีกหลายชนิดในสกุล *Biscogniauxia* และ *Rosellinia* เป็นราก่อโรคในพืช (Whalley, 1996; Edwards และคณะ, 2003;) เป็นราวงศ์ที่สามารถพบเจอได้ทั่วไปทั้งในเขตอบอุ่นและเขตร้อน แต่พบได้มากในบริเวณป่าเขตร้อน

(Whalley, 1996) และพบรา Xylariaceae บางสกุลอาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อของพืช โดยเฉพาะในจีนัส *Xylaria* เป็นสกุลของราเอนโดไฟต์ที่สามารถพบได้มากในพืชเขตร้อน โดยเฉพาะในพืชสกุลปาล์ม (Rodrigues และ Petrini, 1997) นอกจากนี้ยังพบอาศัยอยู่ในพืชสกุลอื่นๆ อีก เช่น กล้วยไม้ และเฟิร์น (Rodrigues, 1994) ส่วนใหญ่แพร่กระจายในสิ่งแวดล้อมโดยอาศัยการสร้างสปอร์ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ (Bayman และคณะ, 1998; Davis และคณะ, 2003)

แต่มีรายงานว่าสามารถแพร่กระจายในแนวตั้งโดยอาศัยอยู่ในเมล็ดของต้นสนและเจริญพร้อมกับ การงอกของเมล็ดสน (Bayman และคณะ, 1988.) หน้าที่ของราเอนโดไฟต์สกุล *Xylaria* ที่อาศัย อยู่ในเนื้อเยื่อพืชในส่วนของลักษณะทางนิเวศวิทยาและหน้าที่ของรากลุ่มนี้ยังไม่ทราบอย่างแน่ชัด แต่มีการคาดเดาว่าอาจจะทำหน้าที่ในการปกป้องพืชจากจุลินทรีย์ก่อโรคและแมลงคล้ายกับรา เอนโดไฟต์ในพืชตระกูลหญ้า (Rodrigues, 1997) จากการศึกษาของ Whalley และ Edward ในปี ค.ศ. 1987 พบว่าราในวงศ์ Xylariaceae มีความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ หลากหลายชนิด ตัวอย่างเช่น สารยับยั้งรา อนุพันธ์ของ Glucoside xylarosides A และ B สร้าง โดย *Xylaria* sp. PSU-D14 (Pongcharoen และคณะ, 2008) สารยับยั้งจุลินทรีย์ 7-amino-4-methylcoumarin สร้างโดย *Xylaria* sp. YX-28 (Lui และคณะ, 2008) สารยับยั้งมะเร็งตับ จำพวกอนุพันธ์ของ tetralone ได้แก่ xylarol A และ B สร้างโดย *Xylaria hypoxylon* AT-028 (Gu และ Ding, 2008) และสารยับยั้งเซลล์มะเร็ง Cytochalasins ผลิตจาก *Xylaria obovata* (Dagne และคณะ, 1994)

จากตัวอย่างการรายงานการพบสารออกฤทธิ์ชนิดใหม่ในราเอนโดไฟต์อย่างต่อเนื่องทำให้ เป็นที่น่าสนใจว่าสารใหม่ดังกล่าวที่สร้างโดยราเอนโดไฟต์อาจเป็นทางเลือกที่น่าสนใจอีกทางหนึ่งในการ นำมาใช้ประโยชน์ในการพัฒนาทางด้านการแพทย์ และการเกษตรกรรมต่อไป ปาล์มเป็นพืช วงศ์ใหญ่ส่วนใหญ่มีการกระจายตัวและพบได้มากในเขตร้อน ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีป่าเขตร้อน กระจายตัวอยู่เกือบทั่วประเทศ โดยเฉพาะทางภาคใต้ของประเทศ และดังได้กล่าวข้างต้นแล้ว มีรายงานการวิจัยมากมาย รายงานว่าพืชวงศ์ปาล์มมีความหลากหลายของราเอนโดไฟต์สูงมาก แต่ในประเทศไทยมีการศึกษาความหลากหลายของราเอนโดไฟต์และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของ ราที่อาศัยอยู่ในปาล์มน้อยมาก ดังนั้นการศึกษาคความหลากหลายและฤทธิ์ทางชีวภาพของราเอนโดไฟต์ที่อาศัยอยู่ในปาล์ม อาจพบราเอนโดไฟต์ที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ ที่มีประสิทธิภาพและสามารถนำมาพัฒนาประยุกต์ใช้ทางด้านการแพทย์ หรือทางเกษตรกรรม

ศูนย์วิทยุทรัพยากร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Arenga pinnata (Wurmb) Merrill. (กาจก ฉก ต้าว)



รูปที่ 2.12 แสดงลักษณะตัวอย่างต้นปาล์ม *Arenga pinnata* ที่ใช้ศึกษาตัดแยกกราเอนโดไฟต์

- ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Arenga pinnata* (Wurmb) Merrill.
- วงศ์ : Palmae
- ชื่อสามัญ : Sugar Palm
- ชื่ออื่น : ต้นตาว ต้นต้าว ต้นชก ต้นฉก ต้นกาจก
- ลักษณะ : ลักษณะลำต้นตรงดิ่ง ขนาดโตกว่าต้นตาล ใบมีลักษณะ
เช่นเดียวกับใบมะพร้าว แต่โตและแข็งแรงกว่า
- ถิ่นอาศัย : ชอบขึ้นตามเชิงเขา บริเวณดินร่วน อากาศชุ่มชื้น

ศูนย์วิจัยทรัพยากรป่าไม้
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Borassodendron machadonis (RIDLEY) BECC. (ปาล์มช้างให้ ช้างร้องให้)



รูปที่ 2.13 แสดงลักษณะตัวอย่างต้นปาล์ม *Borassodendron machadonis* ที่ใช้ศึกษาตัดแยก ราเอนโดไฟต์

- ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Borassodendron machadonis* (RIDLEY) BECC.
 วงศ์ : Palmae
 ชื่อสามัญ : -
 ชื่ออื่น : ช้างร้องให้ ช้างให้
 ลักษณะ : ใบรูปพัด (Fan leaf) ใบย่อยแตกกว้างมากประมาณ 1.20 เมตร ทางใบยาวประมาณ 1.50 เมตร ตามขอบก้านทางใบ ไม่มีหนามแต่มีความคมมากเหมือนใบมีด
 ลักษณะทั่วไป : เป็นปาล์มลำต้นเดี่ยวไม่แตกกอ ลำต้นกลมสูง สูงได้ถึง 9 เมตร
 ถิ่นอาศัย : ทางภาคใต้ของประเทศไทยและตอนเหนือของประเทศมาเลเซีย

บทที่ 3

อุปกรณ์สารเคมีและวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์

- ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (incubator) Memmert รุ่น BE600 บริษัท Jebsen and Jebsen
- ตู้ควบคุมอุณหภูมิภายใต้บรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂ incubator) Hepa Class 100 รุ่น 311 บริษัท Thermo electron corporation
- ตู้ถ่ายเชื้อ (laminar flow) CLEAN รุ่น H1 บริษัท Lab Service Ltd, Part
- หม้อนึ่งความดัน (autoclave) TOMY รุ่น SS-325 บริษัท Tommy Seiko Co., Ltd. Tokyo, Japan
- ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven) Memmert รุ่น D06063 บริษัท Jebsen and Jessen, Germany
- ตู้อบความร้อนแห้ง (hot air oven) Memmert รุ่น UE600 บริษัท Jebsen and Jessen, Germany
- กล้องจุลทรรศน์คอมพาวด์ไมโครสโคป (compound microscope) Olympus รุ่น BX51 บริษัท Olympus optical Co.,Ltd. Japan
- กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอไมโครสโคป (stereo microscope) Olympus รุ่น SZ60 บริษัท Olympus optical Co., Ltd. Japan
- กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ (inverted microscope) Olympus รุ่น CK2 บริษัท Olympus optical Co., Ltd. Japan
- เครื่องเขย่า (shaker) รุ่น innova 2100 บริษัท New Brunswick Scientific Co., Inc.Edison, USA
- เครื่องระเหยแห้งสุญญากาศแบบหมุน (rotary vacuum evaporator) Eyela รุ่น N-100 บริษัท Tokyo Rikakikai Co., Ltd. Japan
- ฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemocytometer) ขนาด 0.0025 mm² ยี่ห้อ Loptik Labor บริษัท Boeco
- เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Authorized thermal cyclcer) รุ่น TP 600 บริษัท TaKaRa

- เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (micro centrifuge) รุ่น CM-6010 บริษัท Hslangtai
- เครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น (micro refrigerated centrifuge) Kubota รุ่น 3700 บริษัท Kubota Corporation, Tokyo Japan
- เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น stratagene บริษัท Profuge
- เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (microplate reader) รุ่น Elx 800 บริษัท Bio-tek instrument
- ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -80°C รุ่น ULT 1786 บริษัท FORMA Scientific, USA
- ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) Sharp อุณหภูมิ -20°C
- เครื่องปั่นผสม (Vortex mixer) รุ่น VX-100 บริษัท Labnet International, Inc.
- ไมโครปิเปต (automatic adjustable micropipette) P2 (0.1-2 μl), P10 (0.5-10 μl), P20 (2-20 μl), P100 (20-100 μl), P1000 (0.2-1ml) บริษัท Gilsson France
- ปิเปตต์ทึป (pipette tip) ขนาด 1-200 μl และ 1 ml บริษัท Axygen Scientific, Inc. USA
- หลอดไมโครทิวบ์ (microtubes) ขนาด 1.5 ml บริษัท Axygen Scientific, Inc. USA
- หลอดพีซีอาร์ (PCR tube) ขนาด 0.2 ml บริษัท Axygen Scientific, Inc. USA
- หลอดเซนตริฟิวจ์ ขนาด 15 มิลลิลิตร บริษัท Corning Incorporated, USA
- ถาดเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม (tissue culture plate 96 well) ยี่ห้อ Corning บริษัท Corning Incorporated, USA
- ภาชนะเลี้ยงเซลล์ (tissue culture flask) ขนาด 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร ยี่ห้อ Corning บริษัท Corning Incorporated, USA
- ปิเปตต์แก้ว (seropipatte) ขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร
- เครื่องดูดจากปิเปตต์ (Pipette aid) ยี่ห้อ Drummond
- หลอดเก็บเซลล์แช่แข็ง (cryotube) บริษัท Corning Incorporation, USA
- TLC aluminium sheet รุ่น silica gel 60 F₂₅₄ บริษัท Merck, Germany

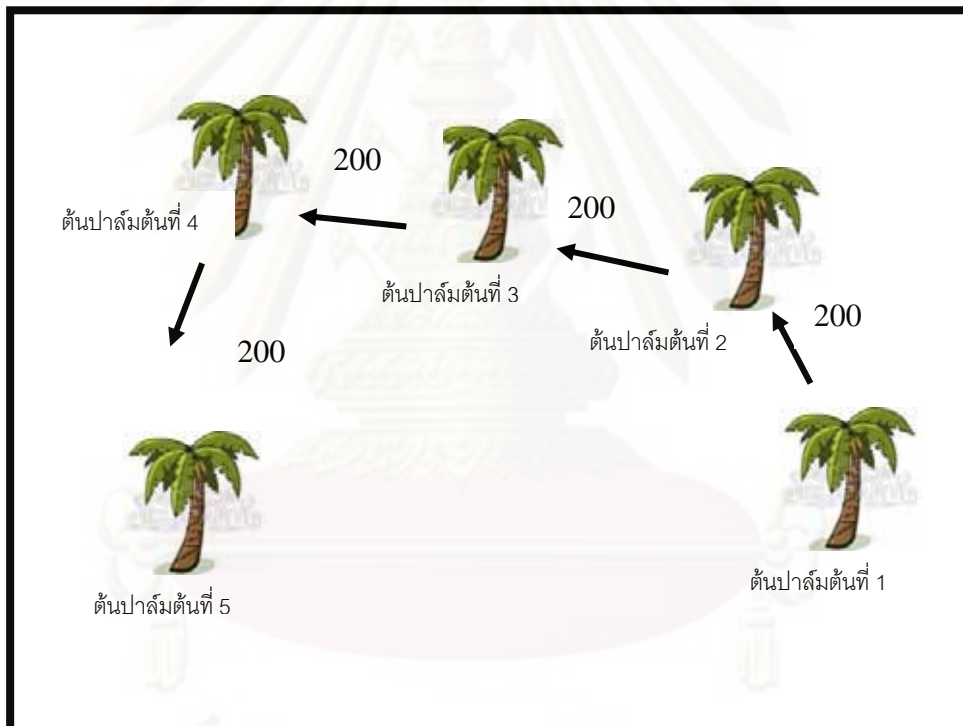
3.2 สารเคมี

- Beef extract
- Yeast extract
- Malt extract

- Methanol
- Ethanol
- Ethylacetate
- Hexanes
- Streptomycin
- Sodium hypochlorite
- Penicillin G
- Ferrous sulphate ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
- Zinc sulphate ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
- Manganes chloride (MnCl_2)
- Hydrochloric acid (HCl) บริษัท Merck. Germany
- Dimethylsulfoxide (DMSO) บริษัท Sigma, U.S.A.
- Fetal Bovine Serum (FBS) Hyclone บริษัท Hyclone
- อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 บริษัท Hyclone
- MTT [3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenylterazolium bromide)] บริษัท Bio Basic inc, Canada
- Trypsin-EDTA บริษัท Hyclone
- Trypan blue 0.5% w/v บริษัท Biochrom AG, Germany
- Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) บริษัท Serva
- 2-Mecaptoethanol บริษัท Sigma, U.S.A.
- Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) บริษัท Scharlau
- Taq DNA polymerase บริษัท Fermentas
- 10x Tris boric acid disodium ethylenediamine tetracetic acid (10x TBE buffer
- Agarose molecular biology grade บริษัท ISC Bio Express
- Isopropanol alcohol บริษัท Merck. Germany
- Isoamyl alcohol บริษัท Carbo erba

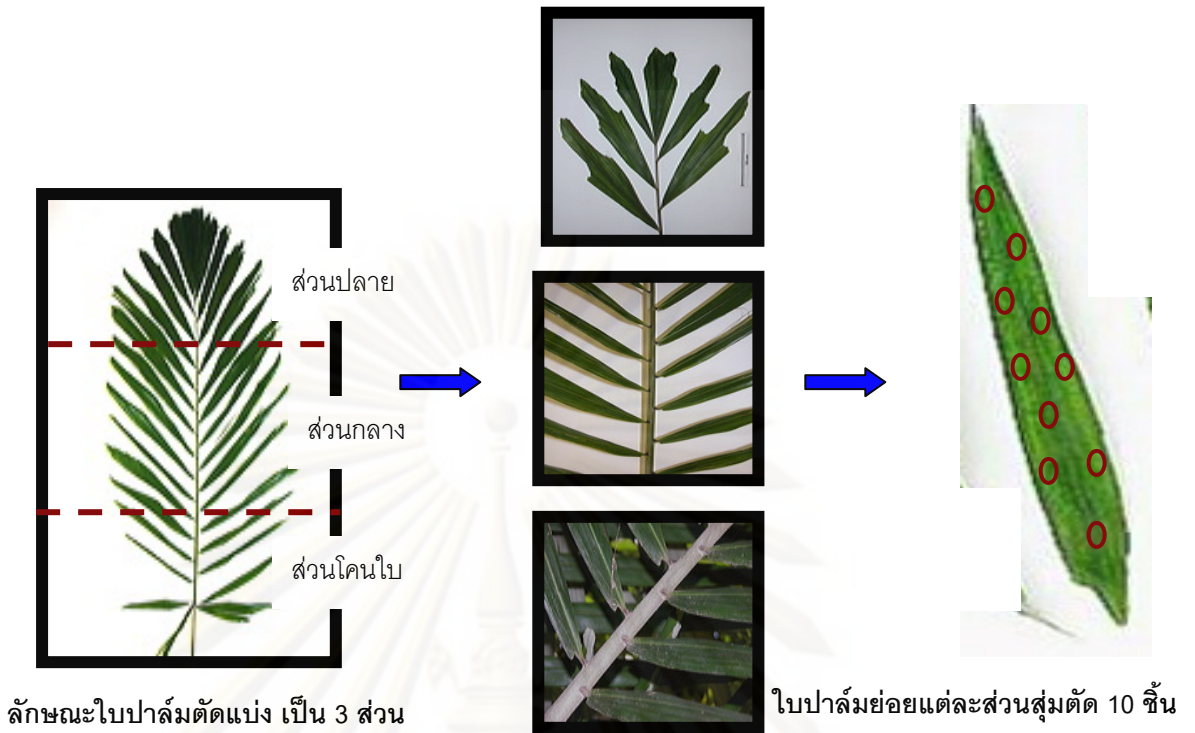
3.3 สำรวจและเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างใบปาล์ม 2 ชนิด คือ *Arenga pinnata* (Wurmb) Merrill. และ *Borassodendron machadonis* (Ridley) Becc. โดยเลือกเก็บใบแก่ที่สมบูรณ์ไม่แสดงอาการติดโรค เก็บตัวอย่างพืชแบบสุ่ม ชนิดละ 5 ต้น ต้นละ 1 ใบ แต่ละต้นห่างกันประมาณ 200 เมตร และสูงจากพื้นดินประมาณ 3 เมตร จากอุทยานแห่งชาติเขาหลวง บริเวณน้ำตกท่าแพ อำเภอช้างกลาง จังหวัดนครศรีธรรมราช ในช่วงฤดูแล้งเดือนเมษายน และช่วงฤดูฝนเดือนธันวาคม ในปี พ.ศ. 2550 ตัดใบปาล์มออกเป็นชิ้นยาวประมาณ 50 เซนติเมตร บรรจุในถุงพลาสติก ทำการแยกราเอนโดไฟต์จากใบพืชภายใน 12 ชั่วโมงหลังจากเก็บตัวอย่าง

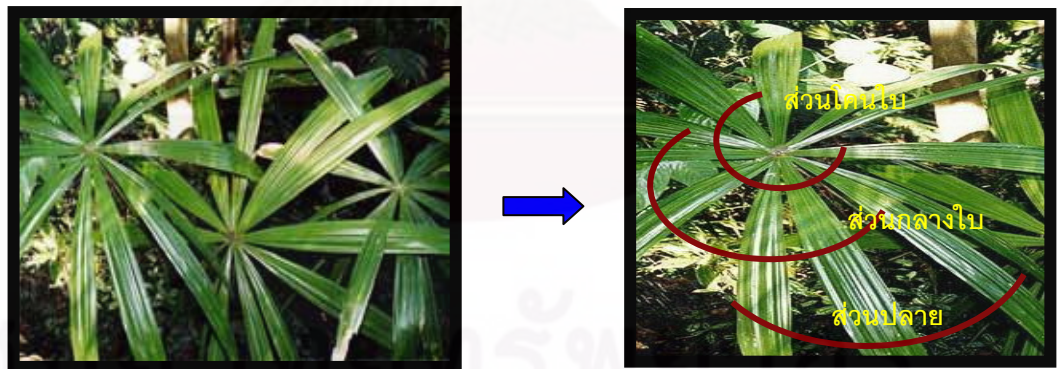


ภาพที่ 3.1 แสดงตำแหน่งและระยะห่างของต้นปาล์มที่ใช้คัดแยกราเอนโดไฟต์

ศูนย์วิจัยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 3.2 แสดงบริเวณการตัดชิ้นส่วนของใบปาล์มเพื่อนำมาคัดแยกกราเหนโดไฟตีในปาล์ม *A. pinnata* โดยแต่ละใบแบ่งออกเป็น 3 ส่วน แต่ละส่วนนำคัดเลือกเฉพาะ 1 ใบย่อยและแต่ละใบย่อยสุมตัดออกเป็น 10 ชั้น



ภาพที่ 3.3 แสดงบริเวณการตัดชิ้นส่วนของใบปาล์มเพื่อนำมาคัดแยกกราเหนโดไฟตีในปาล์ม *B. machadonis* โดยแต่ละใบแบ่งออกเป็น 3 ส่วน และตัดสุมแต่ละส่วนออกเป็น 10 ชั้น

3.4 แยกราเอนโดไฟต์ให้บริสุทธิ์

แยกราเอนโดไฟต์โดยใช้เทคนิค surface sterilization โดยนำตัวอย่างใบปาล์มมาล้างทำความสะอาดแล้วตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ บริเวณโคนใบ กลางใบ และปลายใบ บริเวณละ 10 ชิ้น นำชิ้นส่วนใบพืชที่ตัดมาฆ่าเชื้อบริเวณผิวใบตามลำดับขั้นตอน ดังนี้ จุ่มชิ้นส่วนใบพืชลงในเอทานอลเข้มข้น 70% เป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้นจุ่มลงในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์เข้มข้น 5% เป็นเวลา 5 นาที แล้วจุ่มลงใน เอทานอลเข้มข้น 70% เป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้นล้างชิ้นส่วนใบพืชด้วยน้ำกลั่นผ่านการฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง และซับให้แห้งบนกระดาษที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นำตัวอย่างใบพืชที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวใบวางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Potato Dextrose Agar (PDA) (ภาคผนวก ก หมายเลข 1) ที่เติม streptomycin ปริมาณ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย บ่มจานอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องและสังเกตการงอกของราออกมาจากเนื้อเยื่อของพืช เมื่อพบว่ามีเส้นใยของราเอนโดไฟต์เจริญออกมาจากเนื้อเยื่อพืช เชียส่วนปลายของเส้นใยนำไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และเก็บเชื้อบริสุทธิ์บนอาหารผิวแข็ง PDA ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิห้อง

3.5 เก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์

นำราเอนโดไฟต์บริสุทธิ์ไปเลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7-10 วัน ตัดชิ้นรูนที่มีเส้นใยราเจริญอยู่นำไปวางบนอาหารแข็งผิวแข็ง PDA บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7-14 วัน เก็บรักษาเชื้อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส วิธีนี้สามารถเก็บรักษาเชื้อได้นาน 2-3 เดือน การเก็บรักษาเชื้อเป็นระยะเวลาานทำได้โดยเก็บในน้ำโดยตัดชิ้นรูนที่มีเส้นใยราเจริญอยู่เป็นชิ้นเล็กโดยใช้ cork borer เส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร แล้วเก็บชิ้นรูนในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และเก็บที่อุณหภูมิห้องสามารถเก็บรักษาเชื้อได้นาน 6 เดือน ถึง 1 ปี

3.6 ศึกษาความหลากหลายของราเอนโดไฟต์

3.6.1 การจัดจำแนกราเอนโดไฟต์

จำแนกราเอนโดไฟต์ในระดับสกุล (Genus) โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราโดยใช้เทคนิค slide culture เพื่อศึกษาลักษณะของเส้นใย และลักษณะโครงสร้างสปอร์ เช่น การจัดเรียงตัวของสปอร์ จำนวนสปอร์ ลักษณะผิวสปอร์ ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์ และจำแนกชนิดของราตามวิธีของ Barnett และ Hunter, 1987 สำหรับราเอนโดไฟต์ในสกุล *Xylaria* จำแนกกลุ่มโดยเลี้ยงบนอาหารแข็ง 3 ชนิด คือ PDA Malt Extract Agar (MEA) (ภาคผนวก ก หมายเลข 2) และ Oatmeal Agar (OA) (ภาคผนวก ก หมายเลข 3) จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราในสกุล *Xylaria* สามารถสร้าง stroma ในระหว่างการเจริญ จึงศึกษาลักษณะรูปทรงและสีของ stroma ตำแหน่งการเจริญของ stroma บนอาหารเลี้ยงเชื้อ นอกจากนี้ศึกษาลักษณะและสีของโคโลนี และการสร้างรงควัตถุ (pigment) ของรา

3.6.2 การวิเคราะห์ทางสถิติ (statistical analysis)

คำนวณค่า Colonization rate คือ อัตราความถี่ของการเกิดโคโลนีราเอนโดไฟต์ของใบพืช และ Isolation rate คือ อัตราการแยกราเอนโดไฟต์ได้จากพืชตัวอย่าง (Frohlich และคณะ, 2000)

$$\text{อัตราการเกิดการเกิดโคโลนี (CR)} = \frac{\text{จำนวนชิ้นใบปาล์มที่สามารถแยกราได้} \geq \text{หนึ่งไอโซเลต}}{\text{จำนวนชิ้นใบปาล์มทั้งหมดที่นำมาแยกราเอนโดไฟต์}}$$

$$\text{อัตราการเกิดไอโซเลต (IR)} = \frac{\text{จำนวนราเอนโดไฟต์ที่สามารถแยกได้ทั้งหมด}}{\text{จำนวนชิ้นใบปาล์มทั้งหมดที่นำมาแยกเชื้อ}}$$

วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของ Colonization rate และ Isolation rate ของราเอนโดไฟต์โดยโปรแกรม SPSS ตามปัจจัยดังต่อไปนี้

1. ฤดูกาล : ฤดูฝนและฤดูแล้ง
2. ชนิดของใบปาล์ม : *Agrena pinnatta* และ *Borassodendron machadonis*

3.7 การค้นหาเอนโดไฟต์ที่มีความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

3.7.1 เตรียมหัวเชื้อ

นำราเอนโดไฟต์บริสุทธิ์จากอาหารผิวเหียง PDA ในข้อ 3.5 มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-14 วัน ขึ้นอยู่กับการเจริญของราแต่ละไอโซเลต

3.7.2 เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว

เตรียมอาหารเหลว Potato Dextrose Broth (PDB) (ภาคผนวก ก หมายเลข 4) 100 มิลลิลิตร ในขวดทรงชมพู (Erlenmayer flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นตัดชิ้นรุ้นที่มีราเจริญอยู่ที่เตรียมได้จากข้อ 3.7.1 ด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร จำนวน 5 ชิ้น ถ่ายชิ้นรุ้นลงในอาหารเหลว PDB บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 วัน จากนั้นกรองแยกเส้นใยออกจากน้ำเลี้ยงเชื้อเพื่อนำแต่ละส่วนไปสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ต่อไป

3.7.3 สกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากอาหารเลี้ยงเชื้อและส่วนของเส้นใย

สกัดน้ำเลี้ยงเชื้อจากข้อ 3.7.2 ด้วยเอทิลแอซิเตท (ethyl acetate) โดยใช้ปริมาตรของเอทิลแอซิเตทต่อปริมาตรของน้ำเลี้ยงเชื้อในอัตราส่วน 1:1 เก็บสารสกัดในชั้นเอทิลแอซิเตทไว้ ทำการสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อซ้ำด้วยตัวทำละลายเดิมเพื่อเก็บส่วนของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เหลืออยู่ในส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อ ในส่วนของเส้นใยรา สกัดสารโดยบดเส้นใยให้ละเอียดด้วยโกร่งบดยา แล้วสกัดด้วยเอทิลแอซิเตทในอัตราส่วนเส้นใยเปียก 1 กรัมต่อเอทิลแอซิเตท 4 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นแยกตะกอนของเส้นใยและเก็บส่วนน้ำใสไว้ นำสารสกัดส่วนที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อผสมรวมกันกับสารสกัดที่ได้จากส่วนของเส้นใย จากนั้นทำการระเหยตัวทำละลายภายใต้ระบบสุญญากาศด้วยเครื่องระเหยแบบหมุน (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส หลังจากตัวทำละลายระเหยออกจนแห้ง ละลายคราบของสารสกัดด้วย 20 % (V/V) DMSO ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เก็บสารสกัดไว้ในหลอดไมโครทิวป์ ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปทดสอบการออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ และยับยั้งเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์ต่อไป

3.7.4 ทดสอบความสามารถของสารสกัดในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ

ทดสอบความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของสารสกัดจากราเอนไฟต์ โดยทดสอบกับจุลินทรีย์ 5 ชนิด คือ แบคทีเรียแกรมบวก 2 ชนิด ได้แก่ *Bacillus cereus* (ATCC 6633) และ *Staphylococcus aureus* (ATCC 5169) แบคทีเรียแกรมลบ 2 ชนิด ได้แก่ *Escherichia coli* (ATCC 25922) และ *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) และยีสต์ ได้แก่ *Candida albicans* (ATCC 7004)

3.7.4.1 การเตรียมแบคทีเรียทดสอบ

นำแบคทีเรียทดสอบขีด (streak) บนอาหาร Nutrient agar (NA) (ภาคผนวก ก หมายเลข 5) เพื่อให้เป็นโคโลนีเดี่ยว ป่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้ลูป (loop) เชี่ยโคโลนีเดี่ยว 4-5 โคโลนี ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth (NB) (ภาคผนวก ก หมายเลข 6) 5 มิลลิลิตร ป่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 - 8 ชั่วโมง หรือจนสังเกตเห็นว่าหลอดเชื้อขุ่น ปรับความขุ่นของแบคทีเรียทดสอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ให้มีความขุ่นเทียบเท่ากับมาตรฐาน 0.5 McFarland (ภาคผนวก ข หมายเลข 2) ซึ่งประกอบด้วย BaCl_2 0.048 M ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และ NH_4SO_4 0.36 M ปริมาตร 99.5 มิลลิลิตร หรือโดยอ่านค่าจาก Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร ให้มีค่าความดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.08 - 0.10 เพื่อให้มีเชื้อประมาณ 10^8 CFU ต่อ มิลลิลิตร

3.7.4.2 การเตรียมยีสต์ทดสอบ

นำยีสต์ทดสอบขีดบนอาหาร Sabouraud dextrose agar (ภาคผนวก ก หมายเลข 7) เพื่อให้เป็นโคโลนีเดี่ยวๆ ป่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ใช้ลูปเชี่ยโคโลนีเดี่ยว ๆ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอย่างน้อย 1 มิลลิเมตร จำนวน 2-3 โคโลนี ละลายในสารละลาย 0.85% (w/v) NaCl ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปรับความขุ่นของสารแขวนลอยยีสต์ให้มีความขุ่นเทียบเท่ากับมาตรฐาน 0.5 McFarland หรือโดยอ่านค่าจาก Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร ให้มีค่าความดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.08 - 0.10 เพื่อให้มีเชื้อประมาณ $1 \times 10^6 - 3 \times 10^6$ CFU ต่อ มิลลิลิตร

3.7.4.3 ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ

ทดสอบความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของสารสกัดจากรา เอนโดไฟต์โดยวิธี Agar well diffusion method (Murray และ Baron, 1999) นำสารสกัดที่ได้จากข้อ 3.7.3 มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบโดยนำจุลินทรีย์ทดสอบที่เตรียมไว้ตามข้อ 3.7.4.1 และ 3.7.4.2 มานับจำนวนจุลินทรีย์ทดสอบโดยวิธีนับจำนวนโคโลนีบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (Plate count) ให้ได้จำนวนของจุลินทรีย์ทดสอบแสดงดังตารางที่ 3.1 จากนั้นใช้ไม้พันสำลีที่ฆ่าเชื้อแล้ว จุ่มลงในหลอดสารแขวนลอยเชื้อ ปิดล้าลึกับข้างหลอดให้ล้าลือเปียกพอเหมาะ ๆ ป้ายเชื้อทดสอบลงบนผิวหน้าอาหารอาหาร Muller-Hinton Agar (ภาคผนวก ก หมายเลข 8) (สำหรับแบคทีเรียทดสอบ) Sabouraud Dextrose Agar (ภาคผนวก ก หมายเลข 9) (สำหรับยีสต์ทดสอบ) เมื่อป้ายเชื้อทดสอบทั่วในลักษณะสามทิศทางแล้วทิ้งไว้ 3-5 นาที เพื่อให้ผิวหน้าของอาหารแห้งจากนั้นใช้ cork borer เส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร ฆ่าเชื้อโดยใช้เปลวไฟ เจาะลงบนอาหารแข็งแล้วนำชิ้นวุ้นออก (ควบคุมให้หลุมที่เจาะมีปริมาตรเท่ากันโดยเตรียมอาหารสำหรับทดสอบปริมาตร 15 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำมาเทลงในจานเลี้ยงเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้ว) ใช้ปิเปตดูดสารสกัดจากข้อ 3.7.3 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร หยดลงในหลุมที่เจาะไว้ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรียทดสอบ ส่วนยีสต์ทดสอบบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นวัดบริเวณวงใส (clear zone) ที่เกิดขึ้น โดยชุดควบคุมบวกสำหรับแบคทีเรียทดสอบ คือ streptomycin เข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับยีสต์ทดสอบ คือ nystatin เข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับชุดควบคุมลบ คือ สารสกัดจากอาหารเหลวที่ไม่มีการเติมหัวเชื้อ

ตารางที่ 3.1 แสดงจำนวนจุลินทรีย์ทดสอบ (CFU/ml) ที่มีความชุ่มเทียบเท่า 0.5 McFarland Standard

จุลินทรีย์ทดสอบ	ค่าการดูดกลืนแสง (OD)	จำนวนจุลินทรีย์ทดสอบ (CFU/ml)
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	0.108	3.32×10^8
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0.096	3.13×10^8
<i>B. cereus</i> ATCC 6633	0.101	6.30×10^7
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0.099	6.70×10^7
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	0.094	2.85×10^6

3.7.5 ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดยับยั้งเซลล์มะเร็งมนุษย์

ทดสอบความสามารถของสารสกัดจากราเอนโดไฟต์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งโดยวิธี MTT assay [3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide calorimetric] (Palaga และคณะ, 1996)

เซลล์มะเร็งมนุษย์ (Human tumour cell lines) ที่ใช้ทดสอบมี 7 เซลล์ ดังนี้

A375	(Human malignant melanoma)	ATCC No.CRL-1619
SW620	(Human colorectal adenocarcinoma)	ATCC No.CCL-227
Kato III	(Human gastric carcinoma)	ATCC No.HTB-103
HepG2	(Human liver hepatoblastoma)	ATCC No.HB-8065
BT474	(Human ductal carcinoma)	ATCC No.HTB-20
Caskies	(cervical carcinoma cells)	ATCC No.HCR-1150
Jurkat	(Human acute T cell leukemia)	ATCC No.CRL-2063

3.7.5.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็ง

นำเซลล์มะเร็งทั้ง 7 ชนิด ที่เก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลวออกมาเลี้ยง โดยแช่หลอดเก็บเซลล์ในอ่างน้ำอุ่นอุณหภูมิ 37 องศาเซียเซียส หลังจากน้ำแข็งละลายใช้ปิเปตต์แก้วดูดสารแขวนลอยเซลล์ใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 (ภาคผนวก ก หมายเลข 13) ปริมาตร 6 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นด้วยความเร็ว 1000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง ละลายตะกอนเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ PRMI-1640 ปริมาตร 7 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตต์เซลล์แขวนลอยลงในภาชนะเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร ตรวจสอบรูปร่างลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ บ่มเซลล์ในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซียเซียส ภายใต้บรรยากาศก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) 5% และเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 3-4 วัน บ่มเซลล์จนกว่าเซลล์จะเจริญเกือบเต็มผิวหน้าของภาชนะเลี้ยงเซลล์ ในกรณีที่เซลล์ทดสอบเป็นเซลล์มะเร็งชนิดเกาะผิว (A375, SW620, Kato III, HepG2 และ BT474) การเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทำได้โดยดูดอาหารเก่าทั้งหมดออกแล้วเติมอาหารใหม่ปริมาตร 7 มิลลิลิตร เข้าไปแทนที่เป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ ในกรณีที่เซลล์ทดสอบเป็นเซลล์มะเร็งชนิดแขวนลอย (Jurkat) การเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทำได้โดยปิเปตต์เซลล์แขวนลอยลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ นำไปปั่นที่ความเร็ว 1000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วละลายตะกอนเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ PRMI-1640 หลังจากนั้นปิเปตต์เซลล์แขวนลอยลงในภาชนะเลี้ยงเซลล์ บ่มเซลล์ในตู้บ่มอุณหภูมิ 37

องศาเซียเซียส ภายใต้บรรยากาศ CO₂ 5% เมื่อเซลล์มะเร็งเจริญเข้าสู่ระยะ exponential phase จึงทำการถ่ายเซลล์ลงสู่ถาดเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม (96 well plate) ต่อไป

3.7.5.2 การถ่ายเซลล์เพาะเลี้ยง

เซลล์มะเร็งที่อยู่ในระยะ exponential phase จากข้อ 3.7.5.1 ถูกถ่ายลงสู่ถาดเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม ในกรณีที่เซลล์มะเร็งเป็นเซลล์ชนิดแขวนลอย (Jurkat) ถ่ายเซลล์โดยปิเปตต์เซลล์แขวนลอยเซลล์จากภาชนะเลี้ยงเซลล์ลงสู่หลอดเซนตริฟิวจ์ นำไปปั่นที่ความเร็ว 1000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสที่เก็บตะกอนของเซลล์ ในกรณีที่เซลล์มะเร็งเป็นเซลล์เกาะผิว (A375, SW620, Kato III, HepG2 และ BT474) ถ่ายเซลล์โดยการดูดอาหารในภาชนะเลี้ยงเซลล์ออก ล้างเซลล์ด้วยสารละลาย 1XPBS (ปลอด Ca²⁺ และ Mg²⁺) (ภาคผนวก ข หมายเลข 3) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าภาชนะไปมา 5-6 ครั้ง แล้วดูดสารละลาย 1XPBS ออก ปิเปตต์ trypsin-EDTA เข้มข้น 0.25% ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ลงในภาชนะเลี้ยงเซลล์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศ CO₂ 5% เป็นเวลาประมาณ 2 นาที (เพื่อย่อยเซลล์ให้หลุดออกจากผิวภาชนะเลี้ยงเซลล์) หลังจากเซลล์หลุดออกจากผิวภาชนะแล้ว ปิเปตอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในภาชนะเลี้ยงเซลล์ เพื่อชะเซลล์ให้หลุดออกจากผิวภาชนะและแขวนลอยเซลล์ หลังจากนั้นปิเปตเซลล์แขวนลอยลงสู่หลอดเซนตริฟิวจ์ ปั่นที่ความเร็ว 1000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วเทส่วนใสที่เก็บตะกอนของเซลล์ หลังจากได้ตะกอนของเซลล์ชนิดแขวนลอยและเซลล์ชนิดเกาะผิวแล้ว ละลายตะกอนด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 ปิเปตสารแขวนลอยเซลล์ขึ้นลงเพื่อให้เซลล์กระจายเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ และนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต หลังจากนั้นเจือจางเซลล์ให้มีจำนวนประมาณ 2-3 × 10⁵ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และปิเปตสารแขวนลอยเซลล์ลงในหลุมของถาดเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม ในปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร ซึ่งจะมีจำนวนเซลล์ประมาณ 2-3 × 10⁴ เซลล์ต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ภายใต้บรรยากาศ CO₂ 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อนำไปทดสอบด้วยวิธี MTT ต่อไป

3.7.5.3 การนับจำนวนเซลล์มะเร็งที่มีชีวิตโดยย้อมด้วย trypan blue dye

ปิเปตต์สารแขวนลอยเซลล์ที่ได้จากข้อ 3.7.5.2 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ย้อมด้วยสี trypan blue ความเข้มข้น 0.5% (w/v) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับโดยนับเซลล์ในช่องสี่เหลี่ยมใหญ่ทั้ง 4 มุม ซึ่งเซลล์ที่มีชีวิตจะย้อมไม่ติดสีของ trypan blue

$$\text{จำนวนเซลล์ที่นับได้ (เซลล์/มิลลิลิตร)} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมดที่นับได้} \times 10^4 \times 2}{4}$$

3.7.5.4 การทดสอบการยับยั้งเซลล์มะเร็งของสารสกัดโดยวิธี MTT assay

หลังจากบ่มเซลล์ในข้อ 3.7.5.2. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเซลล์ออกจากตู้บ่มเพื่อหยุดสารสกัดจากราเอนโดไฟต์ที่ได้จากข้อ 3.7.3 โดยใช้ปริมาณสารสกัดหลุมละ 5 ไมโครลิตร บ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศ CO₂ 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทดสอบการมีชีวิตของเซลล์ (Cell Viability) โดยหยุดสารละลาย MTT (ภาคผนวก ข หมายเลข 4) ลงในแต่ละหลุมของถาดเลี้ยงเซลล์ปริมาณหลุมละ 10 ไมโครลิตร โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลาย MTT เท่ากับ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารละลาย MTT จะทำปฏิกิริยากับเอ็นไซม์ mitochondrial dehydrogenase ในเซลล์ที่มีชีวิต ทำให้สารละลาย MTT ที่มีสีเหลืองเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ม่วง (formazan crystal) ซึ่งมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ ปริมาณเอ็นไซม์ dehydrogenase ในเซลล์ที่มีชีวิตจะมีค่าคงที่ ดังนั้นปริมาณผลิตภัณฑ์ formazan ที่เกิดขึ้นจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต ในการทดลองชุดควบคุมคือ สารละลาย 20%(v/v) DMSO ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.2% และ Blank คือ อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีเซลล์มะเร็ง (cell free medium) หลังจากหยุดสารละลาย MTT แล้วบ่มเซลล์ที่สภาวะเดิมเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ดูดของเหลวออกจากหลุม แล้วเติมสารละลาย 0.04 N HCl ใน isopropanol (ภาคผนวก ข หมายเลข 5) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุมของถาดเลี้ยงเซลล์เพื่อละลาย formazan crystal หลังจากนั้นนำถาดเลี้ยงเซลล์ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย microplate reader ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร คำนวณหาค่าการมีชีวิตของเซลล์ (Cell viability) โดยใช้สมการดังต่อไปนี้

$$\text{Cell Viability (\%)} = \frac{(\text{OD test average} - \text{OD blank average}) \times 100}{\text{OD control average} - \text{OD blank average}}$$

OD test average = ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ทดสอบด้วยสารสกัดจากราเอนโดไฟต์

OD control average = ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ทดสอบด้วย DMSO

OD blank average = ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของอาหารเลี้ยงเซลล์ (cell free medium)

3.7.5.5 การเก็บเซลล์ในไนโตรเจนเหลว

ทำการย่อยเซลล์ที่เกาะอยู่กับภาชนะเลี้ยงเซลล์ให้หลุดออกโดยใช้ trypsin-EDTA เข้มข้น 0.25% ดูดสารแขวนลอยเซลล์ใส่หลอดเซนตริฟิวจ์ นำไปปั่นที่ 1000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้งเพื่อเก็บตะกอนของเซลล์ หลังจากนั้นละลายตะกอนของเซลล์ด้วย freezing media (ภาคผนวก ก หมายเลข 14) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ดูดเซลล์แขวนลอยใส่ในหลอดเก็บเซลล์ (cryotube) นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำหลอดเก็บเซลล์ไปเก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลววิธีสามารถเก็บเซลล์ไว้ได้เป็นระยะเวลา

3.7.6 ศึกษาผลของสารสกัดจากราเอนโดไฟต์ต่อการตายแบบอะพอพโทซิส (apoptosis) ของเซลล์มะเร็งโดยวิธีย้อมด้วย DNA dry Hoechst 33342

3.7.6.1 เซลล์แขวนลอย (Jurkat)

เตรียมเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (Jurkat) แขวนลอยจำนวน 1×10^6 เซลล์/มิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 ปิเปตต์เซลล์แขวนลอยปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ (dish) ขนาด 35x10 มิลลิเมตร หลังจากนั้นหยดด้วยสารสกัดจากราเอนโดไฟต์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/dish สารละลาย DMSO 20% เป็นชุดควบคุมลบ และสารละลาย etoposide เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ เป็นชุดควบคุมบวก โดยแต่ละชุดทดสอบทำการทดลอง 3 ซ้ำ บ่มจานเพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศ CO₂ 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากบ่มเซลล์ครบตามเวลาแล้วถ่ายเซลล์ใส่หลอดไมโครทิวบ์ นำไปปั่นที่ความเร็ว 1000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างเซลล์ด้วย 1XPBS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปั่นที่สภาวะเดิมเทส่วนใสทิ้ง เติม glutaraldehyde เข้มข้น 1% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มเซลล์ไว้ในที่มืดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นปิเปตต์ glutaraldehyde ทิ้ง แล้วล้างเซลล์ด้วย 1XPBS ปั่นเซลล์ที่สภาวะเดิม เทส่วนใสทิ้ง เติม 1XPBS ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เพื่อละลายตะกอนของเซลล์ แล้วเติมสี Hoechst 33342 ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 10 นาที ปิเปตต์เซลล์แขวนลอยหยดลงบนบนกระจกสไลด์ ปิดทับด้วย cover slip ใช้น้ำยาทาเล็บเคลือบรอบๆ ด้านข้างของ cover slip ตรวจนับจำนวนเซลล์ที่เกิด apoptotic nuclei ด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์

3.7.6.2 เซลล์เกาะผิว (BT474)

เตรียมเซลล์มะเร็งเต้านม (BT474) แขนงลอยจำนวน 1×10^6 เซลล์/ มิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 ปีเปตต์เซลล์แขวนลอยปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ (dish) ขนาด 35x10 มิลลิเมตร โดยมีแผ่น cover slip ที่ฆ่าเชื้อแล้ววางราบอยู่กับพื้นผิวจานเลี้ยงเซลล์ หลังจากนั้นหยดด้วยสารสกัดจากราเอนโดไฟต์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/dish สารละลาย DMSO 20% เป็นชุดควบคุมลบ และสารละลาย etoposide เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ เป็นชุดควบคุมบวก โดยแต่ละชุดทดสอบทำการทดลอง 3 ซ้ำ บ่มจานเพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศ CO₂ 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับชุดทดสอบและชุดควบคุมลบ ส่วนชุดควบคุมบวกใช้เวลาบ่ม 36 ชั่วโมง หลังจากบ่มเซลล์ครบตามเวลาแล้ว ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง ล้างเซลล์ด้วย 1XPBS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ดูดของเหลวทิ้งแล้วเติม glutaraldehyde เข้มข้น 1% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มเซลล์ไว้ในที่มืดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นดูด glutaraldehyde ออกจากจานเลี้ยงเซลล์ ล้างเซลล์ด้วย 1XPBS แล้วดูดของเหลวทิ้ง ปีเปตต์ 1XPBS ปริมาตร 20 ไมโครลิตร หยดลงบนกระจกสไลด์ ปีเปตต์สี Hoechst 33342 ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร หยดลงผสมกับสารละลาย 1XPBS บนกระจกสไลด์ ใช้คีมคีบแผ่น cover slip ออกจากจานเลี้ยงเซลล์แล้วนำมาวางลงบนสีย้อมโดยหันด้านที่มีเซลล์มะเร็งเกาะอยู่คว่ำลงบนกระจกสไลด์ ทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 10 นาที ใช้น้ำยาทาเล็บเคลือบรอบ ๆ ด้านข้างของ cover slip ตรวจสอบจำนวนเซลล์ที่เกิด apoptotic nuclei ด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์

3.8 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญกับการสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของสายพันธุ์ A116-2^R และ B316-1^R

3.8.1 การเตรียมหัวเชื้อ (seed inoculum)

ราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ A116-2^R และ B316-1^R เลี้ยงบนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-14 วัน ขึ้นอยู่กับอัตราการเจริญของรา

3.8.2 ศึกษาการเจริญ (Growth) และการสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์

เตรียมอาหารเหลว PDB MEB (Malt Extract Broth) (ภาคผนวก ก หมายเลข 14) และน้ำสกัดจากใบปาล์ม (ภาคผนวก ก หมายเลข 15) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดทรงชมพูขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นตัดชิ้นรุ้นของราที่เตรียมได้ตามวิธีในข้อ 3.7.1 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร จำนวน 5 ชิ้น ถ่ายลงในอาหารเหลวทั้ง 3 ชนิด บ่มที่อุณหภูมิห้อง

ใน 2 สภาวะ คือ การบ่มเชื้อในสภาวะนิ่ง (static cultures) และบ่มเชื้อในสภาวะเขย่า (submerged shake cultures) ด้วยเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เพื่อเปรียบเทียบว่าปัจจัยทั้งสองข้างต้นมีผลต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของราเอนโดไฟต์หรือไม่ ในระหว่างการบ่มเชื้อเก็บตัวอย่างในวันที่ 0 1 3 6 9 12 15 18 21 24 27 และ 30 ตามลำดับ กรองเส้นใยออกด้วยกระดาษกรอง Whatman No 1 นำเส้นใยที่ติดอยู่บนกระดาษกรองเขี่ยลงในกระตงฟรอกซ์นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส จนมีน้ำหนักคงที่ บันทึกน้ำหนักของเส้นใยในแต่ละครั้งของการเก็บตัวอย่าง ส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อนำไปสกัดด้วย เอทิลแอลกอฮอล์ เก็บส่วนที่เป็นชั้นของตัวทำละลาย นำไประเหยตัวทำละลายภายใต้ระบบสุญญากาศด้วยเครื่องระเหยแบบหมุน (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส จนแห้งและละลายคราบสารสกัดด้วย DMSO เข้มข้น 20% ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เก็บสารสกัดไว้ในหลอดไมโครทิวป์ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบด้วยวิธี Agar well ตามวิธีข้อ 3.7.4.1 - 3.7.4.3 เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลาและน้ำหนักแห้งของเซลล์และความสัมพันธ์ระหว่างเวลาและการสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิด

3.9 การแยกองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัด

3.9.1 การแยกองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดด้วย Thin-layer Chromatography (TLC)

เป็นการเลือกระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสารปฏิชีวนะออกจากสิ่งเจือปนโดยใช้แผ่น TLC aluminium sheet รุ่น silica gel 60 F₂₅₄ และใช้ตัวทำละลาย เช่น เมทานอล เอทิลแอลกอฮอล์ คลอโรฟอร์ม และเฮกเซน เป็นตัวพา (developing) ในอัตราส่วนที่เหมาะสมในการแยกสารสกัดให้บริสุทธิ์ การตรวจสอบตำแหน่งของสารบนแผ่น TLC หลังจาก develop โดยอบแผ่น TLC ในภาชนะที่อิมมิดด้วยไอของไอโอดีน หรือส่องภายใต้รังสี ยูวี ที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร หรือพ่นด้วยสาร anisaldehyde ในกรดซัลฟิวริก หรือจุ่มด้วยสารละลายวานิลลิน (vanillin) หลังจากพ่นลมร้อนกับแผ่น TLC สีของสารจะปรากฏ จากนั้นทำการวัดระยะทางการเคลื่อนที่ของสารและคำนวณหาค่า retention factor (Rf)

3.10 การจำแนกราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ A116-2^R B316-1^R A 317^R A518-2^R B115^R
B127^R A119-1^R B419-1^R

3.10.1 การจำแนกราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ A116-2^R B316-1^R A 317^R A518-2^R
B115^R B127^R A119-1^R B419-1^R โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ใช้เทคนิค slide culture เพื่อศึกษาลักษณะของเส้นใย ลักษณะโครงสร้างสปอร์ เช่น การจัดเรียงตัวของสปอร์ จำนวนสปอร์ ลักษณะผิวสปอร์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านแล้วจำแนกชนิดของราตาม Barnett และ Hunter, 1987 ส่วนราเอนโดไฟต์ในสกุล *Xylaria* จัดจำแนกโดยเลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA MEA และ OA เพื่อศึกษาลักษณะสีของโคโลนี อัตราการเจริญของรา ตำแหน่งการเจริญของ stromata บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ลักษณะรูปร่างและสีของ stromata และการสร้างรงควัตถุ

3.10.2 การจำแนกราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ A116-2^R B316-1^R A 317^R A518-2^R
B115^R B127^R A119-1^R B419-1^R โดยศึกษาลักษณะทางอณูวิทยา

3.10.2.1 การสกัดจีโนมิก DNA ของรา

นำเส้นใยของราที่คัดเลือกมาสกัด DNA โดยวิธี Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) (Zho, และคณะ, 1999) เริ่มจากนำเส้นใยมาบดให้ละเอียดโดยใช้โกร่ง เติมนสารละลาย washing buffer (ภาคผนวก ข หมายเลข 5) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ถ่ายลงในหลอดไมโครเซ็นติพิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เทของเหลวส่วนบนทิ้งให้เหลือแต่ตะกอน เติมนสารละลาย washing buffer ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และปั่นเหวี่ยงซ้ำ เพื่อล้างตัวอย่างจนของเหลวส่วนบนใส เติมนสารละลาย 2X CTAB (ภาคผนวก ข หมายเลข 6) ปริมาตร 700 ไมโครลิตรไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมงเพื่อให้เซลล์แตก เติมนสารละลายคลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ ในอัตราส่วน 24: 1 (ภาคผนวก ข หมายเลข 7) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องเขย่าผสมสาร เพื่อกำจัดโปรตีน ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 8 นาที ถ่ายส่วนใสที่อยู่ชั้นบนใสลงในหลอดไมโครเซ็นติพิวจ์หลอดใหม่ เติมนสารละลายคลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ ในอัตราส่วน 24: 1 ปริมาตร 700 ไมโครลิตร อีกครั้งผสมให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 8 นาที ถ่ายส่วนใสที่อยู่ชั้นบนใสลงในหลอดไมโครเซ็นติพิวจ์หลอดใหม่ แล้วเติมนสารละลาย ไอโซโพรพานอล ปริมาตร 700 ไมโครลิตร แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อตกตะกอนกรดนิวคลีอิก เทส่วนใสทิ้งให้เหลือแต่ตะกอน เติมนเอทานอลเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์

ปริมาตร 500 ไมโครลิตร บั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อล้างตะกอนของกรดนิวคลีอิก เทส่วนใส่ทิ้ง ตากตะกอนให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เติมน้ำกลั่นปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ RNase ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ป่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เพื่อกำจัด RNA เติมสารละลาย PEG ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 8) ปริมาตร 60 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที บั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เเทส่วนใส่ทิ้งให้เหลือแต่ตะกอน DNA เติมเอธานอลเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร บั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อล้างตะกอน DNA ดูดสารละลายออก ทิ้งตะกอนให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เติมสารละลาย TE buffer (ภาคผนวก ข หมายเลข 9) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เพื่อละลายตะกอน DNA เก็บตัวอย่าง DNA ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ศึกษาในครั้งต่อไป

3.10.2.2 การเพิ่มจำนวน DNA ของราที่ตำแหน่ง ITS ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

นำ DNA ที่สกัดได้ตามวิธี ในข้อ 3.10.2.1 ทำปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR) เพื่อเพิ่มจำนวนชิ้นส่วน DNA ที่ตำแหน่ง ITS โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะ ITS3 ที่มีลำดับเบสเป็น 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3' และไพรเมอร์ ITS4 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' ตามลำดับ ทำสารละลาย PCR ให้มีปริมาตรรวมเป็น 10 ไมโครลิตร โดยมีส่วนประกอบของปฏิกิริยาดังแสดงใน ตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 ส่วนประกอบของสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR)

สาร	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
10X PCR buffer without MgCl ₂	1X	1.0
2 mM dNTP mixed	0.2 mM	1.0
5u/..Tag DNA polymerase	0.5 units/10	0.1
25 mM MgCl ₂	2.5 mM	1.0
20.M Primer I (ITS5)	1.5 ul	0.5
20..M primer II(ITS4)	1.5 ul	0.5
DNA template	-	1.0
Sterilized distilled water	-	4.9
ปริมาตรรวม		10

เมื่อได้ส่วนผสมทั้งหมดที่มีปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร นำไปทำปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มจำนวนชิ้นส่วน DNA ที่ตำแหน่ง ITS ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณ DNA อัดโนมิติ (Authorized DNA thermal cycler) โดยได้กำหนดภาวะดังต่อไปนี้

Initial denaturation	94 องศาเซลเซียส	2 นาที	
Amplification			
Denaturation	94 องศาเซลเซียส	1.5 นาที	
Annealing	54 องศาเซลเซียส	2 นาที	38 รอบ
Extension	72 องศาเซลเซียส	2 นาที	
Final Extension	72 องศาเซลเซียส	10 นาที	
Hold	4 องศาเซลเซียส		

ตรวจสอบผลการเพิ่มจำนวน DNA ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoreses) โดยการแยกชิ้นส่วน DNA บนอะกาโรสเจล 1 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 12) ใน 0.5 X TBE buffer (ภาคผนวก ข หมายเลข 10) เติมเอธิเดียมโบรไมด์ 1 ไมโครลิตร (ภาคผนวก ข หมายเลข 11) ต่ออะกาโรสเจล 30 มิลลิลิตรใช้กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที และใช้ชิ้นส่วน DNA มาตรฐานขนาด 100 bp + 1.5 kb DNA ladder ตรวจสอบขนาดชิ้นส่วน DNA ที่เกิดขึ้นภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร และส่งชิ้นส่วนดีเอ็นเอไปวิเคราะห์ที่บริษัท Marcrogen จำกัด ประเทศญี่ปุ่น



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การคัดแยกราเอนโดไฟต์จากใบปาล์ม

คัดแยกราเอนโดไฟต์จากใบปาล์ม 2 ชนิด ได้แก่ *A. pinnata* และ *B. machadonis* จากอุทยานแห่งชาติเขาลวง จังหวัดนครศรีธรรมราช ในช่วงฤดูแล้ง (เดือนเมษายน) และฤดูฝน (เดือนธันวาคม) ปี พ.ศ 2550 ได้ราเอนโดไฟต์จำนวน 516 ไอโซเลต จำนวนสกุลราเอนโดไฟต์และจำนวนไอโซเลตทั้งหมดของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้มาจากปาล์มทั้ง 2 ชนิด ในฤดูแล้ง และฤดูฝน สามารถจัดจำแนกรราเอนโดไฟต์ทั้งหมด 9 สกุล 28 ชนิด ได้แก่ *Aspergillus* spp. *Cladosporium* sp. *Colletotrichum* spp. *Penicillium* sp. *Glomerella* sp. *Fusarium* sp. *Pestalotiopsis* sp. *Phomopsis* sp. *Xylaria* spp. ราทุกสกุลแสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาต่างภาคผนวก ค ภาพที่ 4.1 มีราเอนโดไฟต์ที่ไม่สามารถจำแนกชนิดได้จำนวน 3 กลุ่ม เนื่องจากไม่แสดงการสร้างสปอร์ทั้งแบบอาศัย และไม่อาศัยเพศในอาหารเลี้ยงเชื้อทุกชนิดที่ทดสอบ ค (ตารางที่ 4.1) จากตารางที่ 4.1 พบว่าในฤดูแล้งพบจำนวนไอโซเลตราสกุล *Colletotrichum* spp. มากที่สุดในปาล์ม *A. pinnata* รองลงมาอยู่ในสกุล *Phomopsis* sp. ส่วนสกุลราที่มีอัตราการเกิดไอโซเลตต่ำสุดมีสองสกุล คือ *Cladosporium* sp. และ *Penicillium* sp. ส่วนในฤดูฝนพบว่าราในสกุล *Xylaria* แสดงการเกิดจำนวนไอโซเลตสูงที่สุด และมีความหลากหลาย 13 ชนิด โดยพบรา *Xylaria* sp1. เกิดจำนวนไอโซเลตสูงที่สุด รองลงมาเป็นราในสกุล *Aspergillus* spp. ในส่วนของใบปาล์ม *B. machadonis* ในฤดูแล้งพบราสกุล *Colletotrichum* spp. แสดงการเกิดจำนวนไอโซเลตสูง รองลงมาคือราสกุล *Xylaria* sp.1 ส่วนราสกุลอื่นพบการเกิดจำนวนไอโซเลตเพียงเล็กน้อย ในฤดูฝนพบราในสกุล *Xylaria* spp. มีอัตราการเกิดจำนวนไอโซเลตสูงสุดและพบมีความหลากหลาย 8 ชนิด รองลงมาคือราสกุล *Aspergillus* sp

ตารางที่ 4.1 แสดงจำนวนไอโซเลตของราเอนโดไฟต์แต่ละสกุลจากใบปาล์ม *A. pinnata* และ *B. machadonis* ในช่วงฤดูแล้งและฤดูฝน จากอุทยานแห่งชาติเขาหลวง ปี พ.ศ. 2550

ราเอนโดไฟต์	<i>Arenga pinnata</i>		<i>Borassodendron machadonis</i>	
	ฤดูแล้ง	ฤดูฝน	ฤดูแล้ง	ฤดูฝน
	จำนวนไอโซ	จำนวนไอโซ	จำนวนไอโซ	จำนวนไอโซ
	เลต	เลต	เลต	เลต
<i>Aspergillus</i> sp.	4	23	0	19
<i>Cladosporium</i> sp.	1	0	0	0
<i>Colletotrichum</i>	23	0	44	1
<i>Colletotrichum</i>	2	0	2	0
<i>Colletotrichum</i> sp.	0	3	1	0
<i>Glomerella</i> sp.	0	0	1	0
<i>Fusarium</i> sp.	0	0	1	0
<i>Penicillium</i> sp.	1	3	0	2
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	3	3	0	2
<i>Phomopsis</i> sp.	10	6	1	2
<i>Xylaria</i> sp.1	4	115	35	105
<i>Xylaria</i> sp.2	0	20	0	10
<i>Xylaria</i> sp.3	0	3	0	9
<i>Xylaria</i> sp.4	0	13	0	0
<i>Xylaria</i> sp.5	0	1	0	4
<i>Xylaria</i> sp.6	0	3	0	0
<i>Xylaria</i> sp.7	0	2	0	0
<i>Xylaria</i> sp.8	0	2	0	0
<i>Xylaria</i> sp.9	0	1	0	0
<i>Xylaria</i> sp.10	0	1	0	0
<i>Xylaria</i> sp.11	0	0	0	1
<i>Xylaria</i> sp.12	0	0	0	1
<i>Xylaria</i> sp.13	0	0	0	1
<i>Xylaria</i> sp.14	0	0	0	1
<i>Xylaria</i> sp.15	0	1	0	0
<i>Mycelia sterilia</i>	3	0	0	1
<i>Mycelia sterilia</i>	0	0	3	1
<i>Mycelia sterilia</i>	6	2	8	1
จำนวนไอโซเลตทั้งหมด	57	202	95	162

4.2 การศึกษาความหลากหลายราเอนโดไฟต์

จากการศึกษาความหลากหลายของราเอนโดไฟต์จากอัตราการผลิตไฮโซเลตราแต่ละสกุลที่พบในใบปาล์มทั้ง 2 ชนิด เพื่อศึกษากลุ่มเด่นของรา จำนวนและความหลากหลายของราแต่ละสกุลและศึกษาอัตราความถี่การเกิดโคโลนีเพื่อตรวจสอบความสม่ำเสมอของการเกิดโคโลนีของราแต่ละสกุลในใบปาล์มทั้ง 2 ชนิด ในฤดูแล้ง และฤดูฝน ในพื้นที่อุทยานแห่งชาติเขาหลวง โดยพบว่าในใบปาล์ม *A. pinnata* พบราเอนโดไฟต์ 7 สกุล ได้แก่ *Aspergillus* spp. *Cladosporium* sp. *Colletotrichum* spp. *Penicillium* sp. *Pestalotiopsis* spp. *Phomopsis* spp. *Xylaria* sp.1 และราเอนโดไฟต์ที่ไม่สามารถจำแนกชนิดได้ 2 กลุ่ม อัตราการผลิตไฮโซเลตราทั้งหมดของราทุกสกุลที่พบในใบปาล์ม *A. pinnata* เท่ากับ 38% พบราสกุล *Colletotrichum* sp.1 แสดงจำนวนอัตราการผลิตไฮโซเลตราและการเกิดอัตราความถี่ของโคโลนีสูงในฤดูแล้งเท่ากับ 15.3 % และ 15.3 % ตามลำดับ รองลงมาคือราในสกุล *Phomopsis* sp. พบอัตราการผลิตไฮโซเลตราเท่ากับ 6.7 % แต่อัตราความถี่ของการเกิดโคโลนีเพียง 3.3 % และความถี่โคโลนีของการเกิดโคโลนีราเอนโดไฟต์สกุลอื่นๆแสดงดังตาราง 4.2 และจากการศึกษาความหลากหลายราเอนโดไฟต์ในใบปาล์ม *B. machadonis* ในฤดูแล้ง พบราเอนโดไฟต์ 5 สกุล ได้แก่ *Colletotrichum* spp. *Glomerella* sp. *Fusarium* sp. *Phomopsis* spp. *Xylaria* sp.1 และ ราเอนโดไฟต์ที่ไม่สามารถจัดจำแนกชนิดได้ 2 กลุ่ม โดยอัตราการผลิตไฮโซเลตราทั้งหมดของราทุกสกุลเท่ากับ 63% ราสกุล *Colletotrichum* sp.1 แสดงอัตราการผลิตไฮโซเลตราสูงสุดเท่ากับ 30 % และ อัตราการผลิตความถี่ของโคโลนีเท่ากับ 23 % เช่นเดียวกันกับใบปาล์ม *A. pinnata* ตามด้วยราในสกุล *Xylaria* sp.1 พบอัตราการผลิตไฮโซเลตราเท่ากับ 23.3 % อัตราความถี่ของการเกิดโคโลนีเท่ากับ 22 % แต่ราสกุล *Xylaria* sp.1 กลับพบน้อยมากในปาล์ม *A. pinnata* แสดงดังตาราง 4.3

ในฤดูฝนในใบปาล์ม *A. pinnata* พบราเอนโดไฟต์ 6 สกุล ได้แก่ *Aspergillus* spp. *Colletotrichum* spp. *Penicillium* sp. *Pestalotiopsis* spp. *Phomopsis* spp. *Xylaria* spp. และราเอนโดไฟต์ที่ไม่สามารถจัดจำแนกชนิดได้ 1 กลุ่ม อัตราการผลิตไฮโซเลตราทั้งหมดของราทุกสกุลเท่ากับ 134% ราเอนโดไฟต์สกุล *Xylaria* sp. แสดงอัตราการผลิตไฮโซเลตรา และอัตราความถี่ของการเกิดโคโลนีมากที่สุด โดยเฉพาะราเอนโดไฟต์ *Xylaria* sp. 1 พบว่ามีอัตราการผลิตไฮโซเลตรา และ อัตราความถี่ของการเกิดโคโลนี เท่ากับ 76.6 % 60.6% ตามลำดับ ตามด้วยราเอนโดไฟต์ *Aspergillus* sp. และ *Xylaria* sp. 2 ซึ่งแสดงอัตราการผลิตไฮโซเลตราเท่ากับ 14.7% และ 13.3 % ตามลำดับ แต่อัตราความถี่การเกิดโคโลนีของราเอนโดไฟต์ *Xylaria* sp.2 กลับสูงกว่าราเอนโดไฟต์ *Aspergillus* spp. ซึ่งมีค่าเท่ากับ 11.3% และ 10.6% ตามลำดับ แสดงดังตาราง 4.2 ส่วนในใบปาล์ม *B. machadonis* พบราเอนโดไฟต์ 6 สกุล ได้แก่ *Aspergillus* spp. *Colletotrichum*

spp. *Penicillium* spp. *Pestalotiopsis* spp. *Phomopsis* spp. *Xylaria* spp. และ ราเอนโดไฟต์ที่สามารถจัดจำแนกชนิดได้ 3 กลุ่ม อัตราการเกิดไอโซเลตรวมทั้งหมดของราทุกสกุลเท่ากับ 108% พบราเอนโดไฟต์สกุล *Xylaria* spp. แสดงอัตราการเกิดไอโซเลตและอัตราความถี่ของการเกิดโคโลนีมากที่สุดโดยเฉพาะราเอนโดไฟต์ *Xylaria* sp.1 พบว่ามีอัตราการเกิดไอโซเลตและอัตราความถี่ของการเกิดโคโลนี 70.6 % 53.0% ตามลำดับ ตามด้วยราเอนโดไฟต์ *Aspergillus* sp. และ *Xylaria* sp. 2 ซึ่งแสดงอัตราการเกิดไอโซเลตเท่ากับ 12.6% และ 6.7 % ตามลำดับ และอัตราความถี่ของการเกิดโคโลนีเท่ากับ 7.3% และ 4.6% ตามลำดับ แต่ในปาล์ม *B. machadonis* กลับพบว่า *Xylaria* sp.3 แสดงอัตราความถี่ของการเกิดโคโลนีเท่ากับ 6.0% ซึ่งสูงกว่าอัตราความถี่ของการเกิดโคโลนีของ ราเอนโดไฟต์ *Xylaria* sp.2

จากผลการเปรียบเทียบความแปรผันของปัจจัยระหว่างฤดูกาลและชนิดของพืชต่อการเกิดจำนวนไอโซเลตราเอนโดไฟต์พบว่าฤดูกาลมีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของจำนวนการเกิดไอโซเลต ในขณะที่ชนิดของพืชไม่มีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อการเกิดจำนวนไอโซเลต และเมื่อเปรียบเทียบปัจจัยของฤดูกาลต่อการเกิดจำนวนไอโซเลตในปาล์มแต่ละชนิด พบว่าฤดูกาลส่งผลต่อการเกิดจำนวนของไอโซเลตในปาล์มแต่ละชนิดอย่างมีนัยสำคัญ แสดงผลดังตารางที่ 4.1 ภาคผนวก ก

ตารางที่ 4.2 แสดงจำนวนเชื้อราแอสเพอซิลลัสจากใบปาล์ม *A. pinnata* ในฤดูแล้ง และฤดูฝน ปี พ.ศ. 2550

ราแอสเพอซิลลัส	<i>A. pinnata</i>													
	ใบปาล์ม / ฤดูกาล										IR (%)		CR (%)	
	1		2		3		4		5					
	dr	we	dr	we	dr	we	dr	we	dr	we	dry	wet	dry	wet
<i>Aspergillus</i> sp.	0	8	2	3	0	3	2	5	0	4	2.7	14.7	2.7	10.6
<i>Cladosporium</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0.7	-	0.7	-
<i>Colletotrichum</i>	6	0	3	0	6	0	2	0	6	0	15.3	-	15.3	-
<i>Colletotrichum</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.3	-	0.7	-
<i>Colletotrichum</i>	0	2	0	0	0	0	0	0	0	1	-	2.0	-	2.0
<i>Glomerella</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-
<i>Fusarium</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-
<i>Penicillium</i> sp.	0	2	0	0	1	0	0	0	0	1	0.7	2.0	0.6	1.3
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	0	1	1	0	0	2	2	0	0	0	2	2.0	2.7	2
<i>Phomopsis</i> sp.	0	1	0	1	2	0	3	2	5	2	6.7	4.0	3.3	4
<i>Xylaria</i> sp.1	1	19	2	14	0	32	0	22	1	28	2.7	76.6	2.7	60.6
<i>Xylaria</i> sp.2	0	5	2	3	0	8	0	3	0	1	-	13.3	-	11.3
<i>Xylaria</i> sp.3	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	-	2.0	-	2.0
<i>Xylaria</i> sp.4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	13	-	8.7	-	4.6
<i>Xylaria</i> sp.5	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	-	0.7	-	0.7
<i>Xylaria</i> sp.6	0	0	0	0	0	1	0	2	0	0	-	2.0	-	2.0
<i>Xylaria</i> sp.7	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	-	1.3	-	1.3
<i>Xylaria</i> sp.8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	-	1.3	-	0.7
<i>Xylaria</i> sp.9	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0.7	-	0.7
<i>Xylaria</i> sp.10	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	-	0.7	-	0.7
<i>Xylaria</i> sp.12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-
<i>Xylaria</i> sp.12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-
<i>Xylaria</i> sp.13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-
<i>Xylaria</i> sp.14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-
<i>Xylaria</i> sp.15	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	-	0.7	-	0.7
<i>Mycelia sterilia</i>	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2.0	-	2.0	
<i>Mycelia sterilia</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		-		
<i>Mycelia sterilia</i>	2	0	0	1	1	1	2	0	1	0	4.0	1.3	4.0	1.3
จำนวนของเชื้อรา	13	39	10	28	11	48	11	34	13	53	38.0	134	-	-

IR= อัตราการเกิดเชื้อรา CR = อัตราความถี่ของการเกิดเชื้อรา

ตารางที่ 4.3 แสดงจำนวนไอโซเลตราเอนโดไฟต์จากใบปาล์ม *B. machadonis* ในฤดูแล้ง และฤดูฝน ปี พ.ศ. 2550

ราเอนโดไฟต์	<i>B. machadonis</i>													
	ใบปาล์ม / ฤดูกาล										IR (%)		CR (%)	
	1		2		3		4		5					
	dry	we	dry	we	dry	we	dry	we	dry	we	dry	we	dry	we
<i>Aspergillus</i> spp.	0	5	0	5	0	4	0	1	0	3	-	12.	-	7.3
<i>Cladosporium</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-
<i>Colletotrichum</i>	7	0	13	0	4	0	10	1	10	0	30.0	0.7	27.0	0.7
<i>Colletotrichum</i>	3	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1.3	-	1.3	-
<i>Colletotrichum</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0.7	-	0.7	-
<i>Glomerella</i> sp.	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	-	0.7	-
<i>Fusarium</i> sp.	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0.7	-	0.7	-
<i>Penicillium</i> sp.	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	-	1.3	-	0.7
<i>Pestalotiopsis</i>	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	-	1.3	-	1.3
<i>Phomopsis</i> spp.	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0.7	1.3	0.7	0.7
<i>Xylaria</i> sp.1	10	21	5	24	7	18	6	24	5	12	23.3	70.	33	53.
<i>Xylaria</i> sp.2	0	2	2	4	0	1	0	0	0	3	-	6.7	-	4.6
<i>Xylaria</i> sp.3	0	0	0	0	0	0	0	2	0	7	-	6.0	-	6.0
<i>Xylaria</i> sp.4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-
<i>Xylaria</i> sp.5	0	0	0	3	0	0	0	1	0	0	-	2.7	-	2.7
<i>Xylaria</i> sp.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-
<i>Xylaria</i> sp.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-
<i>Xylaria</i> sp.8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-
<i>Xylaria</i> sp.9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-
<i>Xylaria</i> sp.10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-
<i>Xylaria</i> sp.12	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0.7	-	0.7
<i>Xylaria</i> sp.12	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	-	0.7	-	0.7
<i>Xylaria</i> sp.13	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	-	0.7	-	0.7
<i>Xylaria</i> sp.14	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	-	0.7	-	0.7
<i>Xylaria</i> sp.15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-
<i>Mycelia sterilia</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	-	0.7	-	0.7
<i>Mycelia sterilia</i>	0	0	0	0	3	1	0	0	0	0	2.0	0.7	2.0	0.7
<i>Mycelia sterilia</i>	2	0	1	1	2	0	2	0	1	0	5.3	0.7	5.3	0.7
จำนวนของไอโซเลต	21	29	23	39	16	29	18	31	17	34	63.3	10	-	-

IR= อัตราการเกิดไอโซเลต CR = อัตราความถี่ของการเกิดโคโลนี

4.3 ทดสอบความสามารถของสารสกัดราเอนโดไฟต์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ

นำราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากใบปาล์มทั้งสองชนิดโดยการสุ่มเลือกตัวแทนราในแต่ละสกุล จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกัน แต่สำหรับราในสกุล *Xylaria* spp. เนื่องจากการแยกความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาค่อนข้างยากในการเลี้ยงด้วยอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ ซึ่งบางครั้งราเอนโดไฟต์หลายสายพันธุ์ในสกุล *Xylaria* spp. ไม่สร้างสปอร์มาในอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อทดสอบทุกชนิดซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของราในสกุล *Xylaria* และเนื่องจากราในสกุลนี้แสดงจำนวนสายพันธุ์ของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากใบปาล์มสูงมากในการศึกษาด้านความหลากหลายทางชีวภาพของรา ดังนั้นจึงมุ่งให้ความสนใจและความสำคัญกับราในสกุลนี้ค่อนข้างสูงกว่าราเอนโดไฟต์สกุลอื่นๆ ราเอนโดไฟต์จำนวน 247 สายพันธุ์ นำมาเลี้ยงในอาหารเหลว PDB เป็นเวลา 30 วัน สกัดน้ำเลี้ยงเชื้อและเส้นใยราด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ระเหยเอทิลแอลกอฮอล์ และละลายสารสกัดด้วย 20% DMSO ได้สารสกัดทั้งหมด 247 ชนิด นำสารสกัดมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ 5 ชนิด คือ

B. cereus *S. aureus* *E. coli* *P.aeruginosa* และ *C.albicans* โดยวิธี Agar well จากการทดสอบพบว่าราเอนโดไฟต์แต่ละสายพันธุ์สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้แตกต่างกันดังแสดงใน ตารางที่ 4.4 และจากผลการทดสอบคัดเลือกราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ที่สร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพยับยั้งจุลินทรีย์จากสารสกัดราเอนโดไฟต์จำนวน 247 สายพันธุ์ สามารถแบ่งกลุ่มราเอนโดไฟต์ที่มีความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ได้ทั้งหมด 5 กลุ่ม คือ

- กลุ่มที่ 1 ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกแกรมลบและยีสต์
- กลุ่มที่ 2 ยับยั้งทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ
- กลุ่มที่ 3 ยับยั้งเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวกและยีสต์
- กลุ่มที่ 4 ยับยั้งเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก
- กลุ่มที่ 5 ไม่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้

จำนวนสายพันธุ์ราเอนโดไฟต์ทั้งหมดแบ่งตามกลุ่มตามสกุลของรา ที่มีความสามารถในการออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบแต่ละกลุ่มแสดงดังตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.4 ความสามารถในการออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของสารสกัดจากราเอนโดไฟต์
แยกได้จากใบปาล์ม *A. pinatta* และ *B. machadonis*

ราเอนโดไฟต์	ระดับการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ				
	<i>B. cereous</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
A111-D	++	++	++	++	+
A1110-D	+	+			
A1110 ^R	+	-	-	-	+
A112-D	+	+	-	-	-
A113 ^R	+	+	-	-	++
A113-2 ^R	+	-	-	+	+
A115-D	+	-	++	-	-
A116-1 ^R	++	+	++	++	+
A116-2 ^R	++++	++++	++++	+++	++
A117-1 ^R	+	+	+	+	-
A117-2 ^R	+	+			
A118-1 ^R	+	-	+	++	+
A118-2 ^R	+	-	-	-	-
A119 ^R	+	-	-	-	-
A119-2 ^R	+	-	-	-	-
A1210 ^R	+	-	-	-	-
A122 ^R	+	+	+	++	-
A123 ^R	+	-	-	-	-
A125-D	-	-	-	-	-
A125-1 ^R	+	-	-	-	+
A125-2 ^R	+	-	-	-	+
A126-1 ^R	+	+	-	+	+
A127-D	+	-	+	+	-
A128-1 ^R	+	-	-	-	-
A1310-D	+	+	-	-	+
A131-1 ^R	+	-	+	+	+
A132 ^R	+	+	-	-	+

ตารางที่ 4.4 (ต่อ) ความสามารถในการออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของสารสกัดจากราเอนโดไฟต์แยกได้จากใบปาล์ม *A. pinatta* และ *B. machadonis*

ราเอนโดไฟต์	ระดับการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ				
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
A133 ^R	-	-	-	-	-
A134 ^R	+	-	-	-	-
A135-1 ^R	+	-	-	-	-
A135-3 ^R	+	-	-	-	++
A137 ^R	+	-	-	-	-
A147 ^R	+	-	-	-	-
A211-D	-	-	-	-	-
A211 ^R	+	+	-	-	-
A212-D	+	-	-	-	-
A215 ^R	+	-	-	-	+
A216 ^R	+	+	-	+	+
A217 ^R	+	-	-	-	++
A218 ^R	+	-	-	-	-
A2213-1 ^R	+	+	+	++	+
A222 ^R	+	+	-	-	+
A223 ^R	+	+	-	-	++
A224-D	+	++	++	-	-
A224 ^R	+	-	-	-	++
A225-D	+	+	-	-	-
A226 ^R	+	+	-	-	+
A227 ^R	+	+	+	+	+
A231 ^R	+	+	+	+	-
A233 ^R	+	+	-	-	-
A238 ^R	++	+	+	+	-
A239 ^R	+	-	-	-	-
A311 ^R	++	++	+++	++	+
A312 ^R	+	+	-	-	+

ตารางที่ 4.4 (ต่อ) ความสามารถในการออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของสารสกัดจากราเอนโดไฟต์แยกได้จากใบปาล์ม *A. pinatta* และ *B. machadonis*

ราเอนโดไฟต์	ระดับการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ				
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
A313-1 ^R	+	+	+	-	+
A313-2 ^R	+	+	-	-	-
A314 ^R	+	-	-	-	-
A315-1 ^R	+	+	+	+	
A315-2 ^R	+	+	-	-	-
A316-2 ^R	+	-	-	-	-
A317 ^R	+	-	-	-	+
A318-D	++	++++	+++	++	++
A319-D	+	++	++	+	+
A319 ^R	+	-	-	-	-
A321-1 ^R	+	+	-	-	-
A323 ^R	+	-	-	-	-
A324 ^R	+	+	-	-	-
A326-2 ^R	+	-	-	-	-
A328-1	+	+	-	-	-
A328-1 ^R	+	-	+	++	-
A328-2	+	-	-	-	-
A328-2 ^R	++	+	++	++	-
A329 ^R	+	-	-	-	+
A3310-1 ^R	+	+	-	+	+
A335 ^R	1	-	-	-	-
A338-D	+	++	-	+	-
A338 ^R	++	+	++	++	+
A412 ^R	+	-	-	-	-
A413-1 ^R	+	+	+	+	+
A414 ^R	+	+	-	-	-
A416-1 ^R	+	-	-	-	-

ตารางที่ 4.4 (ต่อ) ความสามารถในการออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของสารสกัดจากราเอนโดไฟต์แยกได้จากใบปาล์ม *A. pinatta* และ *B. machadonis*

ราเอนโดไฟต์	ระดับการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ				
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
A418 ^R	-	-	-	-	-
A4210-D	++	++	+++	++	+
A424-D	+	+	-	-	-
A425 ^R	+	-	+	+	
A427 ^R	++	++	++	++	+
A4310 ^R	+	+	-	-	-
A431-2 ^R	+	-	-	-	-
A432 ^R	+	-	+	+	
A434-D	+	-	-	-	-
A435 ^R	-	-	-	-	-
A436 ^R	+	-	+	+	+
A438 ^R	+	-	-	-	-
A439-D	+	-	-	+	-
A439 ^R	+	-	+	+	-
A511 ^R	+	-	+	+	
A512-D	+	-	-	-	-
A513 ^R	+	-	-	-	-
A514-2 ^R	+	+	+	++	+
A518-1 ^R	+		-	+	-
A518-2 ^R	+	-	-	-	-
A524-D	++++	++++	++++	+++	++
A538-D	+++	++++	+++	++	+
B 121-D	+	-		+	
B111-D	+	-	-	-	-
B111-1 ^R	+	-	-	-	-
B112-D	+	+	-	-	-

ตารางที่ 4.4 (ต่อ) ความสามารถในการออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของสารสกัดจากราเอนโดไฟต์แยกได้จากใบปาล์ม *A. pinatta* และ *B. machadonis*

ราเอนโดไฟต์	ระดับการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ				
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
B113-1 ^R	+	+	-	-	-
B115 ^R	+	-	-	-	-
B116-1 ^R	+	-	-	-	-
B117-D	++++	++++	++++	++++	+++
B118-1-D	++	-	+	+	+
B118-2-D	+	-	+	+	+
B119-D	+	-	-	-	-
B119-1 ^R	+	-	-	-	-
B119-3 ^R	+	-	-	-	-
B1210-D	+	+	-	-	-
B122-1	+	-	-	-	+
B123-D	+	+	-	-	-
B127-D	+	-	-	-	-
B127 ^R	+	-	-	-	-
B129-D	+	-	-	-	-
B129 ^R	+	-	-	-	-
B131-D	+	-	-	-	-
B131-D	+	-	-	-	-
B1310 ^R	+	-	-	-	-
B133-D	+	-	-	-	-
B134 ^R	+	-	-	-	-
B135-D	+	-	-	-	-
B136-1 ^R	-	-	-	-	-
B137-D	++	++	+	++	+
B138-D	+	+	-	-	-

ขตารางที่ 4.4 (ต่อ) ความสามารถในการออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของสารสกัดจากราเอนโดไฟต์แยกได้จากใบปาล์ม *A. pinatta* และ *B. machadonis*

ราเอนโดไฟต์	ระดับการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ				
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
B138-1 ^R	+	-	-	-	-
B138-2 ^R	+	-	-	-	-
B211-1 ^R	+	-	-	-	+
B212-D	+	-	-	-	-
B212-1 ^R	+	+	-	-	-
B212-2 ^R	-	-	-	-	-
B212-3 ^R	+	+	+	+	-
B213 ^R	+	-	-	-	++
B214-D	-	-	-	-	-
B214 ^R	+	+	-	-	-
B215-D	-	-	-	-	-
B215 ^R	+	-	-	-	-
B216-D	-	-	-	-	-
B221 ^R	+	-	+	-	-
B2210	+	+	-	-	-
B222-D	+	+	-	-	-
B222-1 ^R	+	+	-	-	-
B222-2 ^R	+	+	+	+	++
B224-D	++++	++++	++++	++	++
B225-2 ^R	+	-	-	-	+
B226-D	+	-	-	-	-
B227-D	+	-	-	-	-
B227-1 ^R	+	-	-	-	-
B228 ^R	+	+	-	-	-
B229-D	+	-	-	-	-

ตารางที่ 4.4 (ต่อ) ความสามารถในการออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของสารสกัดจากราเอนโดไฟต์แยกได้จากใบปาล์ม *A. pinatta* และ *B. machadonis*

ราเอนโดไฟต์	ระดับการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ				
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
B231-D	+	+	-	-	-
B2310 ^R	+	-	-	-	+
B231-1 ^R	+	+	+	+	-
B232-2 ^R	+	-	+	+	++
B233 ^R	+	-	-	-	-
B233 ^R	+	-	-	-	-
B234-D	+	+	-	-	-
B234-D	+	+	+	-	-
B234-2	+	+	-	-	-
B235-1	+++	++++	++++	+++	++
B237-1 ^R	+	-	-	-	+
B238-D	++++	+++	++++	++	+
B311-D	+	+	-	-	-
B3110 ^R	+	+	+	+	-
B312-D	+	-	-	-	-
B313-1-D	+	+	-	-	-
B313-2-D	+	-	-	-	-
B315-1 ^R	+	-	-	-	-
B315-2 ^R	+	-	-	-	-
B316-D	++	++	++	++	+
B316-1 ^R	++++	++++	++++	+++	+++
B316-2 ^R	+	+	+	+	+
B317-D	+	-	-	-	-
B317 ^R	+	-	-	-	-
B317-2 ^R	+	-	-	-	-
B318 ^R	+	+	+	++	+

ตารางที่ 4.4 (ต่อ) ความสามารถในการออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของสารสกัดจากราเอนโดไฟต์แยกได้จากใบปาล์ม *A. pinatta* และ *B. machadonis*

ราเอนโดไฟต์	ระดับการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ				
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
B319 ^R	-	-	-	-	-
B321 ^R	-	-	+		-
B3210	+	+	+	+	-
B3210 ^R	++	+	++	++	++
B322 ^R	+	-	-	-	-
B322-2	+	-	-	-	-
B326-1 ^R	+	-	-	-	-
B327-D	+	-	-	-	-
B327 ^R	+	+	-	-	-
B328-D	+	++	++	-	-
B329-D	-	-	-	-	-
B329 ^R	+	-	-	-	-
B331 ^R	++	+	++	++	+
B331-2 ^R	++	++	+++	+++	+++
B332 ^R	+	-	-	-	-
B333-1 ^R	+	+	+	+	
B333-2 ^R	+	-	-	-	-
B335 ^R	+	+	+	+	-
B336 ^R	+	-	-	-	+
B337-1 ^R	+	-	-	-	
B338-D	+	+	-	-	-
B338 ^R	+	-	+	++	
B411-D	+	+	-	+	-
B411 ^R	+	-	-	-	-
B4110-D	+	+	-	-	-

ตารางที่ 4.4 (ต่อ) ความสามารถในการออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของสารสกัดจากราเอนโดไฟต์แยกได้จากใบปาล์ม *A. pinatta* และ *B. machadonis*

ราเอนโดไฟต์	ระดับการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ				
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
B4110 ^R	+	-	-	++	-
B412 ^R	+	-	-	-	-
B414-D	+	+	-	+	++
B414-2 ^R	+	++	+	++	+
B416 ^R	+	-	-	-	-
B417-1 ^R	+	-	-	-	+
B417-1 ^R	+	-	-	-	+
B418 ^R	+	+	+	+	-
B419-D	+	+	-	+	+
B419 ^R	+	-	-	-	+
B422-1 ^R	++	++	++	++	+
B423 ^R	+	-	-	+	+
B424-1 ^R	+	+	-	-	-
B425-1 ^R	+	+	+	+	-
B426-1 ^R	+	+	+	+	-
B427-D	+	++	-	+	-
B427-D	++	++	-	+	+
B428-D	+	+	-	-	-
B429 ^R	+	+	-	-	-
B431 ^R	+	-	-	-	-
B432-D	-	-	-	-	-
B433-D	-	-	-	-	-
B434-1-D	+		-	-	-
B434-2-D	+	+	-	+	+
B435-D	++	++	++	+	+

ตารางที่ 4.4 (ต่อ) ความสามารถในการออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของสารสกัดจากราเอนโดไฟต์แยกได้จากใบปาล์ม *A. pinatta* และ *B. machadonis*

ราเอนโดไฟต์	ระดับการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ				
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
B438 ^R	+	-	-	-	-
B439-D	+	+	-	-	-
B512 ^R	+	-	-	-	-
B513-D	+	+	-	-	-
B513 ^R	+	+	+	++	++
B517-1	+	+	-	-	-
B518-D	+	-	-	-	-
B518-1 ^R	+	+	-	-	+
B518-D	+	-	-	-	-
B519-D	+	-	-	-	-
B521-D	++	++	-	-	-
B5210 ^R	+	+	-	-	-
B522 ^R	+	+	-	-	+
B525-D	+	-	-	-	-
B528-D	+	+	-	+	-
B531-1 ^R	+	-	-	-	+
B535-D	+	-	-	-	-
B535 ^R	+	-	-	-	-
B539-D	+	+	-	-	-
B539 ^R	+	-	-	-	-

++++ ความกว้างของ Inhibition zone 30 มิลลิเมตรขึ้นไป
 +++ ความกว้างของ Inhibition zone 26 - 30 มิลลิเมตร
 ++ ความกว้างของ Inhibition zone 16 - 25 มิลลิเมตร
 + ความกว้างของ Inhibition zone 9 - 15 มิลลิเมตร
 - ไม่แสดงการยับยั้ง

ตารางที่ 4.5 จำนวนสายพันธุ์ราเอนโดไฟต์ที่คัดเลือกสำหรับใช้ทดสอบความสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ

กลุ่ม จุลินทรีย์ทดสอบ	สายพันธุ์ราเอนโดไฟต์แบ่งตามลักษณะสัณฐานวิทยา								
	<i>Aspergillus</i> sp	<i>Chadosporium</i> sp	<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	<i>Phomopsis</i> sp	<i>Xylaria</i> sp.	<i>Mycelia sterilia</i>	
<p>กลุ่มที่ 1</p> <p>ยับยั้งแบคทีเรียแกรม บวก (<i>B. cereus</i> S. <i>aureus</i>) แกรมลบ (<i>E. coli</i> <i>P. aeruginosa</i>) ยีสต์ (<i>C. albicans</i>)</p>	<p>A427^R</p> <p>B414^R</p>	-	<p><u>A524-D</u> <u>A538-D</u></p> <p>B117-D B137</p> <p><u>B 224-D</u> <u>B235-1D</u></p> <p><u>B238 -D</u> B316-D</p> <p>B435-D B118-1^R</p> <p>B118-2^RB414</p> <p>B427</p>	-	-	-	<p>A318-D</p> <p>A319-D</p>	<p>A116-1^R <u>A116-2^R</u> A113-2^R</p> <p>A118-1^R A131-1^R A132^R</p> <p>A216^R A227^R A311^R</p> <p>A313-1^R A413-1^R A338^R</p> <p>A3310-1^R A436^R, A514-2^R</p> <p>B222-2^R, B232-2^R</p> <p><u>B316-1^R</u> B316-2^R, B318^R</p> <p>B3210^R B331^R <u>B331-2^R</u></p> <p>B414-2^R B422-1^R B425-1^R</p> <p>B423-1^R B434-2 B513^R</p>	<p><u>A111-D</u></p> <p>A4210-D</p> <p>B419-D</p>

— มีฤทธิ์การยับยั้งมากกว่าหรือเท่ากับ +++ กับจุลินทรีย์ทดสอบทุกชนิด

ตารางที่ 4.5 (ต่อ) จำนวนสายพันธุ์ราเอนโดไฟต์ที่คัดเลือกสำหรับใช้ทดสอบความสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ

กลุ่ม จุลินทรีย์ทดสอบ	สายพันธุ์ราเอนโดไฟต์แบ่งตามลักษณะสัณฐานวิทยา							
	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Chadosporium</i> sp.	<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	<i>Phomopsis</i> sp.	<i>Xylaria</i> sp.	<i>Mycelia</i> sterilia
กลุ่มที่ 2 ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ (<i>E. coli</i> <i>P.aeruginosa</i>) แกรมบวก (<i>B. cereus</i> <i>S. aureus</i>)	A22-D B335 ^R B528 ^R	A338-D	B328-D	-	A439-D	-	A117-1 ^R A122 ^R A231 ^R A328 ^R A315-1 ^R A328-1 ^R A328-2 ^R A425 ^R A432 ^R A439 ^R A511 ^R A518-1 ^R B212-3 ^R B221 B231-1 ^R B234 B3110 ^R B321 ^R B3210 B333-1 ^R B426-1 ^R	A115 A127 B338 ^R B4110 ^R B418 ^R

ตารางที่ 4.5 (ต่อ) จำนวนสายพันธุ์ราเอนโดไฟต์ที่คัดเลือกสำหรับใช้ทดสอบความสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ

กลุ่ม จุลินทรีย์ทดสอบ	สายพันธุ์ราเอนโดไฟต์แบ่งตามลักษณะสัณฐานวิทยา							
	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Chadosporium</i> sp.	<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	<i>Phomopsis</i> sp.	<i>Xylaria</i> sp.	<i>Mycelia</i> sterilia
<p>กลุ่มที่ 3</p> <p>ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก (<i>B. cereus</i> <i>S. aureus</i>) และยีสต์ (<i>C. albicans</i>)</p>	-	-	-	-	-	-	<p>A110^R A113^R A125-1^R A125-2^R A126-1^R A1310 A135-3^R A215 A217^R A222^R A223^R A224^R A226^R A312^R A317^R A326-2^R A329^R B122-1 B211-1^R B213^R B225-2 ^RB2310^R B237-1^R B317^R B336^R B417-1^R B419^R B522^R B531-1^R</p>	B518-1 ^R

ตารางที่ 4.5 (ต่อ) จำนวนสายพันธุ์ราเอนโดไฟต์ที่คัดเลือกสำหรับใช้ทดสอบความสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ

กลุ่ม จุลินทรีย์ทดสอบ	สายพันธุ์ราเอนโดไฟต์แบ่งตามลักษณะสัณฐานวิทยา							
	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Chladosporium</i> sp.	<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	<i>Phomopsis</i> sp.	<i>Xylaria</i> sp.	<i>Mycelia sterilia</i>
กลุ่มที่ 4 ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก (<i>B. cereus</i> <i>S. aureus</i>)	-	-	B131	B227	A212-N	A424 A434	A1110 A112 A117-2 ^R	A313-2 ^R
			B513		B434-1	A512	A118-2 ^R A119-1 ^R A119-2 ^R	A324 ^R
						B434-1	A1210 ^R A123 A128-1 ^R	B121-1
						B439	A134 ^R A135-1 ^R A137 ^R	B123
						B539	A211 A211 ^R A218 ^R A225	B313-1
							A233 ^R A239 ^R A313-2 ^R	B428
							A314 ^R A315-2 ^R A316-2 ^R	B327 ^R
							A319 ^R A321-1 ^R A323 ^R	B521
							A328-1 ^R A328-2 ^R A335	B535
							A412 ^R A414 ^R A416-1	
							A4310 ^R A431-2 ^R A438 ^R	
							A518-2 ^R B111 B111-1 ^R	
							B113-1 ^R B115 ^R B116-1 ^R	
							B119 B119-1 ^R B119-3 ^R	
							B1210	

ขตารางที่ 4.5 (ต่อ) จำนวนสายพันธุ์ราเอนโดไฟต์ที่คัดเลือกสำหรับใช้ทดสอบสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมีผลต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ

กลุ่ม จุลินทรีย์ทดสอบ	สายพันธุ์ราเอนโดไฟต์แบ่งตามลักษณะสัณฐานวิทยา							
	<i>Aspergillus</i> sp	<i>Chladosporium</i> sp.	<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	<i>Phomopsis</i> sp.	<i>Xylaria</i> sp.	Mycelia sterilia
<p>กลุ่มที่ 4 ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก (<i>B. cereus</i> <i>S. aureus</i>)</p>	-	-	-	-	-	-	<p>B127^R B129 B131 B133 B1310^R B134^R B135 B138 B138-1^R B138-2^R B212-1^R B212-2^R B214^R B215 B2210 B222 B222-1^R B226 B227-1^R B228^R B229 B231 B233^R B234-2 B311 B312 B315-1^R B315-2^R B317 B317-2 B322 B322-2 B326-1^R B327 B329^R B322 B333-2^R B337-1^R B338 B411^R B4110 B412 B416^R B424-1^R B429^R B431^R</p>	-

ตารางที่ 4.5 (ต่อ) จำนวนสายพันธุ์ราเอนโดไฟต์ที่คัดเลือกสำหรับใช้ทดสอบสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมีผลต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ

กลุ่ม จุลินทรีย์ทดสอบ	สายพันธุ์ราเอนโดไฟต์แบ่งตามลักษณะสัณฐานวิทยา							
	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Chadosporium</i> sp.	<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	<i>Phomopsis</i> sp.	<i>Xylaria</i> sp.	<i>Mycelia sterilia</i>
กลุ่มที่ 4 ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก (<i>B. cereus</i> <i>S. aureus</i>)	-	-	-	-	-	-	B438 ^R B512 ^R B517-1-D B518-D B518-D B5210 ^R B525 B535 ^R B539 ^R	-
ไม่ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ ทุกกลุ่ม			B214-D B215-D B216-D B212-D B131-D				A133 ^R A211 ^R A418 ^R A513 ^R A435 ^R B129 ^R B136-1 ^R B319 ^R B329 ^R B432 ^R B433 ^R B519 ^R	B133-D B313-2 ^R
จำนวนสายพันธุ์ทดสอบ ทั้งหมด	1	1	19	1	3	8	189	20

จากผลการทำวิจัยพบว่าราเอนโดไฟต์ทุกสกุลที่นำมาทดสอบมีฤทธิ์ทางชีวภาพยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ โดยเฉพาะราในสกุล *Colletotrichum* spp. สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบทุกชนิด ส่วนราในสกุล *Xylaria* spp. จำนวน 29 สายพันธุ์ สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและยีสต์ ในขณะที่ราสกุลอื่นๆไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและยีสต์ และพบว่าราเอนโดไฟต์ในสกุล *Fusarium* sp. *Pestalotiopsis* sp. *Phomopsis* spp. *Xylaria* spp. และ *Mycelia sterilia* ส่วนใหญ่สามารถสร้างสารยับยั้งเฉพาะจุลินทรีย์แกรมบวก แสดงดังตารางที่ 4.6 จากผลการทดลองพบว่าราเอนโดไฟต์ *Colletotrichum* spp. สายพันธุ์ A524-D B224-D B117-D และราเอนโดไฟต์ *Xylaria* spp. สายพันธุ์ A116-2^R และ B316-1^R มีความสามารถสูงในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ทุกชนิด แต่ในการทำวิจัยครั้งนี้มุ่งให้ความสำคัญกับราในสกุล *Xylaria* spp. เป็นสำคัญเนื่องจากราในกลุ่มนี้ มีความหลากหลายสูงมากในพืชสกุลปาล์มทั้ง 2 ชนิดที่นำมาแยกหาราเอนโดไฟต์ และยังไม่พบว่ามีรายงานการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของราเอนโดไฟต์ในสกุล *Xylaria* spp. ในพืชปาล์ม *A. pinnata* และ *B. machadonis* และปาล์มชนิดอื่นๆทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศ ซึ่งลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราเอนโดไฟต์ *Xylaria* spp. แสดงดังภาพที่ 4.1 และ 4.2 ตามลำดับ



รูปที่ 4.1 แสดงลักษณะโคโลนีและลักษณะสโตรมาราเอนโดไฟต์ *Xylaria* sp. สายพันธุ์ A116-1^R
 (a) ลักษณะโคโลนีราเอนโดไฟต์ *Xylaria* sp. สายพันธุ์ A116-1^R บนอาหารเลี้ยงเชื้อ OA อายุ 10 วัน
 (b) ลักษณะโคโลนีและลักษณะสโตรมาราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ A116-1^R บนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ OA อายุ 30 วัน
 (c) ลักษณะสโตรมาราเอนโดไฟต์ *Xylaria* sp. สายพันธุ์ A116-1^R ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ PDB



รูปที่ 4.2 แสดงลักษณะโคโลนีและลักษณะสโตรมา ราเอนโดไฟต์ *Xylaria* สายพันธุ์ B316-2^R

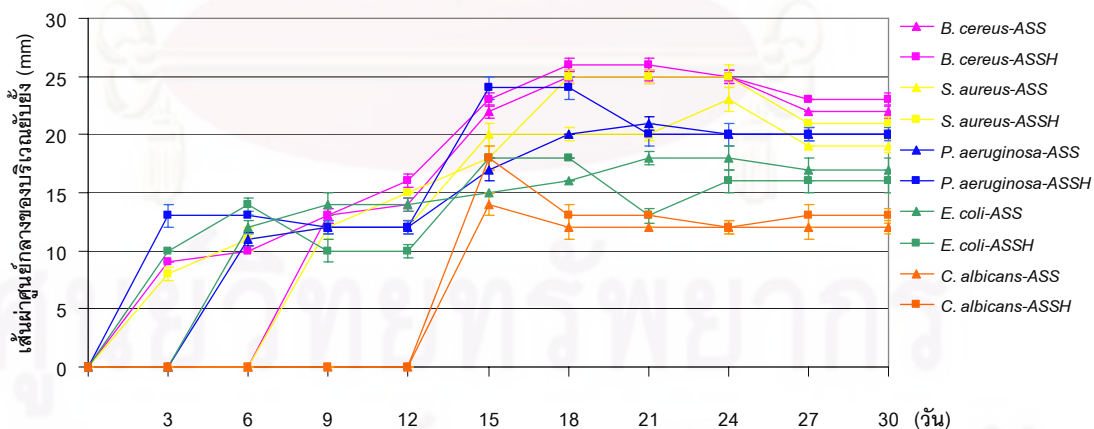
(a) ลักษณะโคโลนีราเอนโดไฟต์ *Xylaria* sp.สายพันธุ์ B316-2^R บนอาหารเลี้ยงเชื้อ OA อายุ 10 วัน
 (b) ลักษณะโคโลนีราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ B316-2^R บนอาหารเลี้ยงแข็งเลี้ยงเชื้อ OA อายุ 30 วัน (c)
 ลักษณะสโตรมาราเอนโดไฟต์ *Xylaria* sp. สายพันธุ์ B316-2^R ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ PDB

4.4 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญกับการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพยับยั้ง จุลินทรีย์ราเอนโดไฟต์ *Xylaria* สายพันธุ์ A116-1^R และ B316-2^R

ศึกษาการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและการเจริญของราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ A116-1^R และ B316-2^R ในอาหารเหลวทั้ง 3 ชนิด คือ PDB MEB และน้ำสกัดจากไบโปลาสม บ่มที่อุณหภูมิห้อง ใน 2 สภาวะ คือ การบ่มเชื้อในสภาวะนิ่ง (static cultures) และบ่มเชื้อในสภาวะเขย่า (submerged shake cultures) ด้วยเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ในระหว่างการบ่มเชื้อเก็บ ตัวอย่างในวันที่ 0 1 3 6 9 12 15 18 21 24 27 และ 30 ตามลำดับ กรองเส้นใยออก หา น้ำหนักแห้งของเส้นใยแต่ละครั้งของการเก็บตัวอย่าง ส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อสกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ เพื่อนำไปทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบด้วยวิธี Agar well พบว่าระยะเวลาที่เหมาะสมในการ เลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ของราสายพันธุ์ A116-2^R คือ วันที่ 15 ในอาหารเหลวน้ำสกัด จากไบโปลาสม และ PDB แสดงดังรูปที่ 4.3 และ 4.4 ส่วนในอาหารเลี้ยงเชื้อ MEB คือวันที่ 24 แสดงดังรูปที่ 4.5 และการให้อากาศมีผลต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ในอาหาร 2 ชนิด คือ น้ำสกัดจากไบโปลาสม และ PDB โดยพบว่าเมื่อมีการเลี้ยงเชื้อควบคู่กับการให้อากาศในอาหาร เหลวน้ำสกัดจากไบโปลาสมมีผลให้ราสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ได้เร็ว กว่าและมีปริมาณสารมากกว่าการเลี้ยงราและบ่มที่สภาวะนิ่งในเวลาวันที่เท่ากันของการเก็บตัวอย่าง แสดงดังรูปที่ 4.3 และ 4.4 แต่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MEB กลับพบว่าการเลี้ยงเชื้อโดยการบ่มในสภาวะ

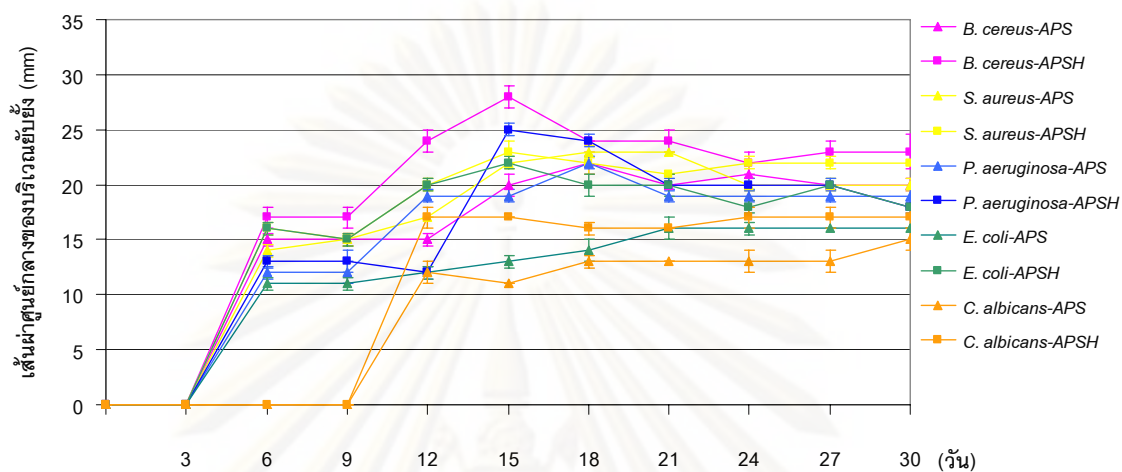
นี้จะมีผลทำให้ปริมาณของสารออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์มีปริมาณสารมากกว่าในสภาวะการให้อากาศ แต่การให้อากาศพบว่าการสร้างสารเกิดขึ้นก่อนการเลี้ยงเชื้อในสภาวะนิ่ง แสดงดังรูปที่ 4.5 ส่วนราสายพันธุ์ B316-1^R พบว่า มีความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ได้ปริมาณมากที่สุดในวันที่ 24 ในอาหารทั้ง 3 ชนิด แต่จะพบว่าการบ่มเชื้อในในสภาวะนิ่งกลับส่งเสริมให้ราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ B316-1^R สร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีกว่าการให้อากาศ แต่การให้อากาศส่งเสริมให้ราสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ได้ก่อนการบ่มตั้งทิ้งไว้ในสภาวะนิ่ง แสดงดังรูปที่ 4.6 4.7 และ 4.8 และจากการศึกษาการเจริญของราเอนโดไฟต์ 2 สายพันธุ์ดังกล่าวในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิด พบว่าราทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่างชนิดกันและการให้อากาศมีผลต่อการเจริญที่ต่างกัน ในอาหารต่างชนิดกัน โดยราสายพันธุ์ A116-2^R เจริญเติบโตได้ดีที่สุดในอาหารเหลวน้ำสกัดจากใบปาล์ม ในสภาวะการบ่มที่สภาวะนิ่ง และเจริญได้น้อยในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และในอาหารเลี้ยงเชื้อ MEB เมื่อมีการให้อากาศกลับมีผลทำให้เซลล์มีการเจริญได้ดีมากกว่าการไม่ให้อากาศอย่างเห็นได้ชัดเจน แสดงดังรูปที่ 4.9 ราสายพันธุ์ B316-1^R พบว่ามีการเจริญไม่แตกต่างกันในอาหารทั้ง 3 ชนิด แต่การเลี้ยงเชื้อในสภาวะการบ่มทิ้งในสภาวะนิ่งมีผลทำให้เซลล์มีการเจริญเติบโตได้ดีกว่าสภาวะการให้อากาศ โดยเฉพาะในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ MEB จะเห็นได้ชัดเจนว่าการบ่มเชื้อในสภาวะนิ่งส่งเสริมให้เชื้อเจริญได้ดีกว่าในสภาวะเขย่าแสดงดังรูปที่ 4.10

ราเอนโดไฟต์ *Xylaria* sp. สายพันธุ์ A116-2^R



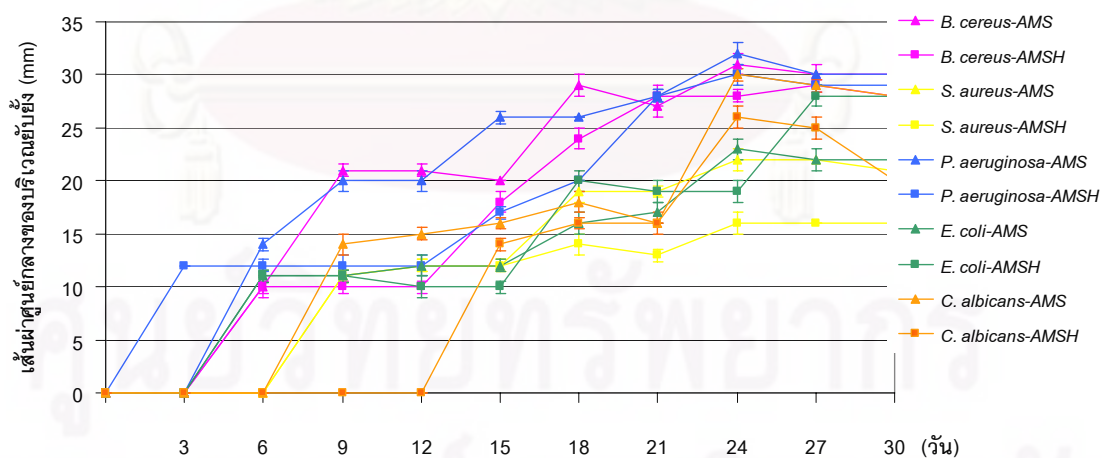
รูปที่ 4.3 กราฟแสดงการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของราเอนโดไฟต์ *Xylaria* sp. สายพันธุ์ A116-2^R ในอาหารเหลวน้ำสกัดจากใบปาล์มในสภาวะนิ่ง (ASS) และบ่มในสภาวะเขย่า (ASSH)

ราเอนโดไฟต์ *Xylaria* sp. สายพันธุ์ A116-2^R



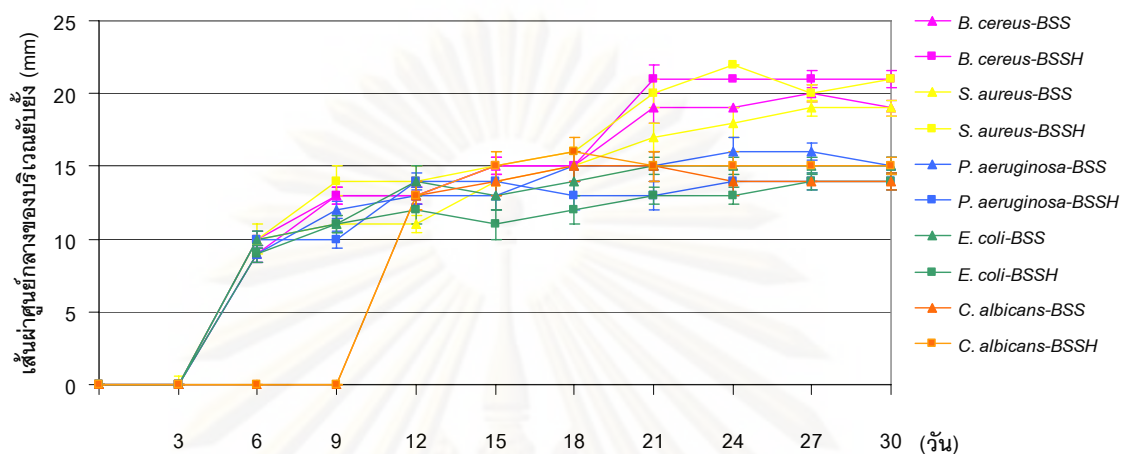
รูปที่ 4.4 กราฟแสดงการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของราเอนโดไฟต์ *Xylaria* sp. สายพันธุ์ A116-2^R ในอาหาร PDB ในสภาวะนิ่ง (APS) และบ่มในสภาวะเขย่า (APSH)

ราเอนโดไฟต์ *Xylaria* sp. A116-2^R



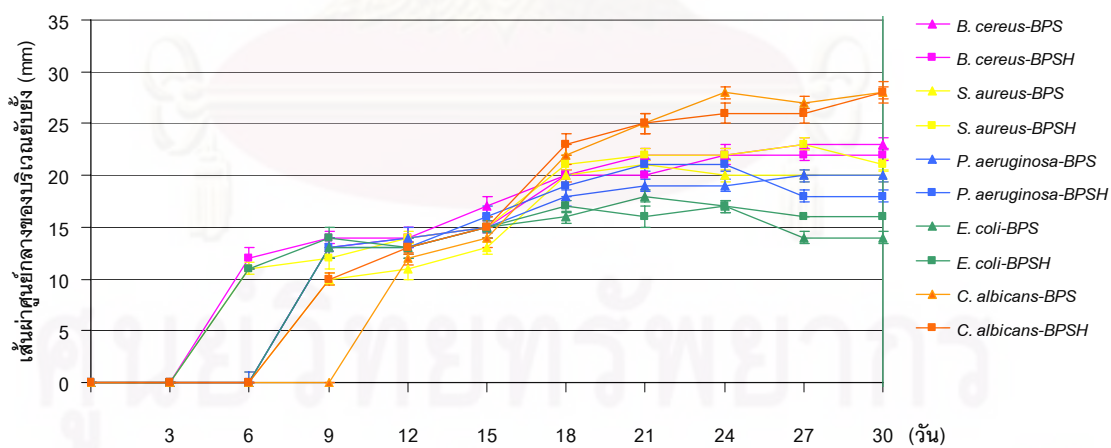
รูปที่ 4.5 กราฟแสดงการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ A116-2^R ในอาหาร MEB ในสภาวะนิ่ง (AMS) และบ่มเขย่าในสภาวะเขย่า (AMSH)

ราเอนโดไฟต์ *Xylaria* sp. B316-1^R



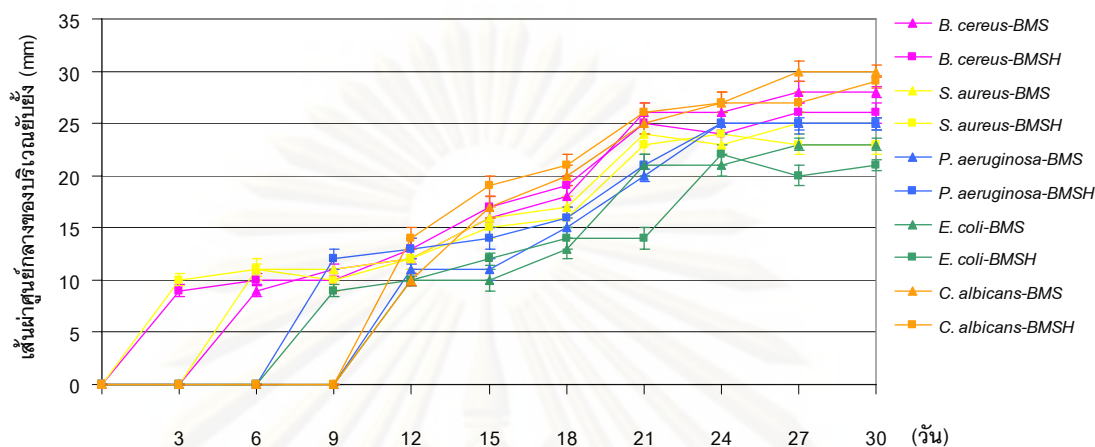
รูปที่ 4.6 กราฟแสดงการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ B316-1^R ในอาหารเหลวน้ำสกัดจากใบปาล์ม ในสภาวะนิ่ง (BSS) และบ่มเชื้อในสภาวะเขย่า (BSSH)

ราเอนโดไฟต์ *Xylaria* sp. B316-1^R



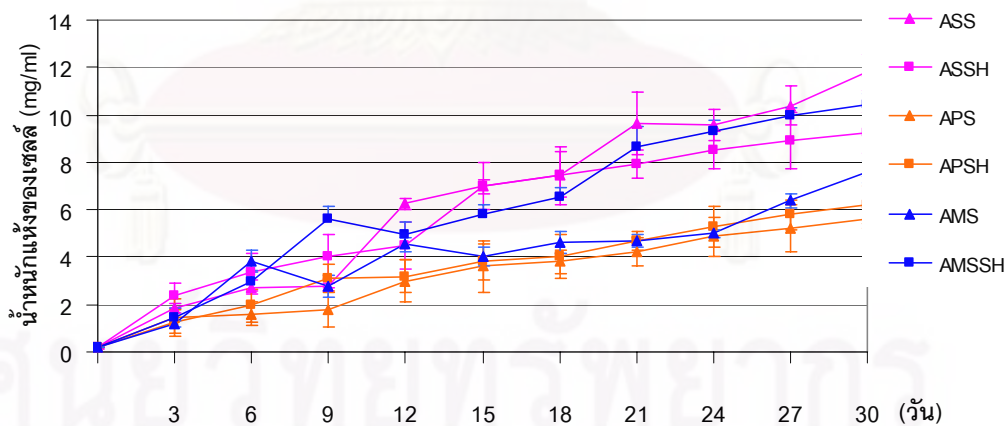
รูปที่ 4.7 กราฟแสดงการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ B316-1^R ในอาหาร PDB ในสภาวะนิ่ง (BPS) และบ่มเชื้อในสภาวะเขย่า (BPSH)

ราเอนโดไฟต์ *Xylaria* sp. B316-1^R



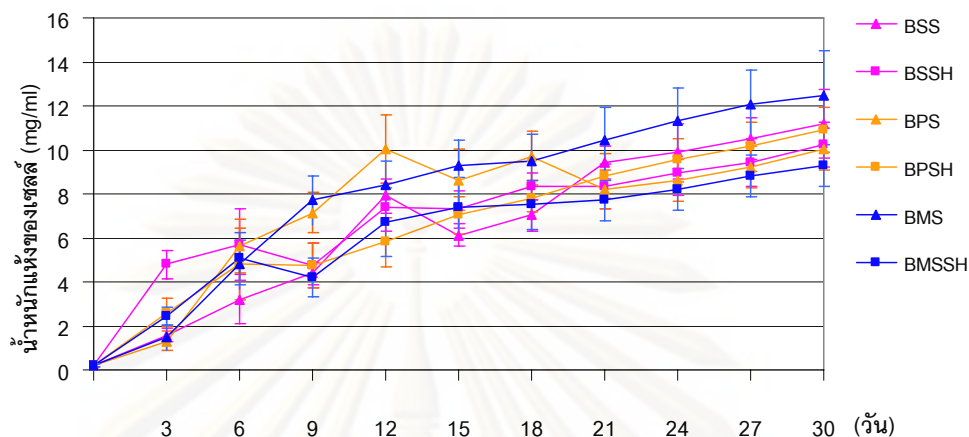
รูปที่ 4.8 กราฟแสดงการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ B316-1^R ในอาหาร MEB ในสภาวะนิ่ง (BSS) และบ่มเชื้อในสภาวะเขย่า (BSSH)

ราเอนโดไฟต์ *Xylaria* sp. A116-2^R (Biomass)



รูปที่ 4.9 กราฟแสดงการเจริญของราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ A116-2^R ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิด คือน้ำสกัดจากใบปาล์ม PDB และ MEB ในสอง 2 สภาวะ คือ การบ่มเชื้อในสภาวะนิ่ง และบ่มเชื้อในสภาวะเขย่า

ราเอนโดไฟต์ *Xylaria* sp. B316-1^R (Biomass)



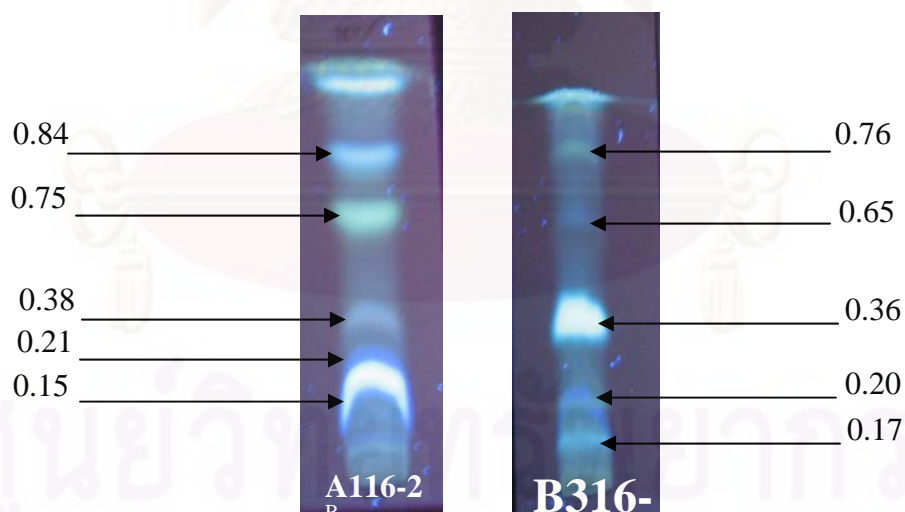
รูปที่ 4. 10 กราฟแสดงการเจริญของราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ B316-1^R ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิด คือน้ำสกัดจากใบปาล์ม PDB และ MEB ในสอง 2 สภาวะ คือ การบ่มเชื้อในสภาวะนิ่ง และบ่มเชื้อในสภาวะเขย่า

หมายเหตุ

- BSS = อาหารเหลวเลี้ยงเชื้อน้ำสกัดจากใบปาล์มบ่มในสภาวะนิ่ง
- BSSH = อาหารเหลวเลี้ยงเชื้อน้ำสกัดจากใบปาล์มบ่มในสภาวะเขย่า
- BPS = อาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มในสภาวะนิ่ง
- BPSH = อาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มในสภาวะเขย่า
- BMS = อาหารเลี้ยงเหลวเลี้ยงเชื้อ MEA บ่มในสภาวะนิ่ง
- BMSSH = อาหารเลี้ยงเหลวเลี้ยงเชื้อ MEA บ่มในสภาวะเขย่า

4.5 การแยกและทำให้สารสกัดบริสุทธิ์เบื้องต้นด้วยวิธี Thin-layer Chromatography

เลี้ยงราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ A116-2^R และ B316-1^R ในอาหารเหลว Potato Dextrose Broth นำน้ำเลี้ยงเชื้อจากราเอนโดไฟต์ทั้งสองสายพันธุ์สกัดด้วยเอตทิลแอลกอฮอล์ ระเหยตัวทำละลายออกแล้ว ละลายสารสกัดด้วยเมททานอล แยกสารสกัดให้บริสุทธิ์เบื้องต้นโดยใช้แผ่น TLC aluminium sheet รุ่น silica gel 60 โดยหยดสารสกัดปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงบนแผ่น TLC แล้วนำไป develop ด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างไดคลอโรโรมีเทนและเมททานอลในอัตราส่วน 9:1 ในส่วนของสารสกัดที่สกัดมาจากสายพันธุ์ A116-2^R และ อัตราส่วน 9.3 : 0.7 ในส่วนของสารสกัดสายพันธุ์ B316-1^R หลังจากนั้นนำไปส่องภายใต้รังสี UV ที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร สารสกัดจากสายพันธุ์ A116-2^R ปรากฏแถบของสารแยกออกมา ดังรูป 4.11 และแต่ละตำแหน่งค่า Rf เท่ากับ 0.15 0.21 0.38 0.75 0.84 ตามลำดับ และราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ B316-1^R ปรากฏแถบของสารแยกออกมา ดังรูป 4.11 และแต่ละตำแหน่งค่า Rf เท่ากับ 0.17 0.20 0.36 0.65 0.76 ตามลำดับ



รูปที่ 4.11 แสดงแถบของสารสกัดจากราเอนโดไฟต์บนแผ่น TLC (a) ราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ A116-2^R ในตัวทำละลายผสมระหว่างไดคลอโรโรมีเทนและเมททานอลในอัตราส่วน 9 : 1 (b) ราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ B316-1^R ในตัวทำละลายผสมระหว่างไดคลอโรโรมีเทนและเมททานอลในอัตราส่วน 9.3 : 0.7

4.6 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง

นำราเอนโดไฟต์ 147 สายพันธุ์เลี้ยงในอาหารเหลว PDB เป็นเวลา 30 วัน สกัดน้ำเลี้ยงเชื้อและเส้นใยด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ ระเหยเอทิลแอลกอฮอล์ออก และละลายสารสกัดด้วย 20% DMSO ได้สารสกัดทั้งหมด 147 ชนิด นำสารสกัดมาทดสอบการยับยั้งเซลล์มะเร็งโดยวิธี MTT กับเซลล์มะเร็ง 7 ชนิด พบว่าราเอนโดไฟต์แต่ละสายพันธุ์สามารถสร้างสารยับยั้งเซลล์มะเร็งแสดงในแสดงดังตารางที่ 4.6 จากการทดสอบความสามารถการสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งจากสารสกัดราเอนโดไฟต์ทั้งหมดจำนวน 147 สายพันธุ์โดยความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆพิจารณาคัดเลือกเฉพาะราเอนโดไฟต์ที่สามารถสร้างสารยับยั้งเซลล์มะเร็งให้มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์มะเร็งทดสอบน้อยกว่าหรือเท่ากับ 45% สามารถแบ่งความสามารถในการออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งของสารสกัดจากราเอนโดไฟต์ออกเป็น 4 กลุ่ม ตามความสามารถในการยับยั้งจำนวนของเซลล์มะเร็งทดสอบที่สามารถยับยั้งได้ คือ

- กลุ่มที่ 1 ยับยั้งเซลล์มะเร็งทดสอบทุกชนิด
- กลุ่มที่ 2 ยับยั้งเซลล์มะเร็งทดสอบ 2 - 6 ชนิด
- กลุ่มที่ 3 ยับยั้งเซลล์มะเร็งทดสอบเฉพาะ 1 ชนิด
- กลุ่มที่ 4 เซลล์มะเร็งทุกชนิดมีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตมากกว่า 45 %

สายพันธุ์และจำนวนราเอนโดไฟต์ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งมะเร็งแต่ละกลุ่ม แสดงดังตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.6 ความสามารถในการออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งของสารสกัดจากเส้นใยและน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟต์แยกได้จากใบปาล์ม *A. pinatta* และ *B. machadonis*

สายพันธุ์ ราเอนโดไฟต์	ระดับการมีชีวิตของเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์						
	A375	SW620	KatoIII	HepG2	BT474	Jurkat	Caski
B117-D	++++	++++	++++	+++	++++	++++	++++
A111-D	++++	++++	++++	+++	++++	++++	++++
A112-D	-	-	-	-	-	-	-
A113-D	-	-	-	-	-	++	-
A116-1 ^R	++++	++	+++	++++	+	++++	++++
A116-2 ^R	++++	++++	++++	++++	+++	++++	++++
A117-1 ^R	-	-	-	-	-	++	-
A117-2 ^R	-	-	-	-	-	-	-
A118-1 ^R	+	-	-	-	-	++	-
A118-2 ^R	-	-	-	-	-	++++	-
A119-1 ^R	-	-	-	-	++	-	-
A119-2 ^R	-	-	-	-	-	+++	-
A1210 ^R	-	-	+	-	-	+++	-
A122-1 ^R	-	-	-	-	-	++	-
A123-D	-	-	-	-	-	-	-
A125-1 ^R	-	-	-	-	-	++	-
A125-2 ^R	+++	-	-	-	-	++++	-
A126-1 ^R	-	-	-	-	-	+++	-
A126-2 ^R	-	-	-	-	-	++	-
A128-1 ^R	-	-	-	-	-	-	-
A131-1 ^R	++	++	++	++	-	++	+
A132 ^R	-	-	-	-	-	+	-
A133 ^R	-	-	-	-	-	-	-
A134 ^R	-	+	-	-	-	++++	-

ตารางที่ 4.6 (ต่อ) ความสามารถในการออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งของสารสกัดจากเส้นใยและน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟต์แยกได้จากใบปาล์ม *A. pinatta* และ *B. machadonis*

สายพันธุ์ ราเอนโด ไฟต์	ระดับการมีชีวิตของเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์						
	A375	SW620	KatoIII	HepG2	BT474	Jurkat	Caski
A135-3 ^R	-	-	-	-	++	+++	-
A137 ^R	-	-	+	-	-	+	-
A1310 ^R	++++	++	++++	++	+	++++	-
A211 ^R	-	-	-	-	-	-	-
A212-D	-	-	-	-	-	-	-
A216 ^R	-	-	-	++	+	-	-
A217 ^R	-	-	-	-	-	+	-
A222 ^R	+	-	-	-	-	+++	-
A223 ^R	-	-	-	-	-	+++	-
A224-D	++++	+++	+++	++++	+++	++++	+++
A224 ^R	+++	+++	++	+++	+++	++	-
A226 ^R	-	-	+	-	-	++	-
A227 ^R	+++	++	+	+	+	++	+
A233 ^R	-	-	-	-	-	-	-
A238 ^R	+++	++++	++++	++++	++++	++++	-
A311 ^R	++++	+++	++++	++++	++++	++++	++++
A312 ^R	-	-	-	-	-	+++	-
A313-1 ^R	-	-	-	-	-	+	-
A313-2 ^R	+	-	+	-	-	++	-
A314 ^R	-	-	-	-	++	+++	-
A315-2 ^R	+	-	-	-	+	+	-
A316-2 ^R	-	-	+	-	-	+++	-
A317 ^R	-	-	-	-	-	++++	-
A319-D	++++	+++	+++	++++	++++	++++	++++

ตารางที่ 4.6 (ต่อ) ความสามารถในการออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งของสารสกัดจากเส้นใยและน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟต์แยกได้จากใบปาล์ม *A. pinatta* และ *B. machadonis*

สายพันธุ์ ราเอนโดไฟต์	ระดับการมีชีวิตของเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์						
	A375	SW620	KatoIII	HepG2	BT474	Jurkat	Caski
A321-D	++++	++++	+++	+++	+++	++++	+++
A321-1 ^R	+++	-	+	++	+	++++	+
A323 ^R	++	-	-	+	-	++++	-
A326-2 ^R	-	-	-	-	-	-	-
A328-1 ^R	+++	-	++	-	-	++++	-
A328-2 ^R	++++	++++	++++	++++	+++	++++	++++
A329 ^R	-	-	-	-	-	-	-
A335 ^R	-	-	-	-	-	++++	-
A338 ^R	+++	+++	+++	+++	+++	++++	++++
A3310-1 ^R	-	-	-	-	-	++	-
A411 ^R	-	-	-	-	-	+	-
A413-1 ^R	+	-	-	+	-	++	-
A414 ^R	+	-	-	+	-	+++	+
A416-1 ^R	-	-	+	-	-	+	-
A418 ^R	-	-	-	-	-	+++	-
A425-1 ^R	-	-	-	-	-	++	-
A427 ^R	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
A4310	-	-	-	-	-	-	-
A431-2 ^R	-	-	-	-	-	++++	-
A432 ^R	+++	++++	+++	++	++	++++	+++
A436 ^R	++	-	-	+	-	+	-
A438 ^R	-	+	-	-	-	++++	-
A439 ^R	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 4.6 (ต่อ) ความสามารถในการออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งของสารสกัดจากเส้นใยและน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟต์แยกได้จากใบปาล์ม *A. pinatta* และ *B. machadonis*

สายพันธุ์ ราเอนโดไฟต์	ระดับการมีชีวิตของเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์						
	A375	SW620	KatoIII	HepG2	BT474	Jurkat	Caskies
A511 ^R	-	-	-	-	-	++	-
A514-2 ^R	+++	++	++++	++	-	+++	+
A518-1 ^R	+	+	-	-	-	+++	-
A518-2 ^R	-	-	-	-	-	+++	-
B111-1 ^R	-	-	-	-	-	-	-
B113-1 ^R	+	-	-	-	-	++	-
B115 ^R	-	-	-	-	-	++++	-
B116-1 ^R	-	-	-	-	-	-	-
B123 ^R	-	-	-	-	-	++	-
B127-D	-	-	-	-	-	++++	-
B129 ^R	-	-	-	-	-	-	-
B1310 ^R	+++	-	-	-	-	+	-
B138-2 ^R	-	-	-	-	-	-	-
B211-1 ^R	-	-	-	-	-	-	-
B212-1 ^R	-	-	-	-	-	+	-
B212-2 ^R	-	-	-	-	-	-	-
B212-3 ^R	++++	+	++	-	-	++++	-
B213 ^R	-	-	-	-	-	+++	-
B215 ^R	-	-	-	-	-	+++	-
B221 ^R	-	-	-	-	-	+	-
B222-1 ^R	-	-	-	-	-	-	-
B222-2 ^R	+++	+++	++	+++	-	++++	-
B224 ^R	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
B225-2 ^R	-	-	-	-	-	++	-

ตารางที่ 4.6 (ต่อ) ความสามารถในการออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งของสารสกัดจากเส้นใยและน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟต์แยกได้จากใบปาล์ม *A. pinatta* และ *B. machadonis*

สายพันธุ์ ราเอนโดไฟต์	ระดับการมีชีวิตของเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์						
	A375	SW620	KatoIII	HepG2	BT474	Jurkat	Caski
B228 ^R	++	-	-	-	-	++++	-
B231-1 ^R	+	-	-	+	-	++++	-
B232-2 ^R	++	-	-	+++	++	++	++
B237-1 ^R	-	-	-	-	-	-	-
B3110 ^R	-	-	+	-	-	++++	-
B315-2-D	+	-	+	-	+	+	-
B315 ^R	-	-	-	-	-	++	-
B316-1 ^R	++++	+++	++++	++++	+++	++++	++++
B316-2 ^R	++	-	++	-	-	++	-
B318 ^R	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
B319 ^R	-	-	-	-	-	+	-
B321 ^R	+	-	-	-	-	++++	-
B3210 ^R	-	++++	++++	++++	+++	++++	+
B322 ^R	-	-	-	-	-	+	-
B326-1 ^R	-	-	-	-	-	-	-
B327 ^R	++	-	-	-	-	++	-
B329 ^R	-	-	-	-	-	++++	-
B331 ^R	++++	++++	++++	++++	+++	++++	+++
B331-2 ^R	++++	++++	++++	+++	++++	++++	++++
B332 ^R	-	-	-	-	-	++	-
B333-1 ^R	+	-	-	-	-	++	-
B333-3 ^R	-	-	-	-	-	-	-
B335 ^R	+	-	+	-	-	++	-
B336 ^R	-	-	-	-	-	+	-
B337-1 ^R	-	-	-	-	-	++	-

ตารางที่ 4.6 (ต่อ) ความสามารถในการออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งของสารสกัดจากเส้นใยและน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟต์แยกได้จากใบปาล์ม *A. pinatta* และ *B. machadonis*

สายพันธุ์ ราเอนโดไฟต์	ระดับการมีชีวิตของเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์						
	A375	SW620	KatoIII	HepG2	BT474	Jurkat	Caski
B338 ^R	++	-	+	+	-	++	-
B411 ^R	+	-	-	-	-	+++	-
B4110 ^R	+	-	-	-	+++	+++	++
B412 ^R	-	-	-	-	-	-	-
B414-2 ^R	++++	++	+++	-	-	++++	-
B416 ^R	-	-	-	-	-	-	-
B417-1 ^R	-	-	-	+++	-	-	+
B418 ^R	++++	+++	+++	++	-	++++	-
B419 ^R	-	-	-	-	+	-	-
B422-1 ^R	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
B425-1 ^R	+	-	-	++	-	+++	++
B429-1 ^R	-	-	-	-	-	-	-
B434-2-D	-	++	-	+	++	-	-
B438 ^R	-	-	-	-	-	++++	-
B512 ^R	-	-	-	-	-	-	-
B513 ^R	++	-	+	+	-	+++	-
B518-1 ^R	-	-	-	-	-	-	-
B522 ^R	-	-	-	-	-	++	-
B5210 ^R	-	-	-	-	-	-	-
B535 ^R	-	-	-	-	-	++	-

++++ การมีชีวิต (viability) ของเซลล์มะเร็งมีค่าเท่ากับ 0 – 15%

+++ การมีชีวิต (viability) ของเซลล์มะเร็งมีค่าเท่ากับ 16 – 25%

++ การมีชีวิต (viability) ของเซลล์มะเร็งมีค่าเท่ากับ 26 – 35%

+ การมีชีวิต (viability) ของเซลล์มะเร็งมีค่าเท่ากับ 36 – 45%

- การมีชีวิต (viability) ของเซลล์มะเร็งมีค่ามากกว่า 46% ขึ้นไป

ตารางที่ 4.7 แสดงจำนวนสายพันธุ์ราเอนโดไฟต์ที่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งทดสอบแต่ละกลุ่ม

ขอบเขตการยับยั้งกลุ่ม เซลล์มะเร็งทดสอบ	สายพันธุ์ราเอนโดไฟต์แบ่งตามลักษณะสัณฐานวิทยา							
	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Chladosporium</i> sp.	<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	<i>Phomopsis</i> sp.	<i>Xylaria</i> sp.	<i>Mycelia sterilia</i>
กลุ่มที่ 1 ยับยั้งเซลล์ มะเร็งทดสอบทุกชนิด	A224D A427 ^R	-	B117D B224D	-	-	A319D	A116-1 ^R A116-2 ^R A227 ^R A311 ^R A321D A328-2 ^R A338 ^R B316-1 ^R B318 ^R B321 ^R B331-2 ^R B422-1 ^R	A11D
กลุ่มที่ 2 ยับยั้งเซลล์ มะเร็งทดสอบ 2- 6 ชนิด	B335 ^R	-	-	-	-	-	A118-1 ^R A118-2 ^R A1210 ^R A125-2 ^R A131-1 ^R A134 ^R A135-3 ^R A137 ^R A1310 ^R A216 ^R A222 ^R A224 ^R A226 ^R A238 ^R A314 ^R A315-2 ^R A316-2 ^R A321-1 ^R A323 ^R A328-1 ^R A413-1 ^R A414 ^R A416-1 ^R A436 ^R A438 ^R A514-2 ^R A518-1 ^R B113-1 ^R B1310 ^R B212-3 ^R B222-2 ^R B228 ^R B231-1 ^R B232-2 ^R B3110 ^R B315-2D ^R B316-2 ^R B321 ^R B3210 ^R B411 ^R B414-2 ^R	A313-2 ^R B327 ^R B338 ^R B4110 ^R B418 ^R

ตารางที่ 4.7 แสดงจำนวนสายพันธุ์ราเอนโดไฟต์ที่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งทดสอบ

ขอบเขตการยับยั้งกลุ่ม เซลล์มะเร็งทดสอบ	สายพันธุ์ราเอนโดไฟต์แบ่งตามลักษณะสัณฐานวิทยา							
	<i>Aspergillus</i> sp	<i>Chladosporium</i> sp.	<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	<i>Phomopsis</i> sp.	<i>Xylaria</i> sp.	Mycelia sterilia
กลุ่มที่ 2 ยับยั้งเซลล์ มะเร็งทดสอบ 2 - 6 ชนิด	-	-	-	-	-	-	B417-1 ^R B425-1 ^R B434-2D ^R B513 ^R	-
กลุ่มที่ 3 ยับยั้ง เซลล์มะเร็งทดสอบ1 เซลล์ (BT474)	-	-	-	-	-	-	A119-1 ^R B419-1 ^R	-
กลุ่มที่ 3 ยับยั้ง เซลล์มะเร็งทดสอบ1 เซลล์ (Jurkat)	-	-	-	-	-	-	A113 A117-1 ^R <u>A118-2</u> ^R <u>A119-2</u> ^R A122-1 ^R A125-1 ^R A126-1 ^R A126-2 ^R A132 ^R A217 ^R A223 ^R A312 ^R A313-1 ^R <u>A317</u> ^R A335 ^R A3310-1 ^R A411 ^R A418 ^R A425 ^R <u>A431-2</u> ^R A511 ^R	-

ตารางที่ 4.7 แสดงจำนวนสายพันธุ์ราเอนโดไฟต์ที่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งทดสอบ

ขอบเขตการยับยั้งกลุ่ม เซลล์มะเร็งทดสอบ	สายพันธุ์ราเอนโดไฟต์แบ่งตามลักษณะพื้นฐานวิทยา							
	<i>Aspergillus</i> sp	<i>Chladosporium</i> sp.	<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	<i>Phomopsis</i> sp.	<i>Xylaria</i> sp.	Mycelia sterilia
กลุ่มที่ 3 ยับยั้ง เซลล์มะเร็งทดสอบ 1 เซลล์ (Jurkat)	-	-	-	-	-	-	<u>A518-2^R</u> <u>B115^R</u> <u>B123^R</u> <u>B127^R</u> B212-1 ^R <u>B213^R</u> B215 ^R B221 ^R B225-2 ^R B315 ^R B319 ^R B322 ^R <u>B329^R</u> B332 ^R B336 ^R B337-1 ^R <u>B438^R</u> B522 ^R B535 ^R	-
กลุ่มที่ 4 เซลล์มะเร็งทุกชนิดมี เปอร์เซ็นต์การมีชีวิต มากกว่า 45 %	-	-	-	-	-	A212-D	A112 A127-2 ^R A123 A128-1 ^R A133 ^R A211 ^R A233 ^R A326-2 ^R A329 ^R A431 ^R A439 ^R B111-1 ^R B116-1 ^R B129 ^R B138-2 ^R B211-1 ^R B212-2 ^R B222-1 ^R B237-1 ^R B326-1 ^R B333-3 ^R B412 ^R B416 ^R B429-1 ^R B512 ^R B518-1 ^R B5210 ^R	-

_____ สายพันธุ์ราเอนโดไฟต์ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวมีค่าการยับยั้ง \geq +++

ผลของสารสกัดจากราเอนโดไฟต์จำนวน 147 สายพันธุ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งโดยวิธี MTT พบว่ามีราเอนโดไฟต์จำนวน 120 สายพันธุ์ ออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งทดสอบ โดยสารสกัดจากราเอนโดไฟต์จำนวน จำนวน 51 สายพันธุ์ ออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งยับยั้งเซลล์มะเร็งทดสอบ 2-6 ชนิด ราเอนโดไฟต์จำนวน 42 สายพันธุ์ ออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งทดสอบเพียง 1 ชนิด และราเอนโดไฟต์จำนวน 28 สายพันธุ์ ที่ไม่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งซึ่งทำให้เซลล์มะเร็งมีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตมากกว่า 45 % แต่การคัดเลือกสายพันธุ์ของราเอนโดไฟต์ให้มีความสนใจเฉพาะราเอนโดไฟต์ที่มีความสามารถในการทำให้เซลล์มะเร็งมีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดน้อยกว่าหรือเท่ากับ 45% และออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งอย่างจำเพาะเพียง 1 ชนิด เท่านั้น ซึ่งการยับยั้งเซลล์มะเร็งของสารสกัดจากราเอนโดไฟต์ขึ้นอยู่กับกลไกของสารที่มีปฏิกิริยากับตัวรับ (receptor) ของเซลล์มะเร็ง และสารบางชนิดอาจชักนำให้เซลล์มะเร็งเกิดการตายแบบอะพอพโทซิส (apoptosis) ซึ่งราเอนโดไฟต์ที่มีความสามารถทำให้เซลล์มะเร็งมีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตน้อยกว่า 45 % แต่ละสายพันธุ์สามารถสร้างสารยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ต่างชนิดกัน และมีราเอนโดไฟต์จำนวนมากถึง 42 สายพันธุ์ มีฤทธิ์ยับยั้งอย่างจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว และราเอนโดไฟต์จำนวน 2 สายพันธุ์ ออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านม ดังนั้นการคัดเลือกสายพันธุ์ของราเอนโดไฟต์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวจึงต้องพิจารณาจากผลเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์มะเร็งเซลล์อื่นๆด้วยเพื่อใช้ในการตัดสินใจเลือกสายพันธุ์ของราเอนโดไฟต์ที่สร้างสารออกฤทธิ์มีแนวโน้มจะชักนำให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวมีการตายของเซลล์เป็นแบบอะพอพโทซิส

คัดเลือกราเอนโดไฟต์ที่มีผลอย่างสูงต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็งแบบจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งทดสอบ 1 เซลล์ พบว่ามีราเอนโดไฟต์จำนวน 42 สายพันธุ์ แสดงผลการยับยั้งเซลล์มะเร็งแบบจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งทดสอบ 1 ชนิด และส่งผลให้เซลล์มะเร็งทดสอบอื่นๆอัตราการอยู่รอดมากกว่า 45 % แบ่งเป็นสายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งแบบจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว 40 สายพันธุ์ แต่ในกลุ่มนี้มีจำนวน 5 สายพันธุ์ แสดงผลยับยั้งจำเพาะสูงต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวและมีผลทำให้เซลล์มะเร็งทดสอบอื่นๆมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดมากกว่า 70 % ได้แก่สายพันธุ์ A317^R A518-2^R B115^R B127^R และราเอนโดไฟต์จำนวน 2 สายพันธุ์ คือ A119-1^R B419^R ที่มีผลยับยั้งจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งเต้านม

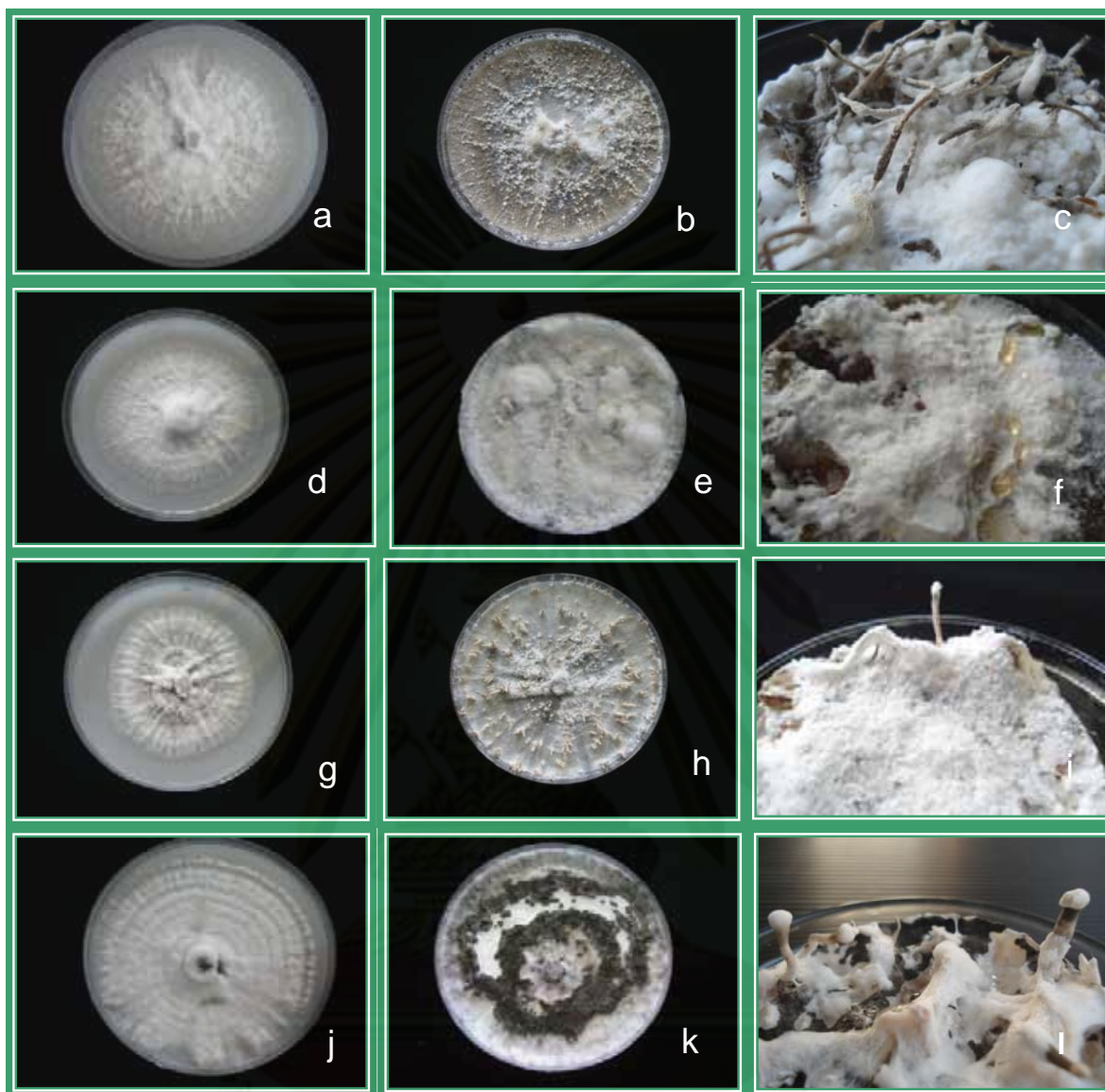
ศูนย์วิจัยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.8 แสดงผลการออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวจากสารสกัดราเอนโดไฟต์

สายพันธุ์ราเอนโดไฟต์	ระดับการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว						
	A375	SW620	KatoIII	HepG2	BT474	Jurkat	Caski
A113 ^R	67.6	87.39	52	83.92	86.47	29.43	70.75
A117-1 ^R	61.5	85.15	63.54	88.63	65.62	34.35	96.62
A118-2 ^R	60.05	95	60.2	79.16	72.01	11.43	54.26
A119- ^R	60.6	61.5	45.73	51.19	71.89	22.83	88.37
A122-1 ^R	88.3	79.6	75.58	61.7	61.7	37.31	82.36
A125-1 ^R	67.4	70.96	87.58	65.23	73.56	32.24	85
A126-1 ^R	80.61	71.6	57.8	63.09	72.76	15.28	74.03
A126-2 ^R	74.5	91.65	74.2	92.05	68.7	26.2	65.89
A132 ^R	87.9	73.07	65.9	68.05	82.86	36	102.35
A217 ^R	80.4	85.1	106.27	49.81	56.24	42.37	98.92
A223 ^R	57.6	54.8	61.12	74.6	61.78	17.24	45.96
A312 ^R	58.7	54.93	45.06	47.16	98.93	20.74	61.1
A313-1 ^R	87	82.85	91.08	48.41	76.55	39.35	65.11
A317 ^R	105.7	75.82	78.7	90.01	88.32	8.65	93.56
A335 ^R	78.5	60.45	56.65	74.6	65.92	11.73	132.94
A3310 ^R	95.8	78.56	80.43	60.36	66.6	35.28	76.75
A411 ^R	92.1	63.05	68.28	116.97	78.93	42.06	119.98
A418 ^R	56.3	98.63	89.49	72.08	63.05	19.52	93.16
A425-1 ^R	50.5	74.65	62.26	82.69	85.03	35.93	69.51
A431-2 ^R	100	46.66	69.15	84.7	99.9	9.82	92.32
A511 ^R	80.37	71.01	78.76	50	63.57	29.1	74.41
A518-2 ^R	106.5	85.36	78.02	72.82	71.13	21.23	124.82
B115 ^R	83.7	95.44	129.3	78.77	79.58	8.44	95.05

ตารางที่ 4.8 (ต่อ) แสดงผลการออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวจากสารสกัดราเอนโดไฟต์

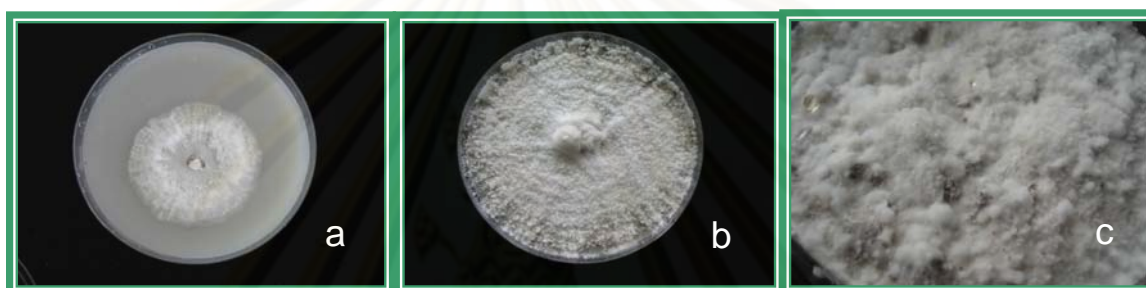
สายพันธุ์ราเอนโดไฟต์	ระดับการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว						
	A375	SW620	Kato III	HepG2	BT474	Jurkat	Caski
B123 ^R	83.88	65.1	63.6	69.31	45.71	28.99	52.79
B127 ^R	87.4	74.9	82.66	74	91.34	0	88.5
B212-1 ^R	61.9	98.3	69	51.62	71.22	40.75	84.62
B213 ^R	81.3	73.2	76.38	48.01	68.53	22.65	111.4
B215 ^R	47.4	86.14	82.78	49.16	53.21	22.14	67.58
B221 ^R	81.6	92.26	91.24	84.17	86.92	43.04	114.5
B225-2 ^R	56.6	75.82	57.57	86.29	69.92	32.97	88.38
B315 ^R	102	66.35	64.16	56.25	62.32	32.56	82.02
B319 ^R	96.2	84.3	73.37	110.4	114.9	39	104.14
B322 ^R	86	88.36	81.32	104.54	50	42.16	95.02
B329 ^R	75.7	73.32	52.73	61.01	82.54	16.73	81.12
B332 ^R	61.7	76.62	84.05	88.63	81	32.09	94.02
B336 ^R	82.8	82.1	82	96.39	82.2	45.74	117.39
B337-1 ^R	75	113.93	74.04	84.91	87.77	33.84	113.9
B438 ^R	62.38	64.3	52.3	61.23	59.02	3.62	75.26
B522 ^R	73	75.82	56.85	91.49	74.56	35.04	87.08
B535 ^R	80.9	82.54	85.99	74.13	64.31	30.02	91.11



รูปที่ 4.12 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาราเอนโดไฟต์ *Xylaria* spp. สายพันธุ์ออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว

- (a) ราเอนโดไฟต์ *Xylaria* sp. สายพันธุ์ A 317^R บนอาหารเลี้ยงเชื้อ OA อายุ 10 วัน
- (b) ราเอนโดไฟต์ *Xylaria* sp. สายพันธุ์ A 317^R บนอาหารเลี้ยงเชื้อ OA อายุ 30 วัน
- (c) ราเอนโดไฟต์ *Xylaria* sp. สายพันธุ์ A 317^R ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB อายุ 30 วัน
- (d) ราเอนโดไฟต์ *Xylaria* sp. สายพันธุ์ A518-2^R บนอาหารเลี้ยงเชื้อ OA อายุ 10 วัน
- (e) ราเอนโดไฟต์ *Xylaria* sp. สายพันธุ์ A518-2^R บนอาหารเลี้ยงเชื้อ OA อายุ 30 วัน
- (f) ราเอนโดไฟต์ *Xylaria* sp. สายพันธุ์ A518-2^R ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB อายุ 10 วัน

- (g) ราเอนโดไฟต์ *Xylaria* sp. สายพันธุ์ B115^R บนอาหารเลี้ยงเชื้อ OA อายุ 10 วัน
 (h) ราเอนโดไฟต์ *Xylaria* sp. สายพันธุ์ B115^R บนอาหารเลี้ยงเชื้อ OA อายุ 30 วัน
 (i) ราเอนโดไฟต์ *Xylaria* sp. สายพันธุ์ B115^R ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB อายุ 30 วัน
 (j) ราเอนโดไฟต์ *Xylaria* sp. สายพันธุ์ B127^R บนอาหารเลี้ยงเชื้อ OA อายุ 10 วัน
 (k) ราเอนโดไฟต์ *Xylaria* sp. สายพันธุ์ B127^R บนอาหารเลี้ยงเชื้อ OA อายุ 30 วัน
 (l) ราเอนโดไฟต์ *Xylaria* sp. สายพันธุ์ B127^R ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB อายุ 30 วัน

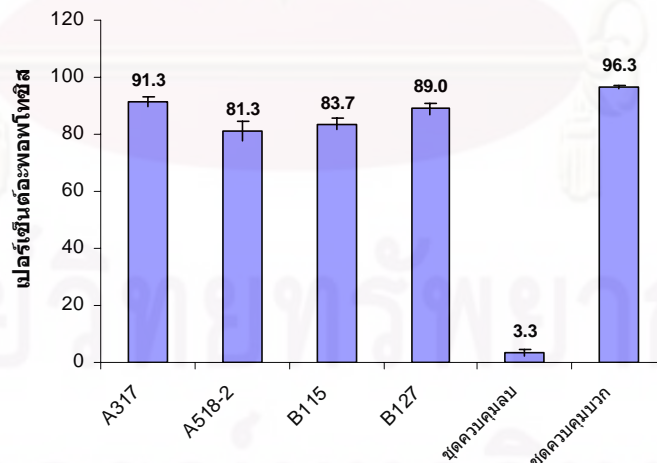


รูปที่ 4.13 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของราเอนโดไฟต์ *Xylaria* spp. สายพันธุ์ออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านม

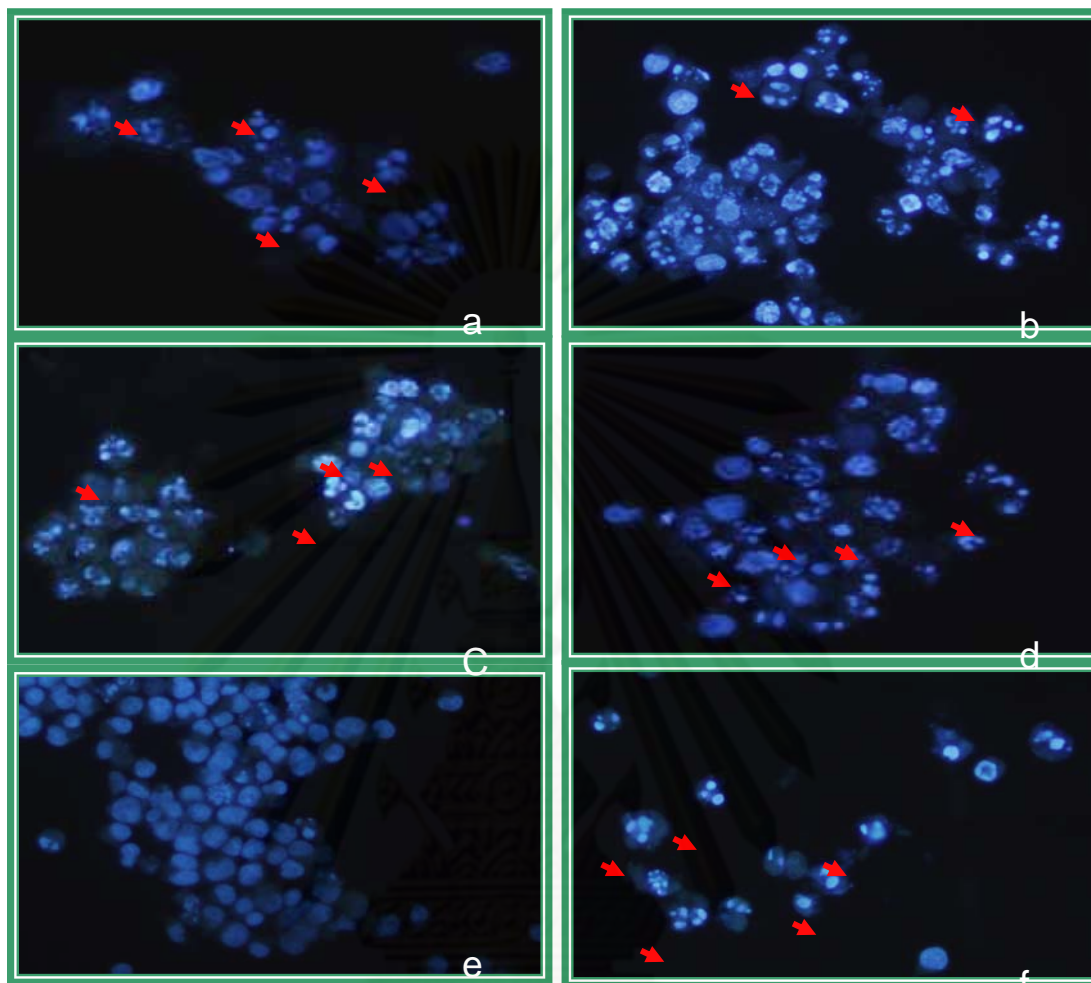
- (a) ราเอนโดไฟต์ *Xylaria* sp. สายพันธุ์ B419-1^R บนอาหารเลี้ยงเชื้อ OA อายุ 10 วัน
 (b) ราเอนโดไฟต์ *Xylaria* sp. สายพันธุ์ B419-1^R บนอาหารเลี้ยงเชื้อ OA อายุ 30 วัน
 (c) ราเอนโดไฟต์ *Xylaria* sp. สายพันธุ์ B419-1^R ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB อายุ 30 วัน

4.7 ผลทดสอบการตายแบบอะพอพโทซิสเซลล์มะเร็งด้วยสารสกัดราเอนโดไฟต์ *Xylaria* sp. สายพันธุ์ A 317^R A518-2^R B115^R B127^R A119-1^R B419-1^R โดยวิธีย้อมด้วย DNA dye Hoechst 33342

ราเอนโดไฟต์ทุกสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบความสามารถในการชักนำให้เซลล์มะเร็งเกิดการตายแบบอะพอพโทซิสพิจารณาจากฤทธิ์ของสารสกัดจากราที่ยับยั้งจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งเพียง 1 ชนิด และส่งผลให้เซลล์มะเร็งทดสอบชนิดอื่น ๆ มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดมากกว่าหรือเท่ากับ 45 % จากผลการทดสอบการตายของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวแบบอะพอพโทซิส ด้วยสารสกัดจากราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ A317^R A518-2^R B115^R B127^R และราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ A119-1^R B419-1^R ที่มีผลต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็งต้านแบบจำเพาะและส่งผลให้เซลล์มะเร็งต้านเกิดการตายแบบอะพอพโทซิส พบว่าสารสกัดจากราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ A 317^R A518-2^R B115^R B127^R สามารถชักนำเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเกิดการตายแบบอะพอพโทซิส โดยเปอร์เซ็นต์การชักนำให้เซลล์มะเร็งเกิดการตายแบบอะพอพโทซิส เท่ากับ 91.3 % 81.3% 83.7% 89.0% ตามลำดับ แสดงดังรูปที่ 4.14 และ 4.15 และราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ B419-1^R มีผลต่อการชักนำให้เซลล์มะเร็งต้านมีการตายแบบอะพอพโทซิส โดยเปอร์เซ็นต์การชักนำให้เซลล์มะเร็งต้านเกิดการตายเท่ากับ 41.15 % และในขณะเดียวกันราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ A119-1^R ไม่แสดงการชักนำให้เซลล์มะเร็งต้านเกิดการตายแบบอะพอพโทซิส แสดงผลดังรูปที่ 4.16 และ 4.17



รูปที่ 4.14 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว เมื่อเติมสารสกัดจากราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ A 317^R A518-2^R B115^R B127^R ปริมาตร 5% v/v



รูปที่ 4.15 ผลของสารสกัดจากราเอนโดไฟต์ต่อการตายแบบอะพอพโทซิสเซลล์มะเร็ง Jurkat

(a) เติมสารสกัดจากราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ A 317^R ปริมาตร 5% v/v เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

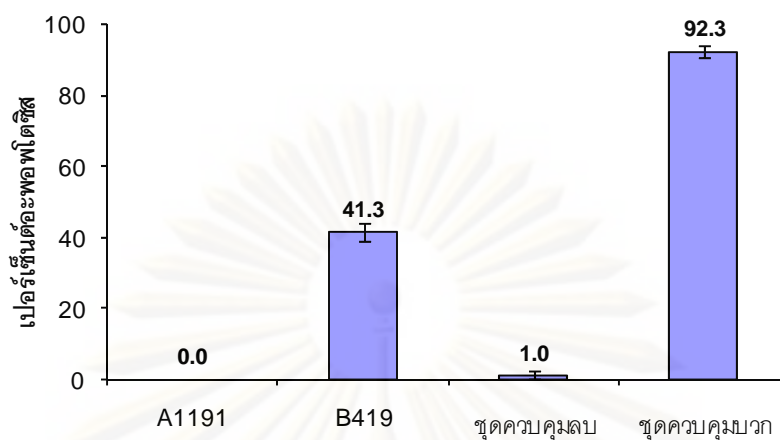
(b) เติมสารสกัดจากราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ A518-2^R ปริมาตร 5% v/v เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

(c) เติมสารสกัดจากราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ B115^R ปริมาตร 5% v/v เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

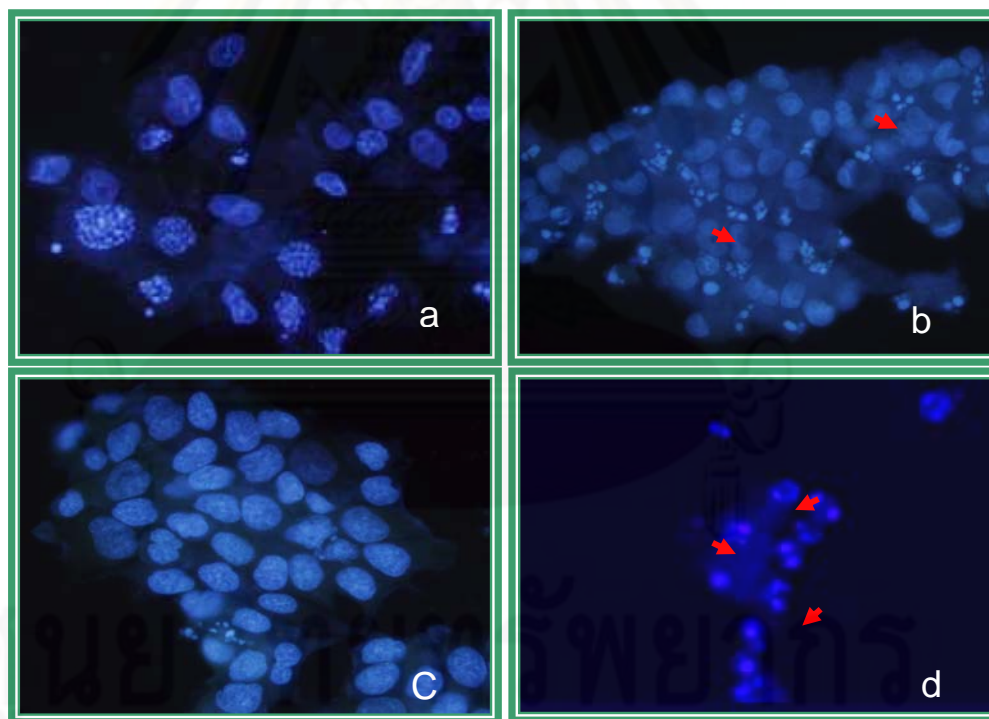
(d) สารสกัดจากราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ B127^R ปริมาตร 5% v/v เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

(e)) ชุดควบคุมลบ เติม 20 % DMSO เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

(f) เซลล์ผลบวกควบคุม เติม Etoposide ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



รูปที่ 4.16 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์อะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็ง BT 474 เมื่อเติมสารสกัดจากราเนโดไฟต์สายพันธุ์ A119-1^R B419^R



รูปที่ 4.17 ผลของสารสกัดจากราเนโดไฟต์ต่อการตายแบบอะพอพโทซิส (apoptosis) ของเซลล์มะเร็งเต้านม BT474

- (a) เติมสารสกัดจากราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ A 119-1^R ปริมาตร 5% v/v เป็นเวลา 48 ชั่วโมงไม่แสดงการตายแบบอะพอพอโทซิสของเซลล์
- (b) เติมสารสกัดจากราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ B419^R ปริมาตร 5% v/v เป็นเวลา 72 ชั่วโมง
- (c) ชุดควบคุมลบ เติม 20 % DMSO
- (d) เซลล์ผลบวกควบคุม เติม Etoposide ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4.8 การจำแนกราเอนโดไฟต์ *Xylaria* สายพันธุ์ A 317^R A518-2^R B115^R B127^R B419-1^R โดยวิธีทางอนุวิทยา

จากลักษณะทางสัณฐานวิทยายังไม่สามารถจำแนกถึงสปีชีส์ของราเอนโดไฟต์ในสกุล *Xylaria* สายพันธุ์ A 317^R A518-2^R B115^R B127^R B419-1^R ได้ ดังนั้นจึงใช้ข้อมูลจากลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัสของ ITS rRNA gene จากนั้นส่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ไปวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัส ITS rRNA gene ลำดับเบสที่ได้จากการวิเคราะห์แสดงดัง ภาคผนวก ง หมายเลข 1 และเมื่อนำลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัสของ 18S rRNA ของราเอนโดไฟต์ *Xylaria* ทั้ง 7 สายพันธุ์ มาเปรียบเทียบกับลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA ที่บันทึกไว้ใน GeneBank DNA database จากเว็บไซต์ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> พบว่าลำดับเบส 18S rRNA ของราเอนโดไฟต์ทั้ง 7 สายพันธุ์มีลำดับใกล้เคียงกับข้อมูลลำดับเบสของราใน GeneBank DNA database แสดงดังตารางที่ 4.9

ตารางที่ 4.9 การพิสูจน์สายพันธุ์ราเอนโดไฟต์กับฐานข้อมูลใน GenBank

สายพันธุ์ ราเอนโดไฟต์	ลำดับเบส บริเวณ ITS	เปอร์เซ็นต์ ความเหมือน	สายพันธุ์ราใน GenBank	Accession No.
A116-2 ^R	ภาคผนวก จ หมายเลข 1.1	99%	Xylaria sp. P055	EF423534.1
B115 ^R	ภาคผนวก จ หมายเลข 1.2	100%	Fungal endophyte isolate 933	Eu687179.1
		100%	Fungal endophyte isolate 812	Eu687167.1
B127 ^R	ภาคผนวก จ หมายเลข 1.3	91%	<i>Monilinia</i> urnula	Z73795.1
		91%	<i>Monilinia</i> urnula	Z73794.1
		91%	<i>Monilinia</i> oxycocci	Z73790.1
		91%	<i>Monilinia</i> oxycocci	Z73789.1
B316-1 ^R	ภาคผนวก จ หมายเลข 1.4	100%	Fungal endophyte isolate 933	Eu687191.1
B419-1 ^R	ภาคผนวก จ หมายเลข 1.5	99%	Fungal endophyte isolate 933	Eu687191.1

บทที่ 5

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

5.1 การศึกษาความหลากหลายราเอนโดไฟต์

จากการศึกษาความหลากหลายของราเอนโดไฟต์ในใบปาล์ม 2 คือ *A. pinnata* และ *B. macchadonis* ซึ่งเจริญอยู่ในอยู่ในป่าฝนเขตร้อน ณ อุทยานแห่งชาติเขาหลวง บริเวณน้ำตกท่าแพ (พื้นที่ ขร.7) ทางภาคใต้ของประเทศไทยในช่วงฤดูการที่แตกต่างกัน พบว่าราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากใบปาล์ม *A. pinnata* และ *B. macchadonis* ทั้งหมด 9 สกุล จำนวนไอโซเลตรวมทั้ง 2 ฤดู 516 ไอโซเลต ซึ่งประกอบด้วยราในสกุล *Aspergillus* sp. *Chadosporium* sp. *Colletrotrichum* spp. *Glomerella* sp. *Fusarium* sp. *Penicilium* sp. *Pestalotiopsis* sp. *Phomopsis* sp. และ *Xylaria* spp. จำนวนไอโซเลตที่แยกได้ในฤดูฝนและฤดูแล้งมีความแตกต่างของจำนวนอย่างชัดเจน ใบปาล์มทั้ง 2 ชนิด โดยการเกิดจำนวนไอโซเลตในฤดูแล้งมีจำนวนน้อยกว่าฤดูฝน แต่ไม่มีความแตกต่างระหว่างจำนวนของไอโซเลตของปาล์มทั้ง 2 ชนิดในฤดูการเดียวกัน (ตารางที่ 4.1) ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่ามีผลมาจากภาวะความเครียดจากการขาดน้ำของพืช ซึ่งภายใต้สภาวะการขาดแคลนน้ำ พืชบางชนิดจะไม่สะสมอาหารไว้ในรูปของคาร์โบไฮเดรต แต่จะสะสมไว้ในรูปของคาร์บอนเบส (carbon-based) เพื่อให้ในการปกป้องตัวเอง เช่น แทนนิน (tannins) (Lambers และ Poorter, 1992) ซึ่งผลการทดลองครั้งนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Rodrigues, (1994) ซึ่งศึกษาผลของฤดูการและอายุของใบต่ออัตราการเกิดจำนวนไอโซเลตของราเอนโดไฟต์ในปาล์ม *Euterpe oleracea* และพบว่าการเกิดจำนวนไอโซเลตราเอนโดไฟต์ในฤดูแล้งต่ำกว่าฤดูฝน จากผลการวิจัยในครั้งนี้พบว่า ในช่วงฤดูแล้งราสกุล *Colletrotrichum* spp. แสดงอัตราการเกิดไอโซเลตและอัตราการเกิดความถี่ของโคโลนีสูงกว่าราสกุลอื่นๆ รองลงมาคือราในสกุล *Xylaria* spp. ส่วนในฤดูฝนกลับพบว่าราเอนโดไฟต์สกุล *Xylaria* spp. แสดงอัตราการเกิดไอโซเลตและอัตราการเกิดโคโลนีสูงมากเมื่อเปรียบเทียบกับราสกุลอื่นๆ และมีความหลากหลายของราในสกุลนี้ ถึง 15 ชนิด รองลงมาคือราในสกุล *Aspergillus* sp. แต่กลับพบราในสกุล *Colletrotrichum* spp. และราในสกุลอื่นๆ เพียงเล็กน้อย ซึ่งจากผลการวิจัย จะเห็นว่า สกุลรา อัตราการเกิดไอโซเลตและความถี่ของการเกิดโคโลนีของชนิดของราเอนโดไฟต์ของแต่ละฤดูการในปีเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด ซึ่งให้เห็นว่าปัจจัยทางสภาวะแวดล้อม

เช่น ปริมาณน้ำฝน ความชื้นในชั้นบรรยากาศและสรีรวิทยาของพืชอาจเป็นปัจจัยที่ส่งเสริมให้เกิดความถี่ของการเกิดโคโลนี ชนิดของรา หรืออาจเป็นไปได้ว่ามีสารอาหารบางอย่างเกิดขึ้นมากในเนื้อเยื่อของพืชเฉพาะในช่วงฤดูกาลของแต่ละปีและสารอาหารดังกล่าวอาจมีผลต่อกิจกรรมบางอย่างของราชนิดนั้นๆ (Rodrigues, 1994) ดังนั้นการพบอัตราการเกิดโคโลนีของรา *Colletotrichum* spp. สูงในช่วงหน้าแล้งอาจเป็นเพราะมีสารอาหารบางอย่างในใบปาล์มในช่วงฤดูแล้งส่งเสริมต่อการเจริญของราในสกุล *Colletotrichum* spp. นอกจากนี้ระยะการพัฒนาระบบการสร้างสปอร์ของราในสกุล *Colletotrichum* spp. สั้นดังนั้นจึงสามารถการแพร่กระจายในสภาวะแวดล้อมได้เร็วกว่าราในสกุล *Xylaria* spp. และเนื่องจากราในสกุลนี้ส่วนใหญ่เป็นราก่อโรคในพืช ดังนั้นการเกิดขึ้นของความถี่ของการเกิดโคโลนีอาจเกี่ยวข้องกับความสัมพันธ์กันอย่างเฉพาะเจาะจงระหว่างพืชกับชนิดของราซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการก่อให้เกิดโรคภายหลัง (Mekkamol, 1998) และการพบอัตราการเกิดไอโซเลต อัตราการเกิดโคโลนี และความหลากหลายของราเอนโดไฟต์ *Xylaria* spp. สูงมากในช่วงฤดูฝน อาจเป็นไปได้ว่าเกิดจากปัจจัยข้างต้นเช่นเดียวกันและปัจจัยที่สำคัญอีกอย่างหนึ่งที่อาจส่งผลต่อการเกิดอัตราการเกิดไอโซเลตและอัตราความถี่ของการเกิดโคโลนีสูงของราเอนโดไฟต์ *Xylaria* spp. คือในช่วงฤดูฝนพื้นที่ป่าในบริเวณนั้นอาจมีการเจริญของราในสกุล *Xylaria* spp. บนซากกิ่งไม้ซึ่งมีการสะสมมาจากฤดูแล้งและมีการสร้างสปอร์มาจำนวนมากของรา *Xylaria* spp. สปอร์จะมาปลดปล่อยสปอร์ออกมาทำให้บริเวณนั้นหนาแน่นไปด้วยสปอร์ของรา *Xylaria* spp. สปอร์จะตกลงบนใบพืชและเมื่อสภาวะเหมาะสมก็จะงอกและเจริญอาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชต่อไป (Bayman และคณะ, 1998) ราในกลุ่ม Xylariaceae เป็นราเอนโดไฟต์ที่สามารถพบได้อย่างสม่ำเสมอในพืชเขตร้อนหลายชนิด (Rodrigues และ Petrini, 1997) ในขณะเดียวกันก็เป็นกลุ่มราเอนโดไฟต์ที่สามารถพบได้ทั่วไปในเนื้อเยื่อพืชในเขตอบอุ่นด้วยเช่นเดียวกัน แต่พบมีว่าจำนวนและความหลากหลายของชนิดน้อยกว่าในเขตร้อน การศึกษาราเอนโดไฟต์ส่วนใหญ่มีการศึกษากันอย่างกว้างขวางในพืชเขตร้อน (Rodrigues และ Petrini, 1997) แต่เริ่มมีการศึกษาเพิ่มขึ้นในพืชเขตร้อนหลายชนิด แต่ยังมีการศึกษาน้อยมากในพืชวงศ์ปาล์มในเขตร้อนและจากข้อมูลที่มีรายงานเกี่ยวกับราเอนโดไฟต์ที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชวงศ์ปาล์มพบว่าม้งานวิจัยอื่น ๆ มีผลสอดคล้องกับการศึกษาตัดแยกศึกษาความหลากหลายของราเอนโดไฟต์ที่อาศัยอยู่ในพืชวงศ์ปาล์มทั้ง 2 ชนิด (*A. pinnatta* และ *B. macchadonis*) โดย Rodrigues และ Samuels (1990) แยกราเอนโดไฟต์จากปาล์ม *Licuala ramsayi* เจริญอยู่ในป่าฝนเขตร้อนในควีนแลนด์ (Queensland) และออสเตรเลีย (Australia) พบราเอนโดไฟต์ Xylariaceae มีความถี่ของการเกิดโคโลนีมากที่สุดในใบปาล์ม ในปี ค.ศ. 1994 Rodrigues คัดแยกราเอนโดไฟต์จากปาล์ม *Euterpe oleracea* บริเวณป่าเขตร้อนประเทศบราซิลพบราเอนโดไฟต์ในวงศ์ Xylariaceae ทั้งหมด 15 ชนิด

จากราเอนโดไฟต์ที่พบทั้งหมด 21 สกุล และตัวอย่างการศึกษาราเอนโดไฟต์ในพืชเขตร้อนชนิดอื่นๆก็แสดงให้เห็นเช่นเดียวกันว่าราในสกุล *Xylaria* spp. เป็นราเอนโดไฟต์ที่สามารถพบได้มากที่สุดในพื้นที่เขตร้อนอีกหลายชนิด เช่น ในปี ค.ศ. 1996 Lodge และคณะ คัดแยกราเอนโดไฟต์จากใบ *Manilkara bidentata* พบราในสกุล *Xylaria* ประมาณ 73-74 % Bayman และคณะ (1998) คัดแยกราเอนโดไฟต์ในพืช 2 ชนิด คือ *Casuarina equisetifolia* พบราเอนโดไฟต์ *Xylaria* 54% และในใบพืช *Manilkara bidentata* พบราเอนโดไฟต์ *Xylaria* 97%

5.2 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของราเอนโดไฟต์ในการสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์และยับยั้งเซลล์มะเร็ง

จากการศึกษาราเอนโดไฟต์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ โดยนำสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อและเส้นใยราที่สกัด ด้วยเอทิลแอลกอฮอล์จำนวน 247 สายพันธุ์ มาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพโดยวิธี Agar well พบว่ามีราเอนโดไฟต์ 92.31%. สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบและมีราเอนโดไฟต์จำนวน 7.69% ไม่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้โดยสามารถแบ่งกลุ่มราเอนโดไฟต์ที่ยับยั้งจุลินทรีย์ได้เป็น 5 กลุ่ม คือ ยับยั้งแบคทีเรียและยีสต์ 19.02% ยับยั้งทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ 13.37% ยับยั้งเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวกและยีสต์ 12.1% ยับยั้งเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก 47.77% ไม่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ 7.7% . และพบว่าราเอนโดไฟต์ในสกุล *collectrotrichum* spp. ส่วนใหญ่ (60%) สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ทุกชนิด พบว่ามีราในสกุล *Xylaria* spp เพียงส่วนน้อย (15.3%) สามารถออกฤทธิ์สูงยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ทุกชนิด แต่พบว่าราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากใบปาล์มซึ่งส่วนใหญ่เป็นราในสกุล *Xylaria* spp. สามารถออกฤทธิ์อย่างอ่อนในการยับยั้งเฉพาะจุลินทรีย์แกรมบวก (51.9%) และพบว่าราเอนโดไฟต์ทุกสายพันธุ์ไม่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งเฉพาะต่อแบคทีเรียแกรมลบหรือยีสต์ ราเอนโดไฟต์***สายพันธุ์ A116-2^R และ B316-1^R มีความสามารถสูงในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ทุกชนิด

ทดสอบหาราเอนโดไฟต์ที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งมนุษย์ด้วยวิธี MTT โดยนำสารสกัดราเอนโดไฟต์จำนวน 147 สายพันธุ์ พบว่ามีราเอนโดไฟต์ 80.71% สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งมนุษย์ทุกเซลล์ทดสอบ ซึ่งมีผลทำให้เซลล์มะเร็งมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดน้อยกว่าหรือเท่ากับ 45% และราเอนโดไฟต์ 19% ไม่ออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งทดสอบมีผลทำให้เซลล์มะเร็งมีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดมากกว่า45% โดยมีราเอนโดไฟต์สามารถสร้างสารออกฤทธิ์

เซลล์มะเร็งทดสอบทุกเซลล์ 14% สามารถสร้างสารยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ 2-6 เซลล์ มี 37% และมีราเอนโดไฟต์ 30% สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งอย่างเฉพาะ 1 เซลล์มะเร็งทดสอบ โดยส่วนใหญ่ (28.57%) มีผลยับยั้งอย่างเฉพาะเจาะจงต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว และพบมีราเอนโดไฟต์ 1.43% ออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านม ซึ่งจากผลทำให้ทราบว่าราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากใบปาล์มส่วนใหญ่สร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง โดยส่วนใหญ่สามารถสร้างสารยับยั้งเซลล์มะเร็งได้มากกว่า 2 เซลล์ และสารสกัดจากราเอนโดไฟต์ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเฉพาะเจาะจงต่อ 1 เซลล์มะเร็งเกือบทั้งหมดออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว โดยพบว่าสารสกัดจากราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ A 317^R A518-2^R B115^R B127^R ออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวอย่างสูงและเฉพาะเจาะจงโดยทำให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดเท่ากับ 8.65% 21.23% 8.44% และ 0.00% ตามลำดับ และออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งเซลล์อื่นน้อยมากโดยทำให้เซลล์มะเร็งมีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดมากกว่า 70% ขึ้นไป ราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ A119-1^R B419-1^R สร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านมโดยทำให้เซลล์มะเร็งเต้านมมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดเท่ากับ 34.37% และ 42.12% ตามลำดับ และจากการทดสอบการชักนำให้เซลล์มะเร็งเกิดการตายแบบอะพอพโทซิส พบว่าสารสกัดราเอนโดไฟต์ทั้ง 4 สายพันธุ์ คือ พันธุ์ A 317^R A518-2^R B115^R B127^R สามารถชักนำให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเกิดการตายแบบอะพอพโทซิสได้ในเปอร์เซ็นต์สูงและพบว่าราเอนโดไฟต์ทั้ง 4 สายพันธุ์มีผลต่อการยับยั้งเฉพาะจุลินทรีย์ทดสอบแกรมบวกและยีสต์อย่างอ่อนเท่านั้น ส่วนสารสกัดจากราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ B419-1^R มีผลสามารถชักนำให้เซลล์มะเร็งเต้านมเกิดการตายแบบอะพอพโทซิสและมีผลการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบอย่างอ่อนต่อแบคทีเรียและยีสต์

มีราเอนโดไฟต์หลากหลายชนิดเจริญเติบโตและอาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชและส่วนใหญ่มีรูปแบบการอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกัน แต่ในบางกรณีราเอนโดไฟต์อาจจะอาศัยอยู่ในพืชในรูปแบบของการแอบแฝงและก่อให้เกิดโรคกับพืชภายหลัง Barz และคณะ, (1988) รายงานว่าราเอนโดไฟต์ที่อาศัยอยู่ในพืชอาจจะเป็นสาเหตุทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงบางอย่างเกิดขึ้นกับพืชเมื่อเกิดสภาวะกดดันเกิดขึ้นกับพืชทั้งทางกายภาพและชีวภาพ โดยการสร้างสารทุติยภูมิบางชนิดออกมาเพื่อปกป้องพืช ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตโดยราเอนโดไฟต์อาจเกิดขึ้นจากคุณสมบัติเฉพาะของชนิดของรานั้นๆ (Engel และคณะ, 1982) หรืออาจเกิดจากสภาวะกดดันจากปัจจัยต่างๆที่เกิดขึ้นจากสภาวะแวดล้อมเมื่อราอาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืช (Moss, 1984; Brunner และ Petrini, 1992) ดังนั้นความสำคัญของลักษณะการอาศัยอยู่ร่วมกันระหว่างพืชกับราที่เป็นปัจจัยหนึ่งในการชักนำให้เกิดการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของราเอนโดไฟต์

ราในสกุล *collectotrichum* spp. มีรายงานว่ามีความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ได้หลายชนิด เช่น จากการศึกษาของ Lu และคณะ, (2000) พบว่า รา *collectotrichum* sp. ที่แยกได้จากต้น *Artemisia annual* สามารถผลิตสารในกลุ่ม ergosterol 7 ชนิด พบสาร indole-3- acetic acid (IAA) ซึ่งเป็นฮอร์โมนพืช และพบสารชนิดใหม่อีก 3 ชนิด ได้แก่ 6-isopreny lindole-3-carboxylic acid 3- β , α -dihydroxy-6 β -acetox-ergosta-7,22-diene และ 3 β , 5 α -dihydroxy-6 β -phenylacetyloxy-ergosta-7,22-diene ออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียหลายชนิด ได้แก่ *Bacillus subtilis* *Staphylococcus aureus* *Sarcina lutea* และ *Pseudomonas* sp. ออกฤทธิ์ยับยั้งยีสต์ *Candida albicans* และรา *Aspergillus niger* ในปี ค.ศ. 2000 Zou และคณะ ศึกษารา เอนโดไฟต์ *collectotrichum gloeosporioides* จากต้น *Artemisia mongolica* ซึ่งสามารถผลิตสาร colletric acid ออกฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Bacillus subtilis* *Staphylococcus aureus* *Sarcina lutea* และ *Helminthosporium sativum*

และนอกจากนี้ราในสกุล *collectotrichum* spp. ที่นำมาทดสอบทั้งหมดแยกได้จากใบปาล์มในฤดูแล้งดังนั้นความรุนแรงของสารออกฤทธิ์ที่ราเอนโดไฟต์ในสกุล *collectotrichum* spp. สร้างขึ้นอาจจะมีปัจจัยเสริมมาจากความกดดันจากสภาวะแวดล้อมภายนอก เช่น สารอาหารและน้ำ ที่ขาดแคลนในช่วงฤดูการที่แห้งแล้งส่งเสริมให้เกิดการต่อต้าน (antagonistic) กันระหว่างจุลินทรีย์เพื่อแย่งชิงสารอาหารทำให้ต้องสร้างสารออกฤทธิ์รุนแรงออกมายับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ (Rodrigues, 1994)

ราในวงศ์ Xylariaceae มีหน้าที่หลักในระบบนิเวศวิทยาคือ ทำหน้าที่เป็นผู้ย่อยสลายเนื้อไม้ แต่มีรายงานว่าราในวงศ์ Xylariaceae หลายสกุลมีความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลากหลายชนิดแต่สารทุติยภูมิกลุ่มหลักที่สร้างโดยราในวงศ์นี้ ได้แก่ Dihydroisocoumarins (Anderson และคณะ, 1983) Succinic acid and derivatives (Anderson และคณะ, 1983) Butyrolactones (Edwards และ Whalley, 1979) Cytochalasins (Edwards และคณะ, 1989) Naphthalenes (Greenhalgh และ Chesters, 1968) Sesquiterpene alcohols (Anderson และคณะ, 1984a; Poyser และคณะ, 1986) Griseofulvin and derivatives (Park และคณะ, 2005)

Dihydroisocoumarins เป็นกลุ่มสารที่สามารถพบเจอได้ในรากกลุ่ม Xylariaceae สกุล *Hypoxylon* *Biscogniauxia* และ *Camillea* Butyrolactones มีรายงานเคยพบบ้างในราสกุล *Nemania serpens* Cytochalasins มีรายงานว่ามารพบได้บ่อยในรา Xylariaceae สกุล *Xylaria* spp. และ *Rosellinia* ราในวงศ์ Xylariaceae โดยเฉพาะสกุล *Xylaria* spp. หลายชนิดพบเป็นราเอ็นโดไฟต์อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชหลายชนิดและพบได้มากในพืชเขตร้อน (Whalley, 1996) หลายชนิดและมีรายงานว่าสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้ง รา แบคทีเรีย เชลล์มะเร็ง เช่น ราเอนโดไฟต์

Xylaria sp. F0010 สร้างสาร Griseofulvin และ Dechloro – griseofulvin ออกฤทธิ์ยับยั้งรา (Park และคณะ, 2005) ราเอ็นโดไฟต์ *Xylaria* sp. YX-28 สร้างสาร 7 – amino- 4- methylcoumarin ออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย (Lui และคณะ, 2008) และราเอ็นโดไฟต์ *Xylaria obovata* สร้างสาร Cytochalasins ออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง (Dagne และคณะ, 1994) เป็นต้น ซึ่งจากการทำวิจัยครั้งนี้ซึ่งพบว่าราเอ็นโดไฟต์ *Xylaria* spp มีจำนวนความหลากหลายสูงมากในส่วนของจำนวนไอโซเลต และชนิดของราที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อของปาล์ม ดังนั้นราเอ็นโดไฟต์สกุลดังกล่าวอาจเป็นแหล่งของของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพที่น่าสนใจอีกแหล่งหนึ่งในการนำมาพัฒนาในทางเภสัชกรรม เพื่อนำสารออกฤทธิ์ดังกล่าวมาใช้ในการผลิตสาร ปฏิชีวนะ และยาสำหรับรักษาโรคมะเร็งต่อไป

5.3 การศึกษาความสัมพันธ์ของการเจริญราเอ็นโดไฟต์ต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพยับยั้งจุลินทรีย์

ผลจากการศึกษาหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตสารออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ พบว่าระยะเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ของราสายพันธุ์ A116-2^R คือ วันที่ 15 ในอาหารเหลว น้ำสกัดจากใบปาล์ม และ PDB ส่วนในอาหารเลี้ยงเชื้อ MEB คือวันที่ 21 และการให้อากาศมีผลต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ในอาหาร 2 ชนิด คือ น้ำสกัดจากใบปาล์ม และ PDB โดยพบว่าเมื่อมีการเลี้ยงเชื้อควบคู่กับการให้อากาศในอาหารเหลว น้ำสกัดจากใบปาล์ม มีผลให้ราสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ได้เร็วกว่าและมีปริมาณสารมากกว่าการเลี้ยงราและบ่มที่สภาวะนิ่ง แต่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MEB กลับพบว่าการเลี้ยงเชื้อโดยการบ่มในสภาวะนิ่งมีผลทำให้ปริมาณของสารออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์มีปริมาณสารมากกว่าในสภาวะการให้อากาศ แต่การให้อากาศพบว่าการสร้างสารเกิดขึ้นก่อนการเลี้ยงเชื้อในสภาวะนิ่ง ส่วนราสายพันธุ์ B316-1^R พบว่า มีความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ได้ปริมาณมากที่สุดในวันที่ 21 ในอาหารทั้ง 3 ชนิด แต่พบว่าการบ่มเชื้อในสภาวะนิ่งส่งเสริมให้ราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ B316-1^R สร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีกว่าการให้อากาศและจากการศึกษาการเจริญของราเอ็นโดไฟต์ 2 สายพันธุ์ดังกล่าวในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิด พบว่าราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ A116-2^R เจริญเติบโตได้ดีที่สุดในอาหารเหลวน้ำสกัดจากใบปาล์ม ในสภาวะการบ่มที่สภาวะนิ่ง และเจริญได้น้อยที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และในอาหารเลี้ยงเชื้อ MEB ตามลำดับ เมื่อมีการให้อากาศมีผลทำให้เซลล์มีการเจริญได้ดีมากกว่าการไม่ให้อากาศอย่างชัดเจน ราสายพันธุ์ B316-1^R พบว่ามีการเจริญได้ดีในอาหารทั้ง 3 ชนิด และการเลี้ยงเชื้อใน

สภาวะนี้จะมีผลทำให้เซลล์มีการเจริญเติบโตได้ดีกว่าสภาวะการให้อากาศ จากการศึกษากการแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพให้บริสุทธิ์เบื้องต้น โดยใช้ TLC โครมาโทกราฟี ปราบกฎแถบของสารบนแผ่น TLC สายพันธุ์ A116-2^R ปราบกฎแถบของสารแยกออกมาและแต่ละตำแหน่งค่า Rf เท่ากับ 0.15 0.21 0.38 0.75 .084 ตามลำดับ และราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ B316-1^R ปราบกฎแถบของสารแยกออกมา และแต่ละตำแหน่งค่า Rf เท่ากับ 0.17 0.20 0.36 0.65 0.76 ตามลำดับ

ปัจจัยทางกายภาพ ได้แก่ อุณหภูมิ (Feng และ Leonard, 1998) pH (Buchanan และ Ayres, 1975) และปริมาณอากาศที่สัมผัสกับผิวหน้าอาหาร (Guzman-de-Pena และ Ruiz-Herrera, 1997) อาจมีผลต่อความสามารถในการเจริญเติบโตและการสร้างสารทุติยภูมิบางชนิดของรา ส่วนปัจจัยของสารอาหาร เช่น แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ก็เป็นส่วนหนึ่งที่มีผลต่อการสร้างสาร mycotoxin และส่งผลต่อความแตกต่างของลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราได้เช่นเดียวกัน (Keller และคณะ, 1997) นอกจากนี้สารทุติยภูมิบางชนิดที่มีอยู่สม่ำเสมอในสปอร์ของราเพื่อใช้ในกระบวนการการพัฒนารงอกของสปอร์ เช่น สาร Butyrolactone พบในรา *Aspergillus terreus* ช่วยชักนำให้เกิดการงอกของสปอร์ สาร Zearalenone พบในรา *Fusarium graminearum* ช่วยชักนำให้เกิดการงอกของสปอร์และส่งเสริมการเกิดของ perithecial สาร Melanin พบในรา *Colletotrichum lagenarium* มีความสัมพันธ์เกี่ยวกับการสร้าง appressorial และช่วยปกป้องแสง UV ในรา *Alternaria alternata* สารทุติยภูมิบางตัวที่พบในสปอร์รา เช่น Butyrolactone เป็นสารโมเลกุลที่เป็นปัจจัยหลักในการควบคุมหน้าที่ต่างๆทางชีววิทยาในแบคทีเรีย เช่น การสร้างสารปฏิชีวนะและความรุนแรงของสารดังกล่าว (Davies และคณะ, 1998) ดังนั้นสารทุติยภูมิที่พบในสปอร์ราบางตัวอาจเกี่ยวข้องกับกระบวนการทางชีววิทยาของราเช่นเดียวกับแบคทีเรียก็เป็นได้

ผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติที่ได้จากราบ่อยครั้งสร้างซ้ำในกระบวนการพัฒนาของราและมีความซับซ้อนของกระบวนการสังเคราะห์ทางชีววิทยาซึ่งความซับซ้อนนี้อาจเนื่องมาจากปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการผลิตสารทุติยภูมิซึ่งประกอบด้วย (Calvo และคณะ, 2002)

(1) จำนวนของปัจจัยจากภายนอกและภายในการส่งเสริมให้เกิดกระบวนการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติ

(2) ความหลากหลายของการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์สำหรับการเปลี่ยนสารปฐมภูมิให้เปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ทุติยภูมิ

(3) การยึดติดกับแบบแผนการแสดงออกของยีนในการผลิตเอนไซม์สำหรับผลิตภัณฑ์โดยมีตัวกระตุ้นให้เกิดการ transcriptional หนึ่งยีนหรือมากกว่า

- (4) ความสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิดระหว่างกระบวนการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ทุติยภูมิกับสารปฐมภูมิ
- (5) ความสัมพันธ์ของผลิตภัณฑ์ทุติยภูมิกับระยะเวลาการพัฒนาของราโดยเฉพาะการงอกของสปอร์

5.4 การจำแนกสายพันธุ์ราเอนโดไฟต์ด้วยวิธีทางอณูวิทยา

เนื่องจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาและยังไม่สามารถจำแนกถึงสปีชีส์ได้ ดังนั้นจึงใช้ข้อมูลจากลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัสของ ITS rRNA gene และเมื่อนำลำดับเบสของยีนของราเอนโดไฟต์มาเปรียบเทียบกับลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัสของ ITS rRNA gene ที่บันทึกไว้ใน GeneBank DNA database จากเว็บไซต์ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> พบว่าราเอนโดไฟต์ทั้ง 7 สายพันธุ์ คือ A116-2^R B115^R B316-1^R B419-1^R B127^R A317^R A518-2^R มีความคล้ายคลึงกับลำดับเบสกับรา ดังนี้ ราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ A116-2^R มีความเหมือนกับลำดับเบสรา *Xylaria* sp. P055 เปอร์เซ็นต์ความเหมือน 99% ราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ B127^R มีความเหมือนกับลำดับเบสราในสกุล *Monilinia urnular* 4 สายพันธุ์ โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 91% ได้แก่ *Monilinia urnular* (Z73795.1) *Monilinia urnular* (Z73794.1) *Monilinia oxycocci* (Z73790.1) *Monilinia oxycocci* (Z73789.1) จึงยังไม่สามารถระบุถึงสกุลและสายพันธุ์ราที่แน่นอนได้เมื่อเทียบกับข้อมูลใน GeneBank เนื่องจากเมื่อสังเกตจากลักษณะสัณฐานวิทยาราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ B127^R มีลักษณะคล้ายกับราในสกุล *Xylaria* spp. แต่มีความแตกต่างอย่างชัดเจนกับราในสกุล *Monilinia urnular* ราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ B115^R มีความเหมือนกับลำดับเบส ราเอนโดไฟต์ไอโซเลต 933 และ ราเอนโดไฟต์ไอโซเลต 812 โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 100% ราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ B316-1^R B419-1^R มีความเหมือนกับลำดับเบส ราเอนโดไฟต์ไอโซเลต 933 มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 100% ส่วนราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ A317^R A518-2^R ไม่สามารถเทียบข้อมูลกับลำดับเบสใน GenBank ได้เนื่องจากไม่ประสบความสำเร็จในกระบวนการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตำแหน่งไอทีเอสด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ดังนั้นจากการเปรียบเทียบข้อมูลจาก GenBank ยังคงไม่สามารถระบุถึงถึงสปีชีส์ของราเอนโดไฟต์ในสกุล *Xylaria* spp. ได้ในการจัดจำแนกสายพันธุ์ราเอนโดไฟต์ในสกุล *Xylaria* spp. ในระดับของสปีชีส์ ดังนั้นในการทำการวิจัยครั้งต่อไปจึงมีความจำเป็นต้องใช้วิธีการจัดจำแนกรราในสกุล *Xylaria* spp. หลายวิธีเข้ามาช่วยในการจัดจำแนกในระดับของสปีชีส์ คือ โดยการชักนำให้ราเอนโดไฟต์ *Xylaria* spp. สร้างระยะสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศเพื่อใช้

รายการอ้างอิง

- Adhikari, T.G., Joseph, C.M., Yang, G., Philips, D.A., Nelson, L.M. 2001. Evaluation of bacteria isolated from rice for plant growth promotion and biological control of seeding disease of rice. *Canadian Journal of Microbiology*. **47**: 916-924.
- Aptroot, A. 2001. Lichenized and saprobic fungal biodiversity of single Elaeocarpus tree in Papua New Guinea, with the report of 200 species of ascomycetes associated with one tree. *Fungal Diversity* **6** : 1-11.
- Anderson, J.R., Edwards, R.L., and Whallay, A. J. S. 1983. Metabolites of the higher fungi. 21.3-methyl-3-4-dihydroisocoumarins and related-compounds from the ascomycete family Xylariaceae. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions*.**19**: 2185-2192.
- Arnold, A.E. and Herre, E.A. 2003. Canopy cover and leaf age affect colonization by tropical fungal endophytes: Ecological pattern and process in *Theobroma cacao* (Malvaceae). *Mycologia* **95** : 388-398.
- Arnold, A. E., Zuleyka, M., Gregory, S., Gilbert, P. D. C., Thomas, A., K.2000. Are tropical fungal endophytes hyperdiverse?. *Ecology Letters*. **3** : 267-274.
- Azevedo, J. L., Maccheroni Jr, W., Prreira, J.O., and De Aaujo, W.L. 2000. Endophytic microorganism: a review on insect control and recent advances on tropical plant. *Electronic J. Biotechnol.* **3** : 40-65.
- Azevedo, J.L.1998. Biodiversidade microbiana e potencial biotecnológico. In: *Ecologia Microbiana*, (eds), Melo, I.S. and Azevedo, J.L. Embrapa-CNPMA, Jaguariúna, pp.117-137.
- Ballio, A., Bottalico, A., Buonocore, V., Carilli, A., Vittorio, V., Graniti, A. 1996. Production and isolation of aspergillomaransmin B (lycomarasmic acid) from cultures of *Colletotrichum gloeosporioides* Penz.(*Gloeosporium olivarum* Alm.) *phytopathologia mediterranea* **8** :187-196.
- Bills, G.F. and Polishook, J.D. 1994. Microfungi from decaying leaves of *Heliconia mariae* (Heliconiaceae). *Brenesia* **41** :27-43

- Bai, Y., Aoust, F., Smith, D., Driscoll, B. 2002. Isolation of plant-growth –promoting Bacillus strains from soybean root nodules. *Canadian Journal of Microbiology*. **48**: 230-238.
- Barnett, H.L. and Hunter, B.B.1987. Illustrated genera of imperfect fungi. 4th ed. Macmillan, New York.
- Breen, J. P.1994. Acremonium endophytic interactions with enhanced plant resistance to insects. *Annual Review Entomol.* **39** :401-423.
- Boonphong, S. Kittakoop, P., Isaka, m., Pittayakhajonwut. D., Tanticharoen. M., Thebtaranonth, Y., 2001. Multiplolides A and B. new antifungal 10-membered latones from Xylaria mutiplex. *Journal natural Product.* **64** : 965-967.
- Bayman, P., Lebron, L.L., Tremblay, R.L., Lodge, D. 1997 Variation in endophytic fungi from root and leaf of Leppanthes (Orchidaceae). *New Phytologist* **135**: 143-149
- Bayman, P., Angulo- Sandoval, P., Baez, O.Z., Lodge, D.J.1998. Distribution and dispersal of Xylaria endophytes in two tree species in Puerto Rico. *Mycological Research.***100** (8) : 897-922.
- Breitenbach, J., and Kranzlin, F. 1981. Pilze der Schweiz. Vol 1 Ascomyceten. *Mycologia Luzern.* 313.
- Buchanan, R., L., Jr., and Ayres, J., C.1975. Effects of initial pH on aflatoxin production. *Apply Microbiology.***30**: 1050-1051.
- Calvo, A., M., Wilson, R., A., Bok, J., W., Keller, N., P. 2002. Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* **66**(3) : 447-459.
- Carroll, G. 1998. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology* **69** : 2-9.
- Clay, K. 1991. Endophytes as antagonists plant pests In: Microbial Ecology of Leaves, (eds) Andrews, J.H. and Hirano, S.S. Springer-Verlag, New York, USA, pp. 331-335
- Clay, K. 1988. Fungal endophytes of Grasses: A defensive mutualism between plants and fungi. *Ecology.* **69** (1): 10-16.
- Clay, K. 1987. Effects of fungal endophytes on the seed and seedling biology of Lolium perenne and Festuca arundinacea. *Oecologia.* **73**: 358-362.

Dang, E., Gunatilaka, A.A.L., Asmellash, S., Abate, D., Kingston, D. G.I., Hofmann, G.A., Jhonson, R. K., 1994. Two new cytotoxin cytochalasins ferom *Xylaria obovata*. *Tetrahedron* **50** : 5615-5620.

Davies, D., G., Parsek, M., R., Pearson, B., H., Iglewski, J., W., Costerton, J., W., Greenberg, E.,P. 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*.**280** : 295-298.

Dreyfuss, M. and Chapela, I.H.1994. Potential of fungi in the discovery of novel, low molecular weight pharmaceuticals. In: The Discovery of Natural Products with Therapeutic Potential, (ed) Gull, V.P.Butterworth-Heinemann, London, UK,pp.49-80.

Edward, R.L., and Whalley, A. J. S. 1979. Metabolites of the higher fungi Part 23. The punctaporonins. Novel bi-tri-, and tetra-cyclic sesquiterpenes related to caryophyllene from the fungus *Poronia punctata*(Linnaeus: Fries) Fries. Journal of the Chemical Society, Perkins Transactions 1, 823-831.

Engel, G., Von Milczewski, K.E., Prokopek, D., Teuber, M. 1982. Strain- specific synthesis of myophenolic by *Penicillium roqueforti* in blue-veined cheese. Applied Environmental Microbiology. **43** : 1034-1040.

Feeath, S.H. 2000. Fungal endophytes and host plant symbioses: Mutualism, neutralism, or antagonism? *American Zoologist* **40** : 1011.

Feller, I.C. 1995. Effects of nutrient enrichment on growth and herbivory of dwarf red mangrove (*Rhizophora mangle*). *Ecological monograph*. **65**: 477-505.

Feng, G., H., Leonard, T., J.1998. Culture conditions control expression of the genes for aflatoxin and sterigmatocystin biosynthesis in *Aspergillus parasitticus* and *A.nidalans*. Apply Environment Microbiology. **64** : 2275-2277.

Fisher, P. J., Petrini, O. 1992. Fungal saprobes and pathogens as endophytes of rice(*Oryza sativa* L.) *New phytologist*. **120**: 137-143.

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

Frohlich, J., Hyde, K. D. and Petrini, O. 2000. Endophytic fungi assoiated with palms. *Mycological. Resarch***104** (10) :1202-1212.

- Ge, H. M., Shen, Y., Zhu, C. H., Tan, S., H., Ding, H., Song, Y. C., Tan, R. X. 2008. Penicidones A-C, three cytotoxic alkaloidal metabolites of an endophytic *Penicillium* sp. *Phytochemistry* **69** : 571-576.
- Greenhalgh, G.N. and Chesters, C.C.G.1968. Connidiophore morphology in some British members of *Xylaria* ceae. *Transactions of the British Mycological Society* **51**: 57-82.
- Huang, Z., Cai, X., Shao, C., She, Z., Xia, X., Chen, Y., Yang, J., Zhou, S., Lin, Y.2008. Chemistry and weak antimicrobial activities of Phomopsins Produced by mangrove endophytic fungus *Phomopsis* sp. ZSU-H76. *Phytochemistry*. **69**: 1604-1608.
- Huang Y., Wang J., Li G., Zheng Z., Su W. 2001. Antitumor and antifungal activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical plant *Texus mairei*, *Cephalataxus fortunei* and *Torreya grandis*. *FEMS Immunol. Medical Microbiology*. **31**:163-167.
- Hyde, K.D. 2001. where are the missing fungi? Dose Hong Kong have any answer? *Mycological Research*. **105**: 1514-1518.
- Isaka, M., Berkaew, P., Intereya, K., Komwijit and Sathitkunanon, T. 2007. Antiplasmodium and antiviral cyclohexadepsipeptides from the endophytic fungus *Pullularia* sp. BCC 8613. *Tetrahedron* **63**: 6855-6860.
- Ju, Y.M. and Rogers, J.D. 1996. A Revision of the Genus *Hypoxylon*. Aps press, St Paul, Minnesota.
- Keller, N.,P., Nesbitt, C., Sarr, B., Phillips, T., D., Burow, G., B. 1997. pH regulation of sterigmatocystin and aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus* spp. *Phytopathology* **87** : 643-648.
- Kobayashi D.Y., Palumbo, J.D.2000. Bacteria endophytes and their effects on plants and uses in agriculture. In: Bacon, C.W., white, J.F.(eds) *Microbial endophytes*. Dekker, New York, pp 199-236.
- Kuldau, G.A., Liu, J.S., White, J.F., Siegel, M.R., Schardl, C.L. 1997. Molecular systematics of Clavicipitaceae supporting monophyly of genus *Epichloe* and form genus *Ephelis*. *Mycologia* **89** : 431-441.
- Kumar, D.S.S., Hyde, K.D. 2004. Biodiversity and tissue-recurrence of endophytic fungi in *Tripterygium wilfordii*. *Fungal divers* **17**: 69-90.

- Lambers, H., and Poorter .1992. Inherent variation in growth rate between hight plant: a search for physiological causes and ecological consequences. *Advances Ecology Research*. **23**: 187-261.
- Li, J.Y., Harper, J.K., Grant, D.M., Tomb, B.O., Bashyal, B., Hess, W.M., StrobG.A.2000.Ambuic acid, a highly fonctionnallized cyclohexenone with antifungalactivity from *Pestalotiopsis* spp. and *Monochactia* sp.. *Phytochem*. 56: 463-468.
- Lu, H., Zou, W X., Meng, JC., Hu, J., and Tan, R.X. 2000. New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemiaia annua*. *Plant Science*. **151**: 67-73.
- Lui, X. Dong, M. Chen, X. 2008. Antimicrobial acyivity of an endophytic *Xylaria* sp. YX-28 and identification of its antimicrobial compound 7-amino-4-methylcoumarin. *Appl Microbiol Biotechnol*. **78** : 241-247.
- Lodge, D.J.1997. Factor related to diversity of decomposer fungi in tropical forests. *Biodiversity and Conversation* **6** : 681-688.
- Lodge, D.J., Fisher.,P.J., Sutton, B.C. 1996. Endophytic funfi of *Manikara bidentata* leaves in Puerto Rico. *Mycologia* **88** : 733-738.
- May, R.M. 1991. A fondness for Fungi. *Nature* 352: 475-476.
- Makamol, S. 1998. Endophytic fungi in *Tectona grandis* L. (Teak). Doctorrail dissertation, Liverpool John Moore University.
- Moss, M.O. 1984. The mycelial habit and secondary metabolite production : In *The ecology and physiology of fungal mycelium*.D.H. Jennings and A.D.M. Rayner, (eds): 127-142. Cambridge University Press, Cambridge.
- Murray, P.R. and Baron, M.A.1999. Manual of Clinical Microbiology. ASM Press, Washington,DC.
- Palaga, T., Kataoka, T., Woo, J.T., 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.

- Penna, E.B.S. 2000. Microrganismos endofiticos em erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) e variabilidade genetica em *phylosticta* sp. por RAPD. Ms. Thesis, UEPR, Curitiba, Brazil, pp.123.
- Petrini, O. Stone. J. Carroll, F.E. 1982. Endophytic fungi in evergreen shrubs in western Oregon : a pliliminary study. *Canadian Journal of Botany* **60** : 789-790.
- Petrini, L. E., Petrini O. 1985. Xylariaceous asendophytes. *Sydowia* 38:216-234.
- Petrini,O.1991. Fungal endophyte of the tree leaves, pp.179-197. In Andrews,J.H. And rews,and S.S.Hirano (ed.), *Microbial Ecology of the phyllosphere*. Springer-Verlag., New york.
- Pereira, J.O., Careiro-vieira, M.L. and Azevedo, J.L. 1999. Endophytic fungi from *Musa acminata* and their reintroduction into axenic plants. *World Journal of Microbiology and Biotchnology*. **15** : 37-40.
- Pereira, J.O., Azevedo, J.L., petrini, O.1993. Endophytic fubgi of *Stylosanthes*: A first report. *Mycologia*. **85**: 362-364.
- Pinruan, U., Lumyong, S., Mckenzin, E.H.C., Jones, E.B.G.,and Hyde, K.D. 2004. Three new species of *Craspedodidymum* from palm in Thailand. *Mycoscience*. **45**:177-180.
- Poyser, J.P., Edwards, R.L., Anderson, J. R., Hursthouse, M.B., Walker, N.P. C., Sheldrick, G. M., Whalley, A.J. S. 1986. Punctatins A,D, E, and F (antibiotics M 95464, M167906, M171950 and M189122) isomeric allylic alcohols from the fungus *Poronia punctata*: X ray crystal structures of D and E acetonide. *Journal of Atibiotics* **39**: 167-169.
- Redman, R.S., Dunigan, D.D., Rodriguez, R.J. 2001. Fungal symbiosis from mutualism to parasitism: who controls the outcome, host or invader? *New Phytologist* **151**: 705-716.
- Redman, R. S., Sheehan, K. B., Stout, R. G., Rodriguez, R. J., Henson, J. M. 2002. Thermotolerance generated by plant/fungal symbiosis. *Science*. **22**: 1581.
- Rodrigues, K.F. and Samuels, G.J. 1990. Preliminary study of endophytic fungi in a tropical palm. *Mycological Research* **94**: 827-830.
- Rodrigues, K.F. 1992. endophytic fungi in the tropical palm *E.oleraceae* Mart., Ph.D. thesis, City University of New York. 258 pp.

- Rodrigues, K.F. 1994. The foliar fungal endophytes of the amazonian Palm *Euterpe oleracea*. *Mycologia*. **86**: 376-385.
- Rodrigues, K. F. and Petrini, O. 1997. Biodiversity of endophytic fungi in tropical regions. In: Hyde, K. D. Ed. Biodiversity of Tropical Microfungi. Hong Kong, University of Hong Kong Press, pp. 57-69.
- Rodrigues, K. F. 1999. The foliar fungal endophytes of the amazonian palm *Euterpe oleracea*. *Mycologia*. **86**: 376-385.
- Rygiel, P.T. and Anderson, C.T. 1994. Mycorrhizae alter quality and quantity of carbon allocated belowground. *Nature* **369** : 58-60.
- Saikkonen, J., Wail P., Helander M. and Faeth, S.H. 2004. Evolution of endophyte-plant symbioses. *TRENDS in plant Science*. **9** : 275-279.
- Schardl, C.L. and Philips, T.D. 1997. Protective grass endophytis: where are they from and where are they going. *Plant dis.* **81** : 430-438.
- Schulz, B., Römmert, A-K., Dammann, U., Aust, H-J., Strack, D. 1999. The endophyte-host interaction: a balanced antagonism. *Mycological Research*. **103** : 1275-1283.
- Schulz, B., and Boyle, C. 2005. The endophytic continuum. *Mycological Research*. **109** : 661-687.
- Shiono, Y. Shimanuki, K., Hiramatsu, F., Koseki, T., Tetsuya, N. F., Kimura K. 2008. Pyrrospiroenes A and B , apoptosis inducers in HL-60 cells, from an endophytic fungus, *Neonectria ramulariae* Wollenw KS-246. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **18** : 6050-6053.
- Shivas, R.G. and Hyde K.D. 1997. Biodiversity of plant pathogenic fungi in the tropics. In: Biodiversity of tropical Microfungi (ed) Hyde, K.D. Hong Kong University Press, Hong kong, China, pp 47-56.
- Sieber, T. 2007. Endophytic fungi of forest trees: are they mutualists? *Fungal Biology Reviews*. **21**: 75-89
- Stierle, A., Strobel, G.A. and Stierle, D. 1995. Taxol and taxane production by *Texomyces andreanae* a Stinson, M., Ezra, D., Hess, W.M., Sears, J. and Strobel, G. 2003. An

- endophytic *Gliocladium* sp. of *Eucryphia cardifolia* producing selective volatile antimicrobial compound. *Plant science*. **165**:913-922.
- Strobel, G., Yang, X., Sears, J., Kramer, R., Sidhu, R.S. and Hess, W.M. 1996. Taxol from *Pestalotiopsis microspora* an endophytic fungus of *Taxus wallichiana*. *Microbiology*. **142**:435-440.
- Stinson, M., Ezra, D., Hess, W. M., Sears, J. and Strobel, G. 2003. An endophytic *Gliocladium* sp. of *Eucryphia cardifolia* producing selective volatile antimicrobial compound. *Plant Science*. **165**: 913-922.
- Stone, J.K., Bacon, C.W., White, J.E. 2000. An overview of endophytic microbes: endophytism defined. In: Bacon, C.W. White, J.F.(eds.) *Microbial endophytes*. Marcel Dekker, New York, pp 3-29.
- Suryanarayana, T.S., Vijaykarishna, D. 2001. Fungal endophytes of aerial roots of *Ficus benghalensis*. *Fungal Divers* **8** : 155-161.
- Varma, A., Verma, S., Sudha, Sahay, N., Bütchorn, B., Franken, P. 1999. Piriformospora indica, a cultivable plant-growth-promoting root endophyte. *Applied and Environmental Microbiology*. **65**: 2741-2744.
- Whalley, A.J.S. and Edwards, R. L. 1987. Xylariaceae fungi : use of secondary metabolites. In *The Evolutionary Biology of Fungi* (ed. A.D.M.) Rayner, C. M. Brasier and D. Moore). pp. 423-434. Cambridge University Press: Cambridge UK.
- Whalley, A.J.S. The Xylariaceae way of life. *Mycological Research*. **100**(8) : 897-922.
- Whalley, A.J.S. 1996. *Biscogniauxia*, *Camillea* and *Hypoxylon* (ascomycetes) in South East Asia. In *Tropical Mycology* (ed. k.k. Janardhanan, D.L. Howksworth, C. Rajendran and K. Natarajan) in press. Oxford and IBH. Publishing Co: New Delhi, India.
- Yu, B. Z., Zhang, G. H., Du, Z. Z., Zheng, Y. T., Xu, J.C., Lou, X.D. 2008. Phomoeuphorbins A-D, azaphilones from the fungus *Phomopsis eiphorbiae*. *Phytochemistry* **69** : 2523-2526.
- Zou, W.X., Meng, J. C., Lu, H., Chen, G. X., Shi, G. X., Zhang, T. Y., and Tan, R. X. 2000. Metabolites of *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus in *Artemisia annua*. *Journal of Natural Product*. **63**: 1529-1530.



ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. โปเตโต เดกซ์โทรส อการ์ (Potato Dextrose Agar)

มันฝรั่ง	200.0	กรัม
เดกซ์โทรส (Dextrose)	20.0	กรัม
วุ้นผง	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ต้มมันฝรั่งในน้ำจนเดือดประมาณ 20 นาที กรองเอาส่วนน้ำใสมาใช้

ปรับพีเอชเท่ากับ 5.6

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

2. มอลต์ เอกซ์แทรก อการ์ (Malt Extract Agar)

สารสกัดจากมอลท์ (malt extract)	20.0	กรัม
กลูโคส	20.0	กรัม
แบคโตเปปโตน (Bacto peptone)	1.0	กรัม
วุ้นผง	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

3. โธ๊ต มีล อการ์ (Oat Meal Agar)

ข้าวโอ๊ต (Oat meal)	20.0	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast Extract)	1.0	มิลลิลิตร
วุ้นผง	18.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ต้มข้าวโอ๊ตในน้ำกลั่นโดยต้มให้เดือดประมาณ 10-15 นาที นำมากรองผ่านผ้าขาวบาง เติมน้ำกลั่นลงไปให้อาหารจนครบ 1,000 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจากยีสต์ ปรับพีเอชเท่ากับ 7.0

นึ่งฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

4. โปเตโต เดกซ์โตรส บรอก (Potato Dextrose Broth)

มันฝรั่ง	200.0 กรัม
เดกซ์โตรส (Dextrose)	20.0 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

ต้มมันฝรั่งในน้ำจนเดือดประมาณ 20 นาที กรองเอาส่วนน้ำใสมาใช้

ปรับพีเอชเท่ากับ 5.6

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

5. มอลต์ เอกซ์แทรก บรอก (Malt Extract Broth)

สารสกัดจากมอลต์ (malt extract)	20.0 กรัม
กลูโคส	20.0 กรัม
แบคโตเปปโตน (Bacto peptone)	1.0 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

6. น้ำสกัดจากไบปาล์ม

ไบปาล์มหั่นฝอย	20.0 กรัม
เดกซ์โตรส (Dextrose)	20.0 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

ต้มไบปาล์มหั่นฝอยในน้ำจนเดือดประมาณ 20 นาที กรองเอาส่วนน้ำใสมาใช้

ปรับพีเอชเท่ากับ 5.6

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

7. นิวเทรียนท์ อการ์ (Nutrient Agar)

สารสกัดจากเนื้อ (Beef extract)	3.0 กรัม
แบคโตเปปโตน (Bacto peptone)	5.0 กรัม
วุ้นผง	18.0 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

8. นิวเทรียนท์ บรอก (Nutrient Broth)

สารสกัดจากเนื้อ (Beef extract)	3.0	กรัม
แบคโตเปปโตน (Bacto peptone)	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน		

9. แชนบรอก เดกซ์โตรส อการ์ (Sabouraud Dextrose Agar)

แบคโตเปปโตน (Bacto peptone)	10.0	กรัม
เดกซ์โตรส (Dextrose)	40.0	กรัม
วุ้นผง	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
ปรับพีเอชเท่ากับ 5.6		
นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน		

10. มุลเลอร์ ฮินตัน อการ์ (Mueller-Hinton Agar)

สารสกัดจากเนื้อ (Beef extract)	2.0	กรัม
เคซีน (Acid Hydrolysate of Casein)	17.5	กรัม
แป้ง (starch)	1.5	กรัม
วุ้นผง	17.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน		

11. แชนบรอก เดกซ์โตรส บรอก (Sabouraud Dextrose Broth)

แบคโตเปปโตน (Bacto peptone)	10.0	กรัม
เดกซ์โตรส (Dextrose)	40.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
ปรับพีเอชเท่ากับ 5.6		
นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน		

12. อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 (stock reagent)

อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 ผงสำเร็จรูป	10.4	กรัม
โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต	2.0	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำปลอดประจุปริมาณ 800 มิลลิลิตร กวนให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้มีค่าประมาณ 6.9-7.4 ด้วย HCl ความเข้มข้น 1N ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองผ่านหัวกรองอาหารเลี้ยงเซลล์ปราศจากเชื้อขนาด 0.22 ไมครอนเมตร ลงในขวดใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ปราศจากเชื้อขนาด 90 มิลลิลิตร ปิดฝาและพันพาราฟิล์ม เก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซียเซียส

13. อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 ที่มี Fetal Bovine Serum ความเข้มข้น 10% (working reagent)

อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 (stock reagent)	90	มิลลิลิตร
ซีรัม (inactivated fetal bovine serum)	10	มิลลิลิตร
Hepes, Free acid	1	มิลลิลิตร
Sodium pyruvate	1	มิลลิลิตร
Penicillin G	10	ไมโครลิตร
Streptomycin	50	ไมโครลิตร

14. อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 สำหรับเก็บเซลล์แช่แข็ง (freezing media)

อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 (working reagent)	9	มิลลิลิตร
DMSO	1	มิลลิลิตร

15. สารละลายเทรซ ซอลล์ (Trace Salts Solution)

เฟอรัสซัลเฟต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.1	กรัม
แมงกานีสคลอไรด์ (MnCl_2)	0.1	กรัม
ซิงค์ซัลเฟต ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อโดยการกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 μm และเติมลงในอาหารที่ฆ่าเชื้อแล้วที่ อุณหภูมิ 45-50 °C

ภาคผนวก ข

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. โซเดียมไฮโปคลอไรด์เข้มข้น 5%

เติมน้ำกลั่นเพื่อปรับเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของสารให้ได้ความเข้มข้นตามที่ต้องการ

2. 0.5 McFarland Standard

BaCl₂·2H₂O 1.175 กรัม

น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

ละลาย BaCl₂·2H₂O 1.175 กรัมในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ปิเปตต์สารละลาย BaCl₂·2H₂O ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติมลงในสารละลาย 1% H₂SO₄ ปริมาตร 99.5 มิลลิลิตร จะได้สารแขวนลอยที่มีลักษณะขุ่น เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้องได้นาน 6 เดือน

3. บัฟเฟอร์ Phosphate buffer saline (PBS, Ca²⁺, Mg²⁺ free) ความเป็นกรด-ด่าง 7.4

NaCl 8.0 กรัม

KCl 0.2 กรัม

NaHPO₄ 1.44 กรัม

KH₂PO₄ 0.24 กรัม

นำแต่ละส่วนละลายในน้ำปลอดประจุ 800 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.4 ด้วย HCL เข้มข้น 1N หรือ NaOH เข้มข้น 1N ปรับปริมาตรด้วยกระบอกตวงจนครบ 1000 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

4. สารละลาย MTT 5 mg/ml ใน PBS

MTT 50 มิลลิกรัม

PBS 10 มิลลิลิตร

ละลาย MTT ใน PBS กรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร แบ่งใส่หลอดไมโครทิวป์ปลอดเชื้อขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 1 มิลลิลิตร หุ้มแผ่นฟลอยด์เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C

5. สารละลาย 0.04 N HCl ใน isopropanol

เติม HCl 0.331 มิลลิลิตร ลงใน 80 มิลลิลิตร isopropanol ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตรด้วย isopropanol เก็บที่อุณหภูมิห้อง

6. Washing buffer

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

เติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว (Autoclaved water) จนได้ปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซียเซียส

7. 2X CTAB lysis buffer

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

เติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วจนได้ปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

8. Chloroform/isoamyl alcohol (24: 1 v/v)

Chloroform	192	มิลลิลิตร
Isoamyl alcohol	8	มิลลิลิตร

9. Polyethylene glycol (PEG) 20%

โพลีเอทิลีนไกลคอล (Polyethylene glycol , PEG)	20	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	14.61	กรัม
น้ำกลั่น	200	มิลลิลิตร

ละลาย PEG และ NaCl ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 200 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

10. TE buffer (Tris-EDTA buffer)

Tris-Cl (PH 8), 1 M	10	มิลลิลิตร
EDTA (PH 8), 0.5 M	2	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1	ลิตร

เติมน้ำกลั่นลงในส่วนผสมของ Tris-Cl และ EDTA นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

11. สารเคมีในการทำปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR) และ อิเล็กโทรโฟเรซิส (Electrophoreses)

11.1 10X TBE buffer (10X Tris-boric acid EDTA)

ทริส-เบส (Tris-base)	54	กรัม
บอริก (H ₂ BO ₃)	27.5	กรัม
EDTA 4.65 กรัม		
น้ำกลั่น	500	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 500 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

11.2 Ethidium bromind, 10 mg/ ml

เติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงในเอทิลเดียมโบรไมด์ (C₂₁H₂₀BrN₃) 0.2 กรัม ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

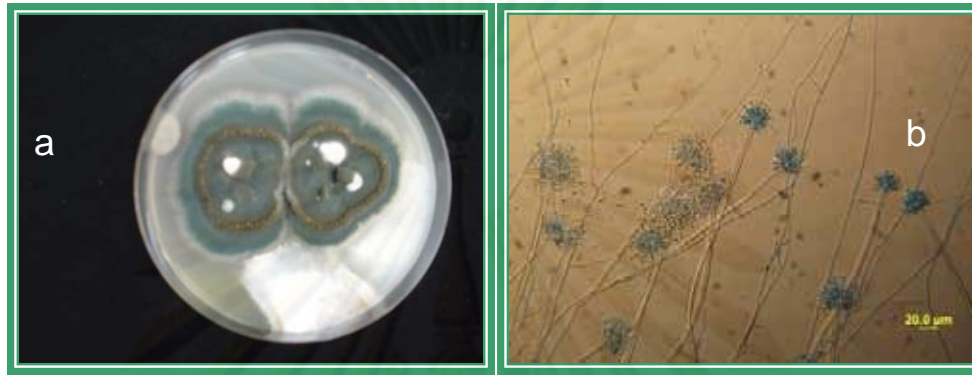
11.3 Agarose gel 1.5% (w/w)

อะกาโรส (agarose)	1.65	กรัม
TBE	110	มิลลิลิตร
เอทิลเดียมโบรไมด์ (C ₂₁ H ₂₀ BrN ₃)	4	ไมโครลิตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

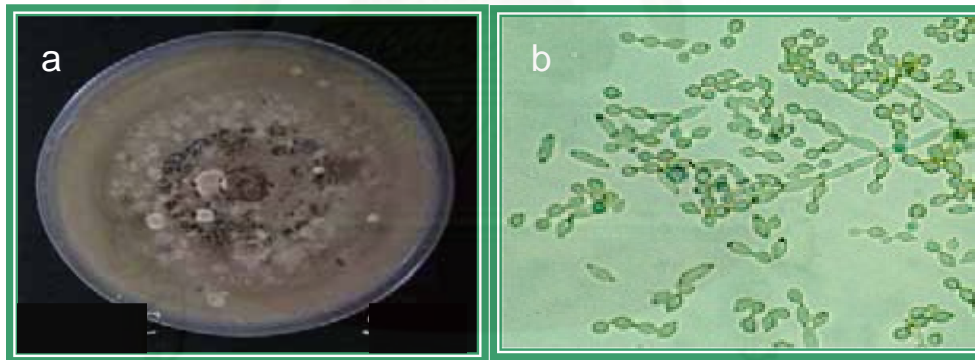
ภาคผนวก ค

4. 1 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราเอนโดไฟต์จัดจำแนกตามสกุล



รูปที่ 4.1 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราเอนโดไฟต์สกุล *Aspergillus* spp.

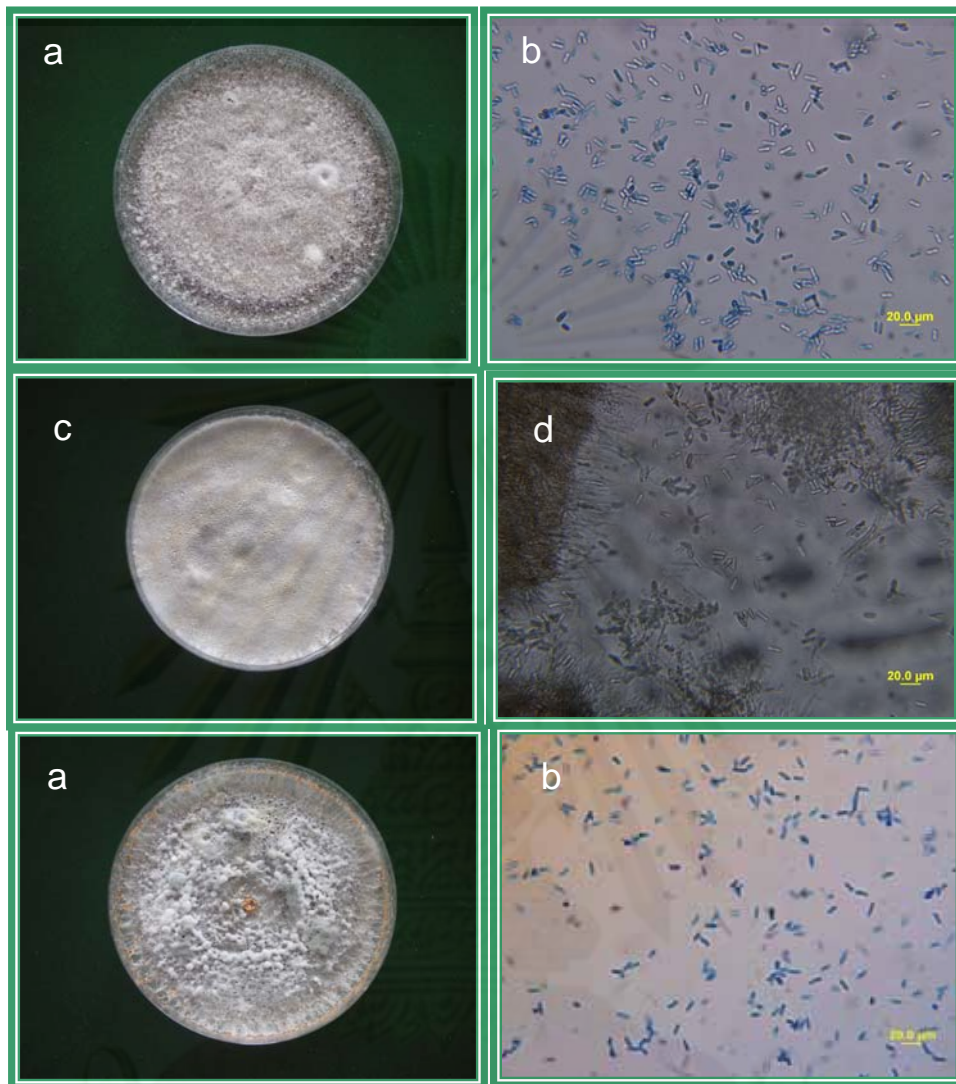
- (a) ลักษณะของโคโลนีมีสีเขียว สร้างรังศ์วัตุสีน้ำตาลบนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ PDA อายุ 20 วัน (b) ลักษณะโครงสร้างของสปอร์และโคนิเดีย



รูปที่ 4.2 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราเอนโดไฟต์สกุล *Cladosporium* spp.

- (a) ลักษณะของโคโลนีมีสีเทา สร้างรังศ์วัตุสีดำบนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ PDA อายุ 20 วัน (b) ลักษณะโครงสร้างของสปอร์ โคนิเดียมีสีใสลักษณะคล้ายผลมะนาว

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

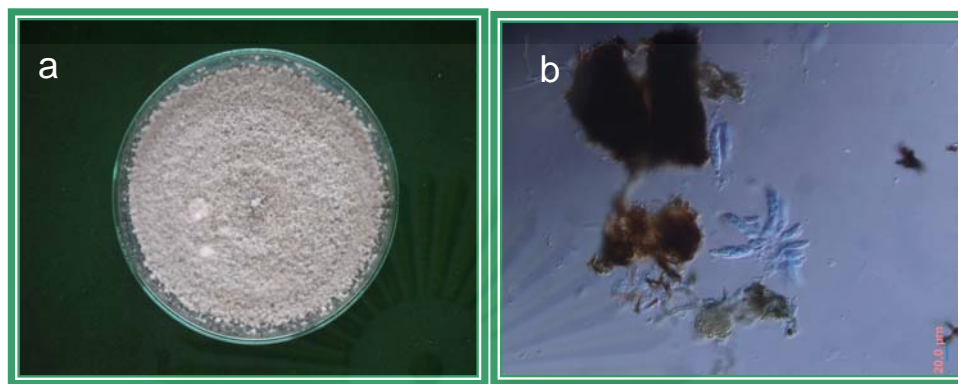


รูปที่ 4.3 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราแอนโดไฟต์สกุล *Colletotrichum* spp.

(a) ลักษณะของโคโลนีรา *Colletotrichum* sp.1 อาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ PDA อายุ 20 วัน โคโลนีมีสีเทาเขียว (b) ลักษณะโคนินเดี่ยว (conidia) รูปร่างรี มีสีใส

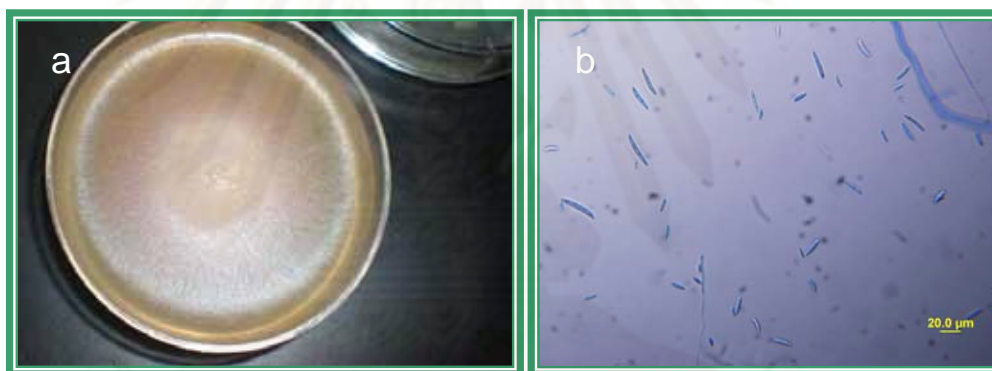
(c) ลักษณะของโคโลนี *Colletotrichum* sp.2 บนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ PDA อายุ 20 วัน โคโลนีมีสีเทาออกเหลือง (d) ลักษณะโคนินเดี่ยวรูปร่างรี มีสีใส

(e) ลักษณะของโคโลนี *Colletotrichum* sp.3 บนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ PDA อายุ 20 วัน โคโลนีมีสีเทาเขียว เส้นใยฟู สร้างรงควัตถุสีส้มบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (f) ลักษณะโคนินเดี่ยว รูปร่างรี มีสีใส



รูปที่ 4.4 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราเอนโดไฟต์สกุล *Glomerella* sp.

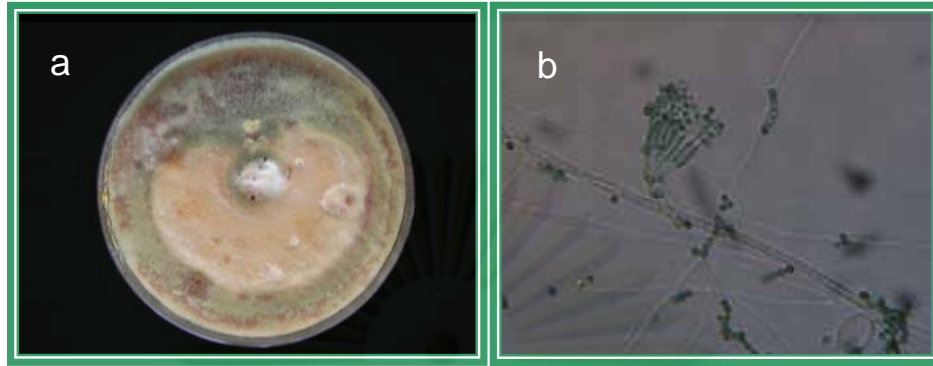
(a) ลักษณะของโคโลนีบนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ PDA อายุ 20 วัน โคโลนีมีสีเทา เส้นใยฟู ไม่สร้างรังศ์วัฏบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (b) ลักษณะแอสคัส (ascus) ซึ่งมี 8 แอสโคสปอร์บรรจุอยู่ภายใน



รูปที่ 4.5 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราเอนโดไฟต์สกุล *Fusarium* sp.

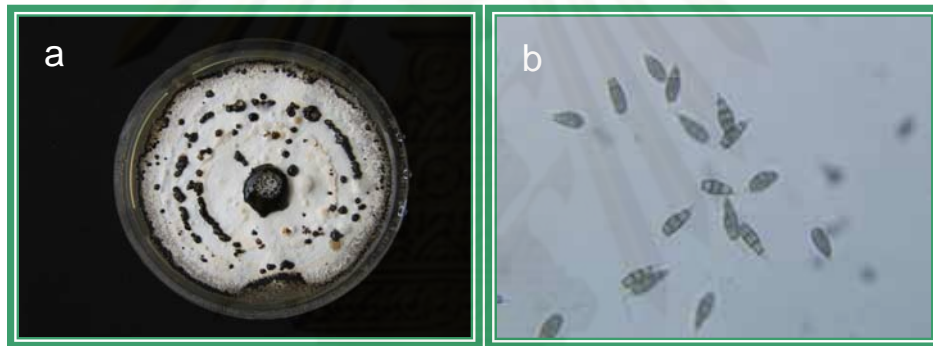
(a) ลักษณะของโคโลนีบนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ PDA อายุ 20 วัน ลักษณะโคโลนีมีสีเหลืองอ่อนเส้นใยเรียบติดกับอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ (b) ลักษณะโคนิเดียมีลักษณะคล้ายรูปเคียว สปอร์มี 2 แบบ megaspore และ microspore

ศูนย์วิจัยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



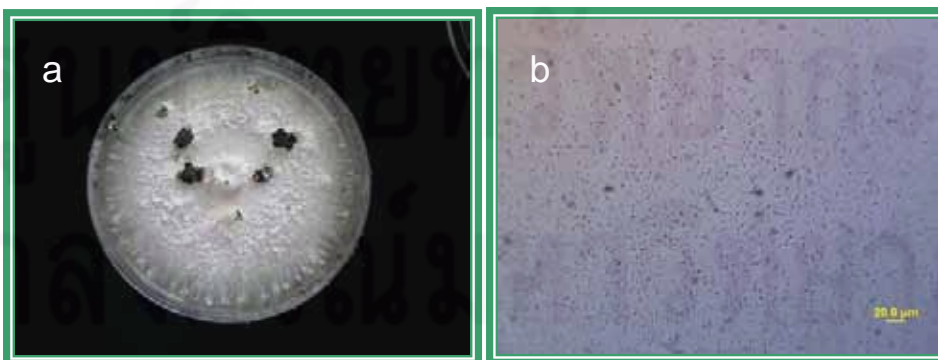
รูปที่ 4.6 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราเอนโดไฟต์สกุล *Penicillium* sp.

(a) ลักษณะของโคโลนีบนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ MEA อายุ 20 วัน โคโลนีมีสีเหลือง สร้างรังค์
 วัตถุประสงค์น้ำตาลบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (b) ลักษณะโครงสร้างของสปอร์และโคนิเดีย



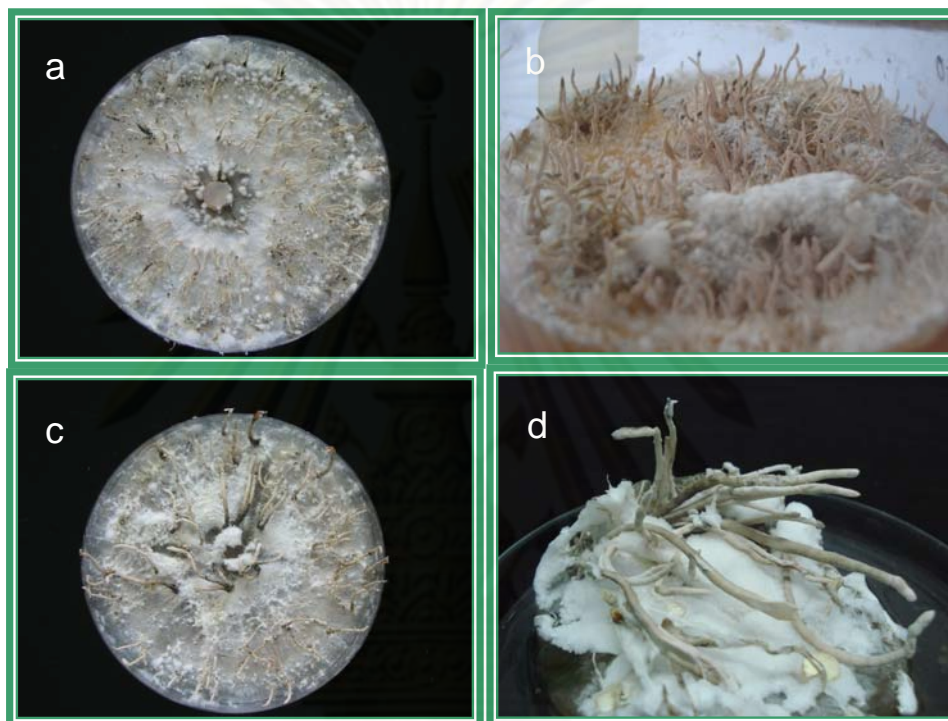
รูปที่ 4.7 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราเอนโดไฟต์สกุล *Pestalotiopsis* sp.

(a) ลักษณะของโคโลนีบนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ MEA อายุ 20 วัน โคโลนีมีสีขาวเหลือง เส้นใย
 เรียบ สร้างรังค์วัตถุประสงค์น้ำตาลบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (b) ลักษณะโคนิเดียเป็นรูปรี มีสี
 น้ำตาลใสมีผนังกันมีเส้นใยยื่นออกมา 2 เส้นด้านบนของสปอร์



รูปที่ 4.8 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราเอนโดไฟต์สกุล *Phomopsis* spp.

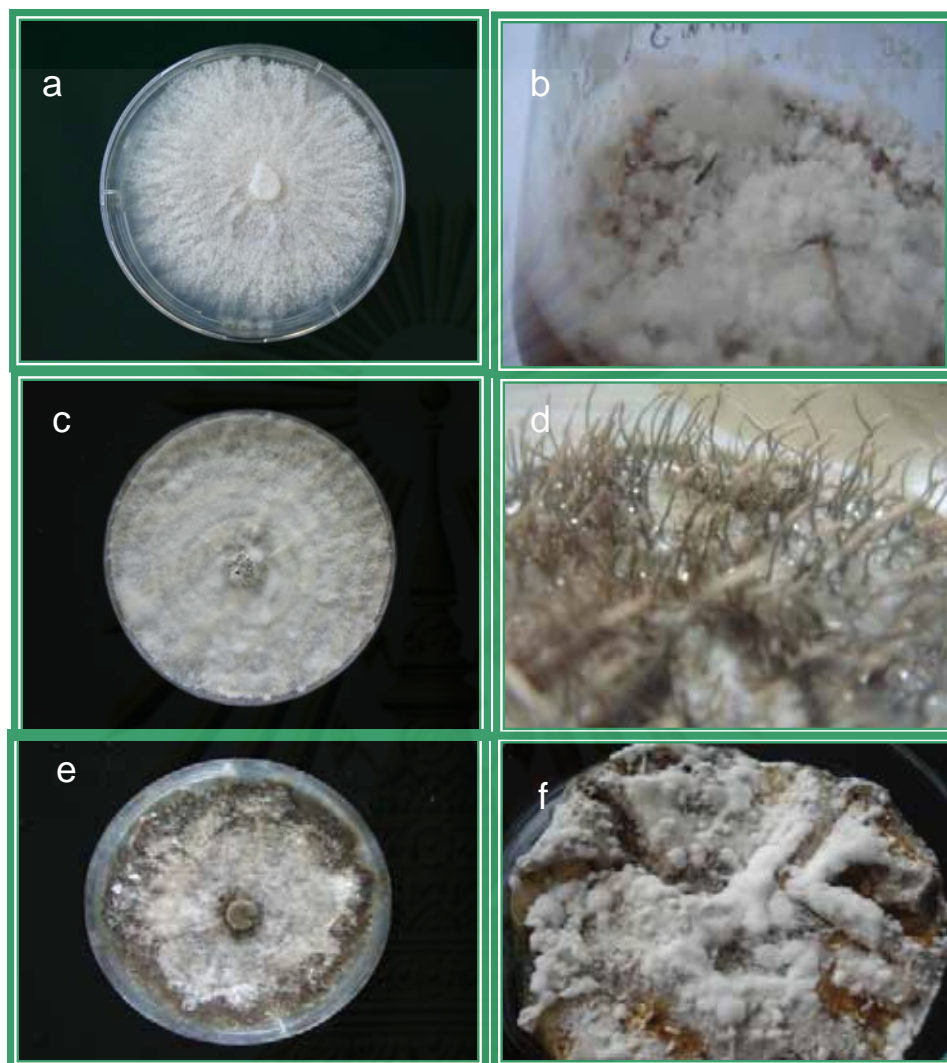
- (a) ลักษณะของโคโลนีบนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ MEA อายุ 20 วัน โคโลนีมีสีขาว เส้นใยบดสร้างรังศ์วัตถุสีดำบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (b) ลักษณะโคนีเดียรูปร่างรี สปอร์มี 2 แบบ magaspore และ microspore



รูปที่ 4.9 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราเอนโดไฟต์สกุล *Xylaria* spp.

(a) *Xylaria* sp.1 บนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ PDA โคโลนีมีสีขาว เส้นใยฟู สร้างสโตรมาทรงกระบอกสีน้ำตาลอ่อนยาว 0.5-1.0 เซนติเมตร (b) ลักษณะสโตรมาในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ PDB อายุ 30 วัน เส้นใยมีสีขาว เส้นใยฟู สร้างสโตรมาสีน้ำตาลอ่อนยาว 0.5-1.0 เซนติเมตร (c)

(b) *Xylaria* sp.2 บนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ PDA อายุ 20 วัน โคโลนีมีสีขาว เส้นใยฟู สร้างสโตรมารูปร่างทรงกระบอกยาวประมาณ 1 เซนติเมตร บริเวณฐานด้านล่างของสโตรมามีสีออกเทาเขียว ด้านบนมีสีขาวออกน้ำตาล (d) ลักษณะโคโลนีในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ PDB อายุ 30 วัน เส้นใยมีสีขาว สร้างสโตรมายาว 1-5 เซนติเมตร บริเวณฐานด้านล่างของสโตรมามีสีดำ ด้านบนมีสีน้ำตาลอ่อน ส่วนปลายของสโตรมา บางครั้งแตกออกเป็นแฉก

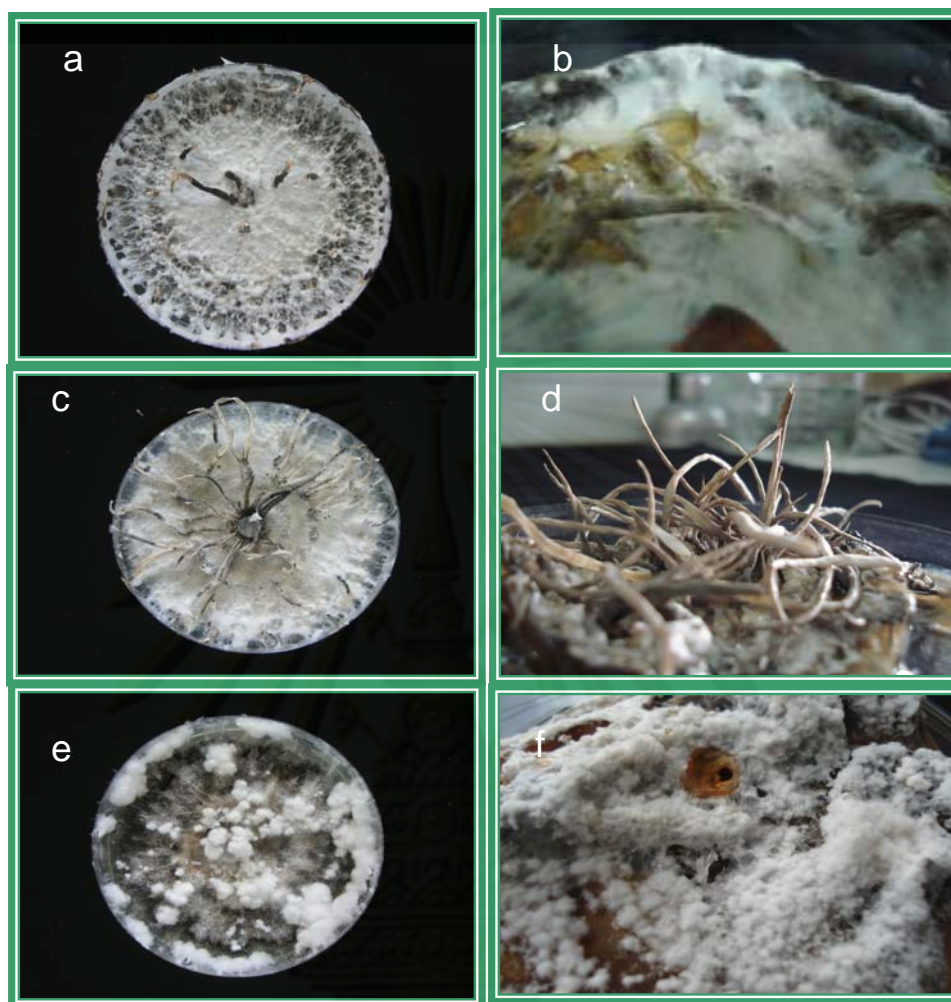


รูปที่ 4.10 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราเอนโดไฟต์สกุล *Xylaria* spp.

(a) *Xylaria* sp.3 บนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ PDA โคโลนีมีสีขาว ไม่สร้างสโตรมาบนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ (b) ลักษณะโคโลนีในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ PDB อายุ 30 วัน สร้างสโตรมาสีน้ำตาลอ่อนยาว 0.5-1.0 เซนติเมตร ปลายด้านบนสร้างโคนเดี่ยวลักษณะคล้ายผงแป้งสีดำ

(c) *Xylaria* sp.4 บนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ PDA อายุ 20 วัน โคโลนีมีสีเทา สร้างสโตรมาขนาดเล็กลายประมาณ 0.5 เซนติเมตรบนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ (d) ลักษณะโคโลนีในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ PDB อายุ 30 วัน เส้นใยมีสีเทาสร้างสโตรมาขนาดเล็กสีเขียวออกดำยาวประมาณ 1 เซนติเมตร

(e) *Xylaria* sp.5 บนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ PDA อายุ 20 วัน โคโลนีมีสีน้ำตาล เส้นใยฟูสีน้ำตาล ไม่สร้างสโตรมาในอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ (f) ลักษณะโคโลนีในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ PDB อายุ 30 วัน เส้นใยสีน้ำตาล ไม่สร้างสโตรมาในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ



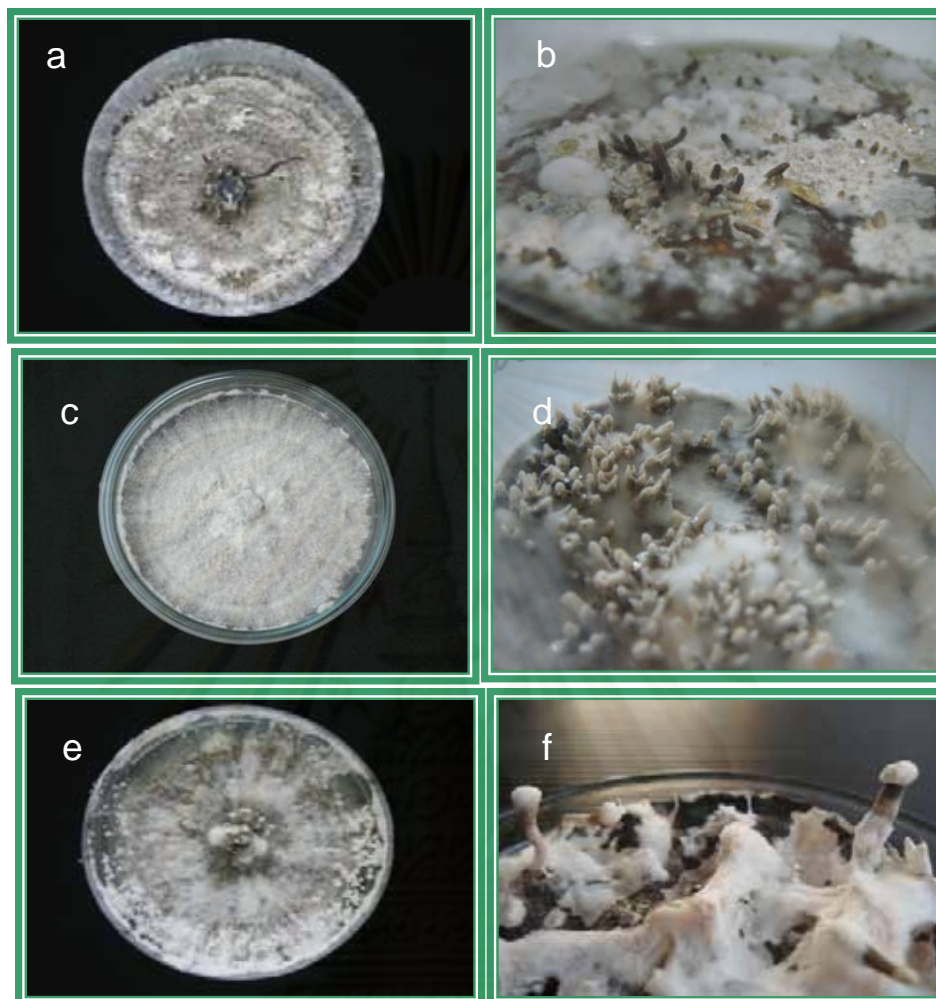
รูปที่ 4.11 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราเอนโดไฟต์สกุล *Xylaria* spp.

(a) *Xylaria* sp.6 บนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ PDA ลักษณะโคนมีสีขาว แขนดำสร้างรังศ์วัตถุสีน้ำตาลบนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ สร้างสโตรมาทรงกระบอกมีสีดำแต่บริเวณปลายของสโตรมามีสีชมพูออกส้ม (b) ลักษณะโคนมีขาวในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ PDB อายุ 25 วัน เส้นใยสีขาวฟู สร้างสโตรมาสีน้ำตาลยาวประมาณ 1 เซนติเมตร

(c) *Xylaria* sp.7 บนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ PDA อายุ 20 วัน โคนมีสีขาว เส้นใยฟู สร้างสโตรมาทรงกระบอกบริเวณฐานมีสีดำส่วนปลายมีสีน้ำตาลอ่อนยาวประมาณ 3-4 เซนติเมตร

(d) ลักษณะสโตรมาในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ PDB อายุ 25 วัน โคนมีสีเทาสร้างสโตรมาสีเทาถึงน้ำตาลเข้มยาวประมาณ 2-3 เซนติเมตร

(e) *Xylaria* sp.8 บนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ PDA อายุ 20 วัน โคนมีสีน้ำตาล เส้นใยฟู ไม่สร้างสโตรมาในอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ (f) ลักษณะโคนมีขาวในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ PDB อายุ 25 วัน เส้นใยด้านล่างสีน้ำตาล ด้านบนปกคลุมด้วยเส้นใยสีขาวไม่สร้างสโตรมาในอาหารเหลว

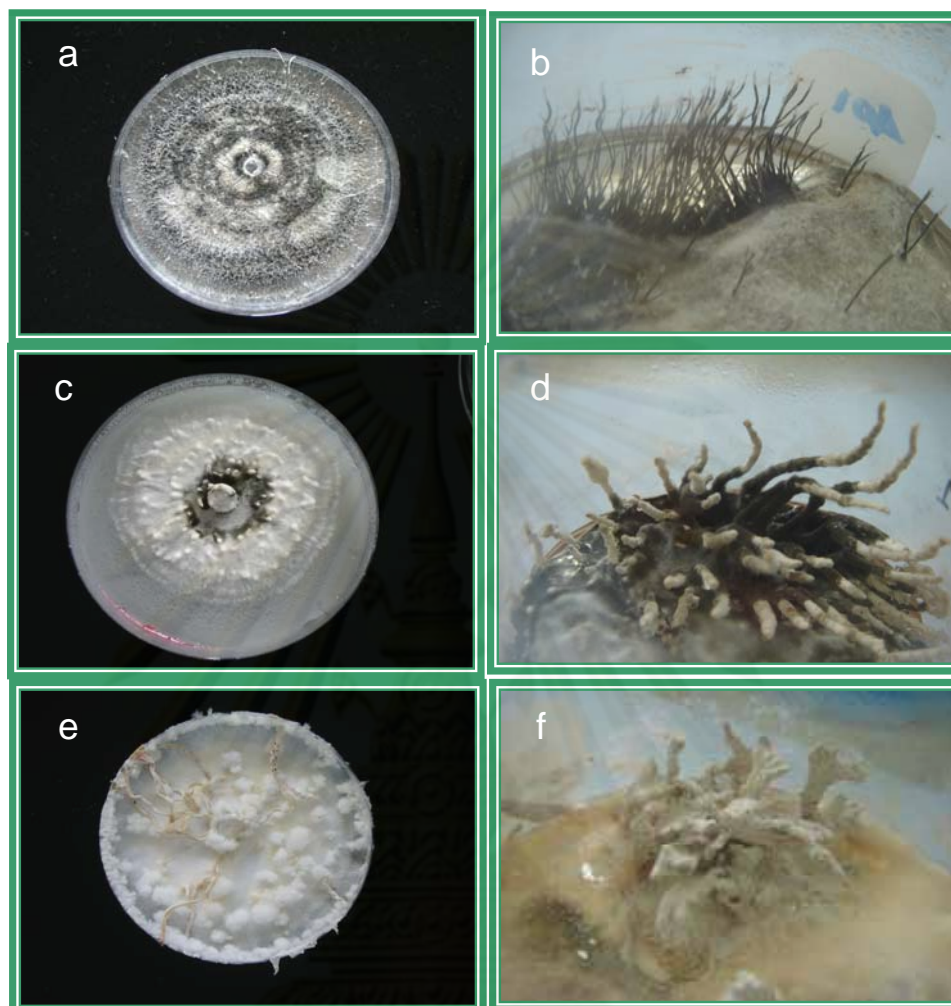


รูปที่ 4.12 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราเอนโดไฟต์สกุล *Xylaria* spp.

(a) *Xylaria* sp.9 บนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ PDA อายุ 20 โคโลนีมีสีเทา เส้นใยฟู สร้างสโตรมาทรงกระบอกยาวปลายมนมีสีดำ ยาวประมาณ 1-2 เซนติเมตร (b) ลักษณะสโตรมาในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ PDB อายุ 25 วัน โคโลนีมีสีเทา สร้างสโตรมาสั้นปลายมนมีสีดำ

(c) *Xylaria* sp.10 บนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ PDA อายุ 20 วัน โคโลนีสีขาว เส้นใยฟู ไม่สร้างสโตรมาในอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ (d) ลักษณะโคโลนีในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ PDB อายุ 25 วัน เส้นใยมีสีขาวออกส้มแซมด้วยสีดำสร้างสโตรมาสั้นสีขาวออกส้มปลายแหลม

(e) *Xylaria* sp.11 บนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ PDA อายุ 20 วัน โคโลนีมีสีน้ำตาล เส้นใยฟู ไม่สร้างสโตรมาในอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ (f) ลักษณะโคโลนีในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ PDB อายุ 25 วัน เส้นใยมีสีดำ ด้านบนปกคลุมด้วยเส้นใยสีขาว สร้างสโตรมามีลักษณะคล้ายกระบอง



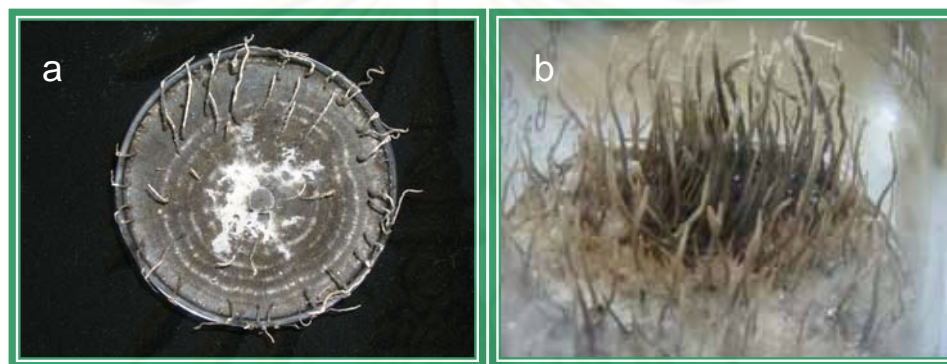
รูปที่ 4.13 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราเอนโดไฟต์สกุล *Xylaria* spp.

(a) *Xylaria* sp.12 บนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ PDA อายุ 20 วัน โคลนนี้มีสีเทาดำ เส้นใยฟูสร้างสโตรมาเส้นเล็กเรียวยาวสีดำส่วนบริเวณปลายเส้นใยแหลมมีสีขาวสโตรมายาวประมาณ 0.5 -1.0 เซนติเมตร (b) ลักษณะโคโลนีในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ PDB อายุ 25 วัน เส้นใยมีสีเทาสร้างสโตรมาเส้นเล็กเรียวยาวสีดำส่วนบริเวณปลายเส้นใยแหลมมีสีขาวสโตรมายาวประมาณ 1-3 เซนติเมตร

(c) *Xylaria* sp.13 บนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ OA อายุ 10 วัน โคลนนี้มีสีขาว แต่กลับกลายเป็นสีดำเมื่ออายุมากขึ้น สร้างสโตรมารูปรางทรงกระบอกมีสีดำจากส่วนฐานถึงกึ่งกลางถึงปลายมีสีขาวครีม (d) ลักษณะโคโลนีในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ PDB อายุ 25 วัน เส้นใยมีสีดำ สร้างสโตร

มารูปร่างทรงกระบอกลีมีสีดำจากส่วนฐานถึงกึ่งกลางถึงปลายมีสีขาวครีม ยาวประมาณ 3-4 เซนติเมตร

(e) *Xylaria* sp.14 บนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ PDA อายุ 25 วัน โคนีมีสีขาวฟู สร้างสโตรมาทรงกระบอกลีครีมยาวประมาณ 3-4 เซนติเมตร (f) ลักษณะโคนีในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ PDB อายุ 25 วัน เส้นใยมีสีครีมออกส้ม สร้างสโตรมาลักษณะคล้ายเขากวางปกคลุมด้วยโคนีเดี่ยวสีขาว ออกเทาเป็นผงคล้ายผงแป้ง



รูปที่ 4.14 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราเอนโดไฟต์สกุล *Xylaria* spp.

(a) *Xylaria* sp.15 บนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ PDA อายุ 20 วัน โคนีสีเขียวยาว 1 ซม. สร้างสโตรมาทรงกระบอกลีบริเวณฐานจนถึงกึ่งกลางมีสีเขียวออกดำจากบริเวณกึ่งกลางถึงปลายมีสีออกน้ำตาลอ่อนปลายมนยาวประมาณ 1-2 เซนติเมตร (b) ลักษณะโคนีในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ PDB อายุ 25 วัน เส้นใยมีสีเทาออกเขียว สร้างสโตรมาทรงกระบอกลีบริเวณฐานจนถึงปลายมีสีเขียวออกดำ บริเวณปลายมีสีออกน้ำตาลอ่อนปลายมนยาวประมาณ 1-2 เซนติเมตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง

ตารางที่ 4.1 แสดงค่าทางสถิติของปัจจัยที่ส่งผลต่อจำนวนไอโซเลต

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: isolates

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	2522.950 ^a	3	840.983	25.601	.000
Intercept	13364.450	1	13364.450	406.833	.000
season	2226.050	1	2226.050	67.764	.000 *
species	.450	1	.450	.014	.908 **
season * species	296.450	1	296.450	9.024	.008 ***
Error	525.600	16	32.850		
Total	16413.000	20			
Corrected Total	3048.550	19			

a. R Squared = .828 (Adjusted R Squared = .795)

ค่ายอมรับได้สำหรับการบ่งบอกระดับความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ≥ 0.005

ภาคผนวก จ

1 ลำดับเบสบริเวณ ITS ของราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ A116-2^R B115^R B127^R B316-1^R B419-1^R

1.1 ลำดับเบสบริเวณ ITS ของราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ A116-2^R

GCGGAGGGATCATTAAAGAGTTCTATAACTCCCAAACCCATGTGAACATACCATACGTTGCCTCGGCAG
 GTCGCGCCTACCCCGTAGCGTCCTACCCTATAGGACCTACCCGGTAGACGCGGGTAAGCCTGCCGGC
 GGCCCAAGAACTCTGTTTAGTATTGAATTCTGAACCTATAACTAAATAAGTAAAACTTTCAACAACGGA
 TCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGT
 GAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCATTAGTATTCTAGTGGGCATGCCTGTTGAGCGTCAT
 TTCAACCCTTAAGCCCTCGTTGCTTAGTGTTGGGAGCCTACGGTACCCGTAGCTCCTCAAAGTTAGTGG
 CGGAGTCGGTTCACACTCTAGACGTAGTAATTTTATCTCGCCTATCAGTTGGACCGGTCCCCTGCCGTA
 AAACACCCCAATTTCTAAAGGTTGACCTCGGATCATGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA
 GAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCA

1.2 ลำดับเบสบริเวณ ITS ของราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ B115^R

AAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCAT
 TAGTATTCTAGTGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTCAACCCTTAAGCCCTCGTTGCTTAGTGTTGGGA
 GCCTACGGTACCCGTAGCTCCTCAAAGTTAGTGGCGGAGTCGGTTCACACTCTAGACGTAGTAATTTTA
 TCTCGCCTATCAGTTGGACCGGTCCCCTGCCGTAACACCCCAATTTCTAAAGGTTGACCTCGGATCA
 GGTAGGAATACCCGCTGAACTTAA

ศูนย์วิทยาศาสตร์
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.3. ลำดับเบสบริเวณ ITS ของราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ B127^R

GAAATGCGATAAGTATTATGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATTTTCGAACGCACATTGCGCCTC
 TTGGCATTCCATGAGGCATGCCTGTTTCGAGCGTTATTACAAAACCCCTCAAGCCTTGCTTGGTGATGAATT
 CCATCATTGATGGATTTTTAAAAATTTGCCGATGTTGTAGAGTTTAATTCGACGCAACCAAACTTTTCTG
 CGTCAGAATGAGCTTTACATCACATCAGTAAATCCTTTTCAATAATTTAACCTCGGATCAGGTAGGAATAC
 CCGCTGAACTTAA

1.4. ลำดับเบสบริเวณ ITS ของราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ B316-1^R

TCATATGGATTTCTCCGCTTATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATTCCTACCTGATCCGAGGTCAAC
 CTTTAGAAATTGGGGTGTTTTACGGCAGGGGACCGGTCCAAGTATAGGCGAGATAAAATTACTACGTC
 TAGAGTGTGAACCGACTCCGCCACTAATTTGAGGAGCTACGGGTACCGTAGGCTCCCAACACTAAGC
 AACGAGGGCTTAAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCACTAGAATACTAATGGGCGCAATG
 TCGGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTGCTGCGTTCTTC
 ATCGATAATCGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCACTGGCC

5. ลำดับเบสบริเวณ ITS ของราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ B419-1^R

GAAATGCGATAAGTATTATGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATTTTCGAACGCACATTGCGCCTC
 TTGGCATTCCATGAGGCATGCCTGTTTCGAGCGTTATTACAAAACCCCTCAAGCCTTGCTTGGTGATGAATT
 CCATCATTGATGGATTTTTAAAAATTTGCCGATGTTGTAGAGTTTAATTCGACGCAACCAAACTTTTCTG
 CGTCAGAATGAGCTTTACATCACATCAGTAAATCCTTTTCAATAATTTAACCTCGGATCAGGTAGGAATAC
 CCGCTGAACTTAA

ศูนย์วิทยทรัพยากร
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวกฤษณา นุราช เกิดเมื่อวันที่ 25 พฤศจิกายน พ.ศ. 2522 จังหวัด นครศรีธรรมราช สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต (วท.บ.) เอก ชีววิทยา คณะ วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง ในปีการศึกษา พ.ศ. 2545 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตร วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (วท.ม.) ในสาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะ วิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2548



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย