

ราเอกโดไฟต์ที่แยกได้จากใบพืชในป่าเต็งรัง จังหวัดตาก

นายกฤตพงศ์ อรรถพันธ์ลาม

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2551

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ENDOPHYTIC FUNGI ISOLATED FROM PLANT LEAVES IN DIPTEROCARP
FOREST , TAK PROVINCE

Mr. Krittapong Orachaiapunlap

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

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2008

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากใบพืชในป่าเต็งรัง จังหวัดตาก
โดย	นายกฤตพงศ์ อรชัยพันธ์ลาภ
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ศาสตราจารย์ ดร. โสภณ เริงสำราญ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. ประภคิต์สิน สีहनนท์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

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

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วรินทร์ ชวศิริ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ศาสตราจารย์ ดร. โสภณ เริงสำราญ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร. ประภคิต์สิน สีहनนท์)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. นาทยา งามโรจนวณิชย์)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร. ธีรวัฒน์ มงคลอัครวัฒน์)

กฤตพงศ์ อรรถชัยพันธ์ลภภ : ราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากใบพืชในป่าเต็งรัง จังหวัดตาก.

(ENDOPHYTIC FUNGI ISOLATED FROM PLANT LEAVES IN

DIPTEROCARP FOREST , TAK PROVINCE) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ศ.ดร.

โสภณ เริงสำราญ, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : รศ.ดร.ประภคิต์สิน สีहनนท์, 111หน้า.

แยกราเอนโดไฟต์ในใบไม้จากพืช 9 ชนิดได้แก่ เต็ง รัง กระโดน ยอป่า กระพุ่ม ปอลาย สมอไทย แคน และทองหลวง ในป่าเต็งรังบริเวณจังหวัดตากโดยทำการศึกษาในฤดูฝนในปี พ.ศ. 2550 และฤดูแล้งในปี พ.ศ. 2551 จำนวน 340 ตัวอย่าง โดยนำตัวอย่างใบไม้จากพืชดังกล่าวมา จำแนกชนิดของราเอนโดไฟต์ตามหลักสัณฐานวิทยาได้ราเอนโดไฟต์ทั้งสิ้น 231 ตัวอย่าง พบว่า ความหลากหลายทางชีวภาพในฤดูฝนมีมากกว่าฤดูแล้งโดยพบ *Mycelia sterilia* sp.2 มากที่สุด พบราเอนโดไฟต์ที่พบได้บ่อยได้แก่ *Phomopsis* sp., *Nigrospora* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Xylaria* sp. เมื่อทดสอบความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ 5 ชนิด ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027 *Escherichia coli* ATCC25922 *Bacillus subtilis* ATCC6633 *Staphylococcus aureus* ATCC25923 *Candida albicans* ATCC 70014 พบว่ามีราเอนโดไฟต์เพียง 1 สายพันธุ์ได้แก่ สายพันธุ์ DSO2 ที่ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ทุกชนิด เมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง 7 ชนิดและเซลล์ปกติ 1 ชนิดด้วยวิธี MTT assay พบว่าราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ WAC9 สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวได้จำเพาะเจาะจง และราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ WGE2 สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ได้จำเพาะเจาะจง เมื่อจำแนกสายพันธุ์โดยวิธีทางอนุชีววิทยา พบว่าราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ WAC9 คือ *Glomerella cingutala* และราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ WGE2 คือ *Phomopsis* sp. หลังจากนั้นได้ทำการศึกษาราเอนโดไฟต์ทั้ง 2 สายพันธุ์เพื่อสนับสนุนการตายของเซลล์แบบอะพอพโตซิส โดยสายพันธุ์ WAC9 สามารถกระตุ้นเซลล์มะเร็งมีการตายแบบอะพอพโตซิสได้

สาขาวิชา.....เทคโนโลยีชีวภาพ.....

ปีการศึกษา_2551.

ลายมือชื่อนิสิต.....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

##4972211923 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORDS : ENDOPHYTIC FUNGI / BIODIVERSITY /DIPTEROCARP FOREST

KRITTAPONG ORACHAIPUNLAP : ENDOPHYTIC FUNGI ISOLATED
FROM PLANT LEAVES IN DIPTEROCARP FOREST , TAK PROVINCE.

ADVISOR : PROF. SOPHON ROENGSUMRAN, Ph. D., CO-ADVISOR :

ASSOC. PROF. PRAKITSIN SIHANONTH, Ph. D., 111 pp.

Endophytic fungi were isolated from 340 samples leaf of 9 Dipterocarp forest tree species such as *Shorea obtuse*, *Shorea siamensis*, *Careya sphaerica*, *Morinda pubescens*, *Anthocephalus chinensis*, *Grewia criocarpa*, *Terminalia chebula*, *Fernandoa adenophylla*, *Erythrina variegata* in Tak province during wet season 2007 and dry season 2008. Total 231 endophytic fungi isolates were obtained and identification based on morphological characteristic. Biodiversity of endophytic fungi were greater in wet season than dry season. Mycelia sterilia sp.2 was the most frequency isolated from all different plant host species. Moreover, the typical endophytic fungi genera such as *Phomopsis* sp., *Nigrospora* sp., *Pestalotiopsis* sp. and *Xylaria* sp. were commonly found in this area. DSO2 was one isolate showed broad spectrum antimicrobial against *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027 *Escherichia coli* ATCC25922 *Bacillus subtilis* ATCC6633 *Staphylococcus aureus* ATCC25923 *Candida albicans* ATCC 70014. A anticancer activity against seven human cell lines and non cancer kidney African green monkey (Vero) cell lines by using MTT assay. WAC9 and WGE2 were activitied against human acute T-cell leukemia and human colorectal adenocarcinoma respectively. Both strain were then identified as *Glomerella cingutala* and *Phomopsis* sp. by molecular technique. Strain WAC9 showed apoptosis character.

Field of Study :Biotechnology..... Student's Signature :

Academic Year :2008..... Advisor's Signature :

Co-Advisor's Signature :

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ สำเร็จได้ด้วยความช่วยเหลือเป็นอย่างดีของศาสตราจารย์ ดร.โสภณ เริงสำราญ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และคณาจารย์ที่ให้ความเมตตา และให้คำปรึกษาที่ดีมา โดยตลอด ได้แก่รองศาสตราจารย์ ดร. ประกิตต์สินี สีहनนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธนาภัทร ปาลกะ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือด้านการทดสอบปฏิบัติการต่อต้าน เชลล์มะเร็ง ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรินทร์ ชวศิริ ประธานกรรมการสอบป้องกัน วิทยานิพนธ์ และกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ได้แก่ รองศาสตราจารย์ ดร.นาตยา งามโรจน วณิชย์และรองศาสตราจารย์ ดร.ธีรวัฒน์ มงคลอัศวรัตน์ ได้กรุณาให้ข้อคิดเห็น ข้อเสนอแนะ และปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัยทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกในการเรียนและการทำวิจัย ด้วยดีมาโดยตลอด

ขอขอบคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ธีรวัฒน์ มงคลอัศวรัตน์ คณบดีคณะวิทยาศาสตร์ รองศาสตราจารย์ ดร.นवलพรรณ ณ ระนอง หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำวิจัย

ขอขอบคุณ คุณสง่า เครือฮวบ เจ้าหน้าที่อุทยานแห่งชาติตากสินมหาราชในการเก็บ ตัวอย่างใบไม้และการจำแนกพันธุ์

ขอขอบพระคุณคณาจารย์หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ ที่ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ อบรมสั่งสอน และให้ความเมตตาเสมอมา

ขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ในหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ และภาควิชาจุลชีววิทยา ที่ ร่วมเรียน ร่วมทำกิจกรรมด้วยกันมา ทั้งยังให้ความช่วยเหลือ และให้คำปรึกษาในเรื่องต่างๆ ด้วยดี เสมอมา

ท้ายสุดนี้ ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัวของข้าพเจ้า ที่คอยให้ความรัก ความห่วงใย เป็นกำลังใจ และให้ความช่วยเหลือด้านต่างๆ ตลอดการทำวิทยานิพนธ์ และตลอด ชีวิตของข้าพเจ้า

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ญ
คำย่อ.....	ฎ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
2 เอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 รา.....	4
2.2 ความหลากหลายทางชีวภาพของราในประเทศไทย.....	6
2.3 ราเอนโดไฟต์.....	7
2.4 ความหลากหลายของราเอนโดไฟต์.....	9
2.5 การศึกษาความหลากหลายของราเอนโดไฟต์ในประเทศไทย.....	11
2.6 การแยกราเอนโดไฟต์และการจำแนกชนิดของราเอนโดไฟต์.....	11
2.7 ป่าเต็งรัง.....	15
2.8 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตจากราเอนโดไฟต์.....	20
3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	31
3.1 อุปกรณ์.....	31
3.2 สารเคมี.....	33
3.3 การเก็บตัวอย่างใบพืชจากป่าเต็งรัง.....	35
3.4 การแยกราเอนโดไฟต์จากใบพืช.....	35
3.5 จำแนกชนิดของราเอนโดไฟต์.....	36
3.6 ศึกษาความหลากหลายของราเอนโดไฟต์.....	36
3.7 การเก็บรักษาราเอนโดไฟต์.....	36

บทที่	หน้า
3.8 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ จากน้ำเลี้ยงเชื้อของราเอนโดไฟต์.....	37
3.9 การทดสอบประสิทธิภาพของส่วนสกัดออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ต่อเซลล์ของราเอนโดไฟต์.....	38
3.10 การจำแนกชนิดของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้ด้วย วิธีทางอนุพันธุศาสตร์.....	41
4 ผลการทดลอง และวิจารณ์ผลการทดลอง.....	45
4.1 ผลการเก็บตัวอย่างใบพืชจากป่าเต็งรัง จังหวัดตาก.....	45
4.2 การแยกราเอนโดไฟต์จากใบพืชและการจำแนกราเอนโดไฟต์.....	46
4.3 การศึกษาความหลากหลายของราเอนโดไฟต์.....	60
4.4 ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์จากส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อ...	67
4.5 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของส่วนสกัดออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อเซลล์ ของราเอนโดไฟต์.....	70
4.6 การจัดกลุ่มความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ของราเอนโดไฟต์.....	72
4.7 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้.....	74
4.8 การทดสอบการกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งตายแบบอะพ็อบโทซิส ของราเอนโดไฟต์.....	75
4.9 การจำแนกราเอนโดไฟต์ไอโซเลต WAC9 และ WGE2 โดยวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัส 16S rRNA.....	79
5 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง.....	84
รายการอ้างอิง.....	89
ภาคผนวก.....	103
ภาคผนวก ก สูตรอาหาร สารเคมี และการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	104
ภาคผนวก ข อาหาร สารเคมี และวิธีเตรียมที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์.....	107
ภาคผนวก ค สารเคมี และวิธีการเตรียมที่ใช้ในเทคนิคทางอนุพันธุศาสตร์.....	109
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	111

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	กลุ่มของราและการคาดการณ์จำนวนราที่มีทั้งหมดในโลก.....	5
2.2	จำนวนของราที่ทราบในประเทศแถบเอเชียระหว่างปี 1987-2004.....	6
2.3	แสดงลำดับเบสของ Universal primer ที่นำมาใช้ในการจำแนกชนิดของรา.....	14
2.4	แสดงสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตจากราเอนโดไฟต์.....	26
4.1	แสดงการกำหนดรหัสของใบพืชตัวอย่าง และขนาดโดยเฉลี่ยของใบพืชตัวอย่าง.....	45
4.2	แสดงชนิดและจำนวนของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้ในฤดูฝน.....	46
4.3	แสดงชนิดและจำนวนของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้ในฤดูแล้ง.....	51
4.4	แสดงจำนวนของกลุ่มราเอนโดไฟต์ที่แยกได้.....	55
4.5	แสดงจำนวนชนิดของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากพืชแต่ละชนิดทั้ง 2 ฤดู.....	57
4.6	แสดงความถี่ของราเอนโดไฟต์ (colonization frequency) ที่แยกได้จากพืชแต่ละชนิดทั้ง 2 ฤดู.....	61
4.7	แสดงราเอนโดไฟต์ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์.....	67
4.8	เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆของ ส่วนสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟต์.....	70
4.9	แสดงการจัดกลุ่มการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของราเอนโดไฟต์.....	72

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	เส้นใยของราเอนโดไฟต์ในเนื้อเยื่อพืช.....	8
2.2	วงจรชีวิตของราเอนโดไฟต์ในหญ้า.....	10
2.3	แสดงตำแหน่ง primer มาจับที่บริเวณ Internal transcribed spacer (ITS) region.....	14
2.4	แสดงลักษณะใบพืชที่นำมาใช้ในการศึกษา.....	20
2.5	แสดงการเกิดอะพือบโทซิส.....	25
3.1	แสดงตำแหน่งในการเก็บตัวอย่าง.....	35
4.1	แสดงลักษณะสปอร์และเส้นใยของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้.....	56
4.2	แสดงความถี่ของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้ใน 2 ฤดู.....	60
4.3	แสดงความถี่ของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากใบไม้แต่ละชนิด.....	64
4.4	การศึกษาคความใกล้เคียงกันของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้ในฤดูฝน จากพืชแต่ละชนิดโดยใช้ Hierarchical cluster analysis.....	65
4.5	การศึกษาคความใกล้เคียงกันของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้ในฤดูแล้ง จากพืชแต่ละชนิดโดยใช้ Hierarchical cluster analysis	65
4.6	การศึกษาคความใกล้เคียงกันของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้ในฤดูฝนและฤดูแล้ง จากพืชแต่ละชนิดโดยใช้ Hierarchical cluster analysis.....	66
4.7	แสดงการยับยั้งแบบที่เรียแกรมบวกของราเอนโดไฟต์.....	69
4.8	แสดงการยับยั้งแบบที่เรียแกรลบของราเอนโดไฟต์.....	69
4.9	แสดงการยับยั้งยีสต์ทดสอบของราเอนโดไฟต์.....	69
4.10	การเกิดอะพือบโทซิสในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว Jurkat.....	75
4.11	ปริมาณการเกิดอะพือบโทซิสในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว Jurkat.....	75
4.12	การเกิดอะพือบโทซิสในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว Jurkat ในแต่ละช่วง.....	76
4.13	การเกิดอะพือบโทซิสในเซลล์มะเร็งลำไส้ SW620.....	77
4.14	ปริมาณการเกิดอะพือบโทซิสในเซลล์มะเร็งลำไส้ SW620.....	77
4.15	การเกิดอะพือบโทซิสในเซลล์มะเร็งลำไส้ SW620 ในแต่ละช่วง.....	78
4.16	ขนาดของ PCR product เมื่อใช้ไพรเมอร์ชนิดต่างๆ บนอะกาโรสเจล.....	79

ภาพที่		๘ หน้า
4.17	แสดงลำดับเบสของราเอนโดไฟต์ WAC9.....	80
4.18	ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของราเอนโดไฟต์ WAC9.....	81
4.19	แสดงลำดับเบสของราเอนโดไฟต์ WGE2.....	82
4.20	ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของราเอนโดไฟต์ WGE2.....	83

คำย่อ

ATCC	=	American type culture collection, Maryland USA
CTAB	=	Cetyltrimethylammonium bromide
DMSO	=	Dimethylsulfoxide
EDTA	=	Ethylenediamine tetraacetic acid
ITS	=	Internal transcribed spacer
MEA	=	Malt extract agar
MTT	=	(3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenylterazolium bromide)
OM	=	Oat meat
PCR	=	Polymerase chain reaction
PDA	=	Potato dextrose agar
PEG	=	Polyethylene glycol
SDA	=	Sabourud dextrose agar

บทที่ 1

บทนำ

ปัจจุบันการดื้อยาปฏิชีวนะของจุลินทรีย์ต่างๆมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นจึงมีความพยายามในการหายาปฏิชีวนะตัวใหม่ๆที่มีประสิทธิภาพมากกว่าเดิมเพื่อใช้ในการต่อต้านจุลินทรีย์ก่อโรค ความเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูงและเป็นแหล่งสำคัญที่สร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่ามีราอยู่จำพวกหนึ่งที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชที่มีชีวิตโดยไม่ก่อให้เกิดโรคกับพืช นอกจากนี้ร่าบางชนิดยังสามารถสร้างสารชนิดเดียวกันกับพืชที่ราอาศัยอยู่ เรียกร่าชนิดนี้ว่า ราเอนโดไฟต์

ราเอนโดไฟต์เป็นราที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชที่มีชีวิตบริเวณทั้งในเซลล์และช่องว่างระหว่างเซลล์พืช ในส่วนของเปลือกไม้ เนื้อไม้ ก้านใบ ใบ และรากของพืชชั้นสูง โดยมีความสัมพันธ์กับพืชในลักษณะที่เป็นภาวะพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกัน (mutualism) เช่นการที่ราเอนโดไฟต์สร้างสารพิษป้องกันแมลงและสัตว์แก่พืช ในขณะที่พืชให้ที่อยู่อาศัยและอาหารแก่รา (Ju และคณะ, 1998 ; Daisy และคณะ, 2002) และภาวะอิงอาศัย (commensalism) จนกระทั่งทำให้เกิดโรคกับพืชได้ถ้าต้นพืชมีสภาวะอ่อนแอหรือมีความเครียดเกิดขึ้น ราเอนโดไฟต์อาจจะอาศัยอยู่ในช่วงใดช่วงหนึ่งหรือทั้งหมดของวงชีวิตพืช และเป็นสาเหตุของการติดเชื้อที่ไม่ปรากฏอาการในเนื้อเยื่อพืช ทั้งนี้ไม่รวมราไมคอไรซา แต่รวมราที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืช ในระยะเวลาที่ยาวนานก่อนที่จะเป็นสาเหตุให้เกิดอาการของโรคในพืชที่ราอาศัยอยู่ ถึงแม้ว่าราเหล่านี้จะถูกจัดเป็นราที่ก่อให้เกิดโรคแต่ก็ยังสามารถดำรงชีวิตแบบเอนโดไฟต์ได้ในวงชีวิต

ได้มีการประมาณการว่ามีมากกว่า 1 ล้านชนิดในโลก (Hawkworth และ Rossman, 1987) และมีเพียง 1 แสนชนิดเท่านั้นที่ถูกค้นพบ ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายังมีราอีกเป็นจำนวนมากที่ยังไม่ถูกค้นพบ โดยราที่ยังไม่ถูกค้นพบเหล่านี้มีความเป็นไปได้ว่าอยู่ในชั้นหิน ทะเลทราย ทะเล และภายในสิ่งมีชีวิตเช่น สัตว์และพืช

บนโลกนี้มีพืชประมาณ 300,000 ชนิด ความหลากหลายของราเอนโดไฟต์จะมีมากเป็น 5 เท่าโดยเฉลี่ยตามความหลากหลายของพืช (Rodrigues และ Petrini, 1997) ซึ่งอาจจะทำให้พบราเอนโดไฟต์เป็นจำนวนถึง 1.5 ล้านชนิด จากการศึกษาพบว่าตอนนี้มีพืชเพียงส่วนน้อยเท่านั้นที่ได้มีการศึกษาถึงความสัมพันธ์ทางชีววิทยาของราเอนโดไฟต์อย่างสมบูรณ์ ซึ่งในประเทศไทยยังมีการศึกษาเกี่ยวกับความหลากหลายทางชีวภาพของราเอนโดไฟต์น้อยมาก

จากการศึกษาสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพของราเอนโดไฟต์พบว่ามียีสราที่น่าสนใจและสามารถนำมาพัฒนาเพื่อใช้เป็นยาชนิดใหม่ๆได้เช่น สารที่ออกฤทธิ์กดภูมิคุ้มกัน (Immunosuppressive agents) สารที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง (Anticancer agents) และสารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ (Antimicrobial agents) ตัวอย่างเช่น ราเอนโดไฟต์ *Acremonium* sp. ที่อาศัยอยู่ในต้น European yew (*Taxus baccata*) สามารถสร้างสารกลุ่ม leucino statins ซึ่งเป็นเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราและเซลล์มะเร็ง (Strobel และคณะ, 1996) และจากการศึกษาราเอนโดไฟต์ที่พบในต้น *Taxus mairei* และ *Torreya grandis* พบว่าราเอนโดไฟต์ 2 ชนิดคือ *Paecilomyces* sp. และ *Aspergillus clavatus* ที่สามารถสร้าง Brefeldin A ที่มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งหลายชนิด (Wang และคณะ, 2002)

ป่าเต็งรัง (Dipterocarp forest) ป่าเต็งรังเป็นสังคมหนึ่งในกลุ่มป่าผลัดใบ ฉะนั้นลักษณะสำคัญในอันดับแรกของการจำแนกคือ การผลัดใบของไม้ส่วนใหญ่ในทุกระดับชั้นเรือนยอด ลำดับต่อไปในการจำแนก ป่าเต็งรังมีถิ่นกระจายโดยกว้าง ๆ ซ้อนทับกันอยู่กับป่าผสมผลัดใบแต่อาจแคบกว่าเล็กน้อย ทั้งนี้เนื่องจากปัจจัยกำหนดที่เกี่ยวข้องกับความแห้งแล้ง สังคมพืชชนิดนี้แท้จริงแล้วมีพบในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยเฉพาะประเทศไทย ลาว กัมพูชา เมียนมาร์ และบางส่วนของประเทศเวียดนามเท่านั้น ในประเทศอินเดียอาจมีป่าชาลที่มีลักษณะคล้ายคลึงกันกระจายอยู่ในบางส่วน เฉพาะประเทศไทย มีปรากฏตั้งแต่จังหวัดเพชรบุรีขึ้นไปจนถึงเหนือสุดในจังหวัดเชียงราย ส่วนใหญ่ปรากฏสลับกันไปกับป่าผสมผลัดใบคือยึดครองในพื้นที่ที่มีความแห้งแล้งจัด กักเก็บน้ำได้เลว เช่น บนสันเนิน พื้นที่ราบที่เป็นทรายจัด มีหินบนผิวดินมาก หรือ บนดินลูกรังที่มีชั้นของลูกรังตื้น มีปรากฏตั้งแต่ความสูงจากระดับน้ำทะเล 50 เมตร ขึ้นไปจนถึง 1,000 เมตร พรรณไม้เด่นในป่าเต็งรัง ได้แก่ พรรณไม้เด่นในป่าเต็งรัง ได้แก่ กลุ่ม deciduous dipterocarp 5 ชนิด คือ กรวด *Dipterocarpus intricatus*, เหียง *D. obtusifolius*, พลวง *D. tuberculatus*, เต็ง *Shorea obtusa*, และรัง *S. siamensis* (Dipterocarpaceae) พรรณไม้เด่นอื่นๆ เช่น ค้ำอกหลวง *Gardenia sootepensis*, ค้ำอกน้อย *G. obtusifolia*, กว้าว *Haldina cordifolia*, ตุ่มกว้าว *Mitragyna rotundifolia*, ระเบิด *Catunaregam tomentosa*, ยอป่า *Morinda pubescens* (Rubiaceae), คาง *Albizia odoratissima*, ซาก *Erythrophleum* spp., ประดู่ป่า *Pterocarpus macrocarpus*,

ป่าเต็งรังในเขตจังหวัดตากเป็นจุดที่น่าสนใจในการเข้าไปศึกษา เนื่องจากมีความหลากหลายทางระบบนิเวศวิทยาจึงส่งผลให้มีความหลากหลายทางชีวภาพของราเอนโดไฟต์ อีกทั้งยังไม่เคยมีการเข้าไปศึกษาในเรื่องความหลากหลายทางชีวภาพของราเอนโดไฟต์รวมไปถึงการ

สร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของราเอนโดไฟต์ นอกจากนี้ในเขตป่าเต็งรังอุดมไปด้วยพืชที่มีใบขนาดใหญ่ จึงน่าจะพบราเอนโดไฟต์เป็นจำนวนมาก จึงทำให้มีโอกาสในการพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ได้มากยิ่งขึ้น

วัตถุประสงค์

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นในการแยกราเอนโดไฟต์จากใบพืชในป่าเต็งรังจังหวัดตาก โดยจะเก็บตัวอย่างพืชจำนวน 9 ชนิดได้แก่ เต็ง (*Shorea obtuse* Wall.) รัง (*Shorea siamensis* Miq.) กระโดน (*Careya sphaerica* Roxb.) ยอป่า (*Morinda elliptica* Ridl.) กระทุ่ม (*Anthocephalus chinensis* Lamk.) สมอไทย (*Terminalia Chebula* Retz.) ปอลาย (*Grewia eriocarpa* Juss.) แคน (*Markhamia stipulate* Wall.) ทองหลาง (*Erythrina variegata* L.) ซึ่งพืชทั้ง 9 ชนิดนี้ยังไม่เคยมีรายงานว่ามีการศึกษาในเรื่องความหลากหลายทางชีวภาพของราเอนโดไฟต์รวมไปถึงการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของราเอนโดไฟต์มาก่อน โดยแยกราเอนโดไฟต์ในฤดูแล้ง และในช่วงฤดูฝน เพื่อเปรียบเทียบชนิดและปริมาณของราเอนโดไฟต์ทั้ง 2 ฤดูกาล และทำการทดสอบความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เพื่อหาสายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค และยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง

ขั้นตอนงานวิจัย

1. ค้นคว้าและศึกษาข้อมูลจากเอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง
2. เก็บตัวอย่างใบพืช 9 ชนิดจากป่าเต็งรัง และแยกราเอนโดไฟต์จากตัวอย่างพืชให้ได้เชื้อบริสุทธิ์และเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์
3. สกัดส่วนสกัดออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของราเอนโดไฟต์
4. จัดจำแนกชนิดของราเอนโดไฟต์และพิสูจน์เอกลักษณ์ทางอนุชีววิทยาของราเอนโดไฟต์ที่คัดเลือกได้
5. สรุป วิเคราะห์ข้อมูล และเขียนวิทยานิพนธ์

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัยนี้

ได้ราเอนโดไฟต์ที่มีความสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคและเซลล์มะเร็ง

บทที่ 2

เอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 รา (Fungi)

ราเป็นกลุ่มสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งที่มีความหลากหลายมากในโลก (Hyde, 2001) โดยพบมากเป็นอันดับสองรองมาจากแมลง แต่ราที่ศึกษามีจำนวน 80,000-120,000 ชนิด (species) ดังนั้นจึงมีราอีกเป็นจำนวนมากที่ยังไม่มีการค้นพบ Rossman (1994) ได้รายงานว่ามีจำนวนชนิดของรา น่าจะมีมากกว่า 1 ล้านชนิด (ตารางที่ 2.1) และจากงานวิจัยของ Frohlich และ Hyde (1999) Hawksworth (2001) และ Hyde (2001) ได้คาดการณ์จำนวนชนิดของราว่าอาจจะมีประมาณ 100,000 ถึง 9.9 ล้านชนิด นอกจากนี้ยังเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีความจำเพาะต่อโฮสต์ ซึ่งได้มีการคาดการณ์ว่าจะมีรา 5-6 ชนิดที่จำเพาะต่อพืชชนิดหนึ่งๆ (Hawksworth, 1991; 2001; Kirk และคณะ, 2001) จากการศึกษาความหลากหลายของราในปัจจุบันพบว่า ราในเขตร้อนมีจำนวนและความหลากหลายมากกว่าเขตอบอุ่น และอาจจะมีรามากกว่า 1.5 ล้านชนิดที่ถูกค้นพบ (Dreyfuss และ Chapela, 1994; Frohlich และ Hyde, 1999; Arnold และคณะ, 2000)

ประชากรของราแต่ละชนิดจะพบแตกต่างกันตามสิ่งแวดล้อมและโฮสต์ ยกตัวอย่างเช่น ราเอนโดไฟต์ ราไมคอร์ไรซา (mycorrhiza) กลุ่มราบนผิวใบ (phylloplane) กลุ่มราทำลายเนื้อไม้ (wood-attacking) กลุ่มราพาราไซต์พืช (plant parasitic) กลุ่มราย่อยสลายเศษใบไม้ (litter decomposition) กลุ่มราที่อาศัยที่รากพืช (root-inhabiting fungi) กลุ่มราเหล่านี้พบอยู่ในส่วนต่างๆ ในต้นไม้เดียวกัน (Hyde, 1995) นอกจากนี้ยังพบว่ากลุ่มของราจะมีการสื่อสารกันกับโฮสต์ที่อาศัยอยู่ไม่ว่าจะเป็นพืชหรือสัตว์ ซึ่งการสื่อสารหรือปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างราและโฮสต์นั้นจะมีการเปลี่ยนแปลงได้ (Suzuki และคณะ, 2002)

กลุ่มรา	จำนวนราที่มีการคาดการณ์
Well-known	
<i>Aphylophorales s. lat.</i>	20000
Macrolichens	20000
Moderately well-known	
<i>Agaricales s. lat.</i>	80000
Dermatiaceous and aquatic hyphomycetes	80000
<i>Uredinales</i>	50000
<i>Hypocreales and Xylariales</i>	50000
<i>Ustilaginales</i>	15000
Gasteromycetes	10000
<i>Erysiphales</i>	10000
Jelly fungi <i>s.lat.</i>	5000
<i>Pezizales</i>	3000
Myxomycetes	1500
<i>Endomycetales</i>	1000
Poorly known	
Non-dermatiaceous hyphomycetes	200000
Coelomycetes	200000
Other perithecioid ascomycetes	100000
Helotiales	70000
Insect-specific fungi	50000
Crustose lichens	20000
<i>Mucorales</i>	20000
<i>Oomycetes</i>	20000
<i>Chytridiomycetes</i>	20000
<i>Endogonales and Glomales</i>	1000
Total	1028500

ตารางที่ 2.1 กลุ่มของราและการคาดการณ์จำนวนราที่มีทั้งหมดที่พบบนโลก (Rossman, 1994)

2.2 ความหลากหลายทางชีวภาพของราในประเทศไทย

การศึกษาราในประเทศไทย ปัจจุบันมีการค้นพบราในกลุ่มต่างๆไปแล้วทั้งสิ้นประมาณ 6,000 ชนิด (Hywel-Jones และ Boonpratuang, 2001; Jones และ Hyde, 2004) ซึ่งในจำนวนที่กล่าวมานั้นมีหลายสายพันธุ์เป็นราชนิดใหม่ (Photita และคณะ, 2000; 2002; Pinruan และคณะ, 2002; 2004a; 2004b; 2004c; Somrithipol และคณะ, 2002a; Bussaban และคณะ, 2003a; 2003b Somrithipol และ Jones, 2003a; 2003b; 2003c; Pinnoi และคณะ, 2004; Promputtha และคณะ, 2004a; 2005a) การที่ประเทศไทยตั้งอยู่ในเขตที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูงที่สุดแห่งหนึ่งของโลก จึงคาดว่าประเทศไทยมีสิ่งมีชีวิตในกลุ่มต่างๆ ที่สำคัญประมาณร้อยละ 7-10 ของจำนวนสิ่งมีชีวิตในกลุ่มต่างๆ ที่คาดว่าจะมีอยู่จริงในโลก และหากคำนวณจำนวนชนิดของราที่คาดว่าจะมีในประเทศไทย ประมาณร้อยละ 7-10 ของราทั้งหมดในโลก พบว่าประเทศไทยน่าจะมีราอยู่ถึง 100,000 - 150,000 ชนิด ซึ่งเมื่อเทียบกับจำนวนราที่ถูกค้นพบในประเทศไทยแล้วยังมีรามากถึงร้อยละ 94 ที่ยังไม่ถูกค้นพบ อย่างไรก็ตามจำนวนราที่ค้นพบในประเทศไทยก็ยังมีจำนวนน้อยเมื่อเทียบกับประเทศอื่นๆในพื้นที่ข้างเคียงกันดังแสดงในตารางที่ 2.2 (Jones และ Hyde, 2004)

ประเทศ	จำนวนราที่มีการรายงาน	จำนวนราชนิดใหม่
จีน	10000	919
ฮ่องกง	2000	ไม่มีรายงาน
อินเดีย	ไม่มีรายงาน	1554
อินโดนีเซีย	ไม่มีรายงาน	67
ญี่ปุ่น	14000	736
มาเลเซีย	2015	432
ฟิลิปปินส์	4698	ไม่มีรายงาน
ไต้หวัน	5396	260
ไทย	2000-3000	278

ตารางที่ 2.2 จำนวนของราที่ทราบในประเทศไทยแถบเอเชียช่วงระหว่างปี 1987-2004 (Jones and Hyde, 2004)

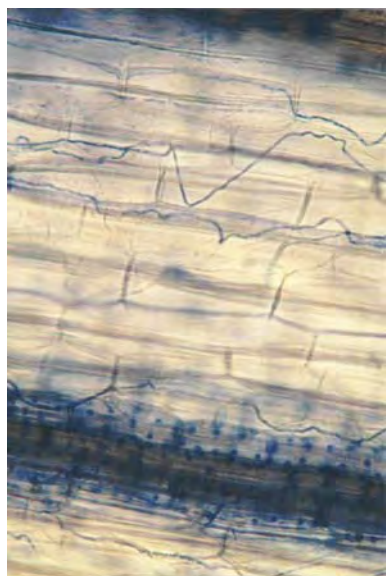
ราที่พบในประเทศไทยได้แก่ กลุ่มเห็ด (Soythong, 1994; Desjardin, และคณะ, 2000; 2003; Sanmee และคณะ, 2003) ราเอนโดไฟต์ (Lumyong และคณะ, 2000; Bussaban และคณะ, 2001; Photita และคณะ, 2001a; Wiyakrutta และคณะ, 2003) ราไมคอไรซา (Youpensuk และคณะ, 2004; 2005) ไลเคน (Homochantara และ Coppins, 2002; Jariangprasert และคณะ, 2002; 2003) ราที่กล่าวมาทั้งหมดพบได้ทั้งที่เป็นน้ำจืด น้ำเค็ม ในอากาศ บนพืช ดิน ได้มีศึกษาวิจัยจากดินและเศษซากพืช พบราที่นำสนใจหลายชนิด บางชนิดเป็นราชนิดใหม่ที่ไม่เคยรายงานพบมาก่อน ราบางชนิดสร้างเอนไซม์ และสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) ที่สามารถจะพัฒนาไปใช้เป็นยาป้องกันกำจัดรา แบคทีเรีย ยีสต์สาเหตุโรคพืช

2.3 ราเอนโดไฟต์ (Endophytic fungi)

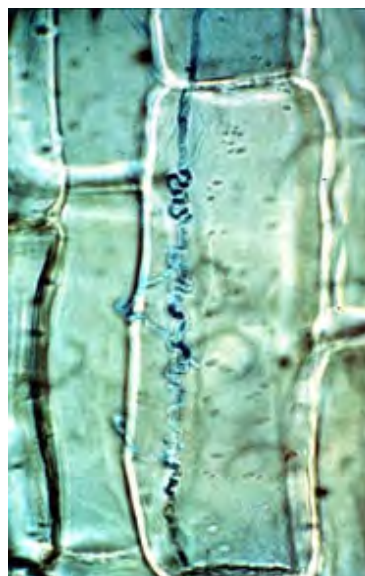
De Bary (1866) ได้ให้ความจำกัดความเกี่ยวกับจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชว่า “เอนโดไฟต์” เป็นครั้งแรก ซึ่งการแฝงตัวอยู่ในพืชในตามคำจำกัดความของเอนโดไฟต์ คือการที่จุลินทรีย์อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชในลักษณะที่พึ่งพาอาศัยกัน (mutualism symbiosis) ไม่ก่อให้เกิดโรคในพืชที่อยู่อาศัย แต่อาจก่อให้เกิดโรคในพืชได้หากมีสิ่งรื้อหรือพืชอ่อนแอลง ซึ่งต่อมาได้มีผู้ให้คำจำกัดความของคำว่าเอนโดไฟต์อย่างมากมาย ซึ่งในปี 1995 Wilson (1995) ได้ให้คำจำกัดความของเอนโดไฟต์ที่มีคนนิยมใช้มากที่สุด คือ “จุลินทรีย์ทุกชนิดที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชที่แข็งแรง โดยอาจจะอาศัยอยู่เพียงช่วงใดช่วงหนึ่งของชีวิตหรือตลอดวงจรชีวิต และจะไม่ก่อให้เกิดอาการในพืชที่อาศัยอยู่” นอกจากนี้ราเอนโดไฟต์ยังอาศัยอยู่ร่วมกับโฮสต์ในลักษณะพึ่งพาอาศัยกัน ราเอนโดไฟต์สามารถพบได้ในพืชทุกชนิด (Arnold และคณะ, 2000) และแยกได้จากเนื้อเยื่อทุกส่วนของพืช ไม่ว่าจะเป็นส่วนของดอก ใบ เปลือกไม้ ท่อลำเลียง ราก เมล็ด กิ่งไม้

ในปัจจุบันการศึกษาเกี่ยวกับราเอนโดไฟต์ได้รับความสำคัญในแง่วิวัฒนาการ (Carroll, 1998; Saikonen และคณะ, 2004) นิเวศวิทยา (Gamboa และ Bayman, 2001; Romeo และคณะ, 2001; Kumar และ Hyde, 2004) สันฐานวิทยา (Guo และคณะ, 2000; 2001; 2003; Promputtha และคณะ, 2005b) และเป็นแหล่งในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Stierle และคณะ, 1999)

ราเอนโดไฟต์สามารถอาศัยอยู่ได้ทั้งภายในเซลล์ของพืชหรือช่องว่างระหว่างเซลล์ (Petrini, 1991) โดยเส้นใยของราเอนโดไฟต์จะแทรกเข้าไปในเซลล์เพื่อที่จะใช้อาหารร่วมกันกับพืชที่อาศัยอยู่โดยไม่แสดงอาการให้เห็นในพืชที่ถูกอาศัย



Endophytic hyphae (*Neotyphodium lolii*) of perennial ryegrass (*Lolium perenne*) at 400X



The tall fescue endophytic fungi

รูปที่ 2.1 เส้นใยของราเอนโดไฟต์ในเนื้อเยื่อพืช

การจัดกลุ่มราเอนโดไฟต์ในทางนิเวศวิทยา สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มดังนี้

1. Clavicipitaceous grass endophyte คือ กลุ่มราเอนโดไฟต์ที่อาศัยอยู่ในหญ้า ซึ่งเป็นราในวงศ์ Clavicipitaceae การค้นพบราเอนโดไฟต์กลุ่มนี้ เริ่มต้นจากการพบราในเมล็ดของหญ้าชนิดหนึ่ง (*Lolium tumulentum* L.) ซึ่งเป็นวัชพืชชนิดหนึ่ง ซึ่งเกิดในแปลงของ Vogh ในปี ค.ศ. 1989 จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าราในกลุ่มนี้มีแหล่งอาศัยในพืชชนิดอื่นอีกมาก ซึ่งทั้งหมดจะเป็นหญ้าในตระกูล Poaceae หญ้าจำพวกหญ้าแห้วหมู (Sedge) ตระกูล Cyperaceae และหญ้าทรงสูงชนิดหนึ่ง (rush) ตระกูล Juncaceae โดยมีหญ้ากว่า 80 สกุลและหลายร้อยสายพันธุ์อาศัยอยู่

ได้มีการศึกษาราเอนโดไฟต์กลุ่ม Clavicipitaceous พบว่าราเอนโดไฟต์กลุ่มนี้สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญได้แก่ lolitrem B, paramine และ ergovaline โดยสารพิษดังกล่าวจะมีผลต่อแมลง คือ ทำให้แมลงอดอาหาร ลดอัตราการเจริญ และทำให้อัตราการรอดชีวิตลดลงโดยราเอนโดไฟต์ที่สามารถสร้างกลุ่มพืชดังกล่าวได้แก่ *Acremonium lolii* และ *Epichole typhina* สาร lolitrem B จะมีผลต่อระบบประสาท เมื่อสัตว์กินสารชนิดนี้เข้าไป จะทำให้เดินไม่สะดวกหรือยืนลำบาก สาร ergovaline เป็นสาเหตุให้สัตว์อุณภูมิสูงขึ้น เนื่องจากสาร

ดังกล่าวจะส่งผลกระทบต่อการขยายตัวของหลอดเลือด โดยสารกลุ่ม Alkaloids ที่สร้างโดยราเอนโดไฟต์นี้เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพกลุ่มหลักที่จะช่วยต่อต้านในการเข้ามารุกรานของแมลงศัตรูพืช (Miles และคณะ, 1998)

2. Non-Clavicipitaceous grass endophyte คือ ราเอนโดไฟต์ในไม้ยืนต้นหรือไม้พุ่มแต่ทั้งนี้จะรวมราเอนโดไฟต์ที่อาศัยอยู่ในหญ้าที่ไม่ได้อยู่ในวงศ์ Clavicipitaceae ราในกลุ่มนี้ได้แก่กลุ่มราในดิวิชันย่อย Ascomycota, Deuteromycota, Zygomycota และ Basidiomycota การศึกษาราเอนโดไฟต์กลุ่มนี้เพิ่งจะมีประมาณ 20 ปีที่ผ่านมา โดยเริ่มศึกษาจากต้นสนพันธุ์ยุโรป หลังจากนั้นก็มีรายงานที่รวบรวมรายชื่อของพืชที่มีราเอนโดไฟต์ เพื่อศึกษาการกระจายตัวของราเอนโดไฟต์ซึ่งปัจจุบันพบว่าราเอนโดไฟต์มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง

การกระจายตัวของราเอนโดไฟต์กลุ่ม Non-Clavicipitaceous grass endophyte ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย การกระจายตัวของราเอนโดไฟต์ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ความจำเพาะต่อโฮสต์ ปริมาณน้ำ ความชื้น ปริมาณเมฆ ความต่อเนื่องของสภาพภูมิศาสตร์ นอกจากนี้ยังเกี่ยวข้องกับตำแหน่งของพืช ความสูงของต้นไม้ การกระจายตัวของกิ่งไม้ อายุของพืชชนิดนั้นๆ เป็นต้น

Carroll และ Carroll (1978) แสดงให้เห็นว่าความถี่ของการแฝงตัวของราเอนโดไฟต์ในต้นสน Douglas จะเพิ่มขึ้นขึ้นอยู่กับปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับปริมาณน้ำฝน ปริมาณหมอกในบริเวณนั้นๆ ซึ่งต่อมา Rodrigues (1994) ได้พบว่าราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากตัวอย่างในฤดูฝนมีปริมาณมากกว่าราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากตัวอย่างในฤดูแล้ง

ได้มีนักวิจัยหลายคนทำการศึกษาเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างความสูงของต้นไม้กับการกระจายของราเอนโดไฟต์ Bernstein และ Carroll (1977) ได้รายงานว่าไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างความสูงของยอดไม้กับจำนวนของราเอนโดไฟต์ อย่างไรก็ตาม Johnson และ Whitney (1989a) ได้แสดงให้เห็นว่าปริมาณของราเอนโดไฟต์จะลดลงในต้นไม้ที่มีความสูงมากกว่า

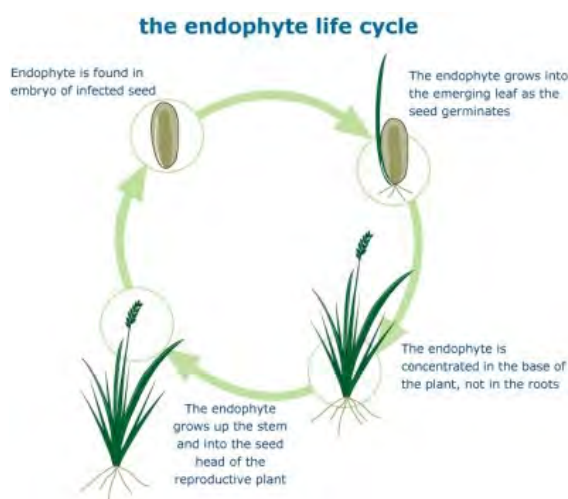
Rodrigues (1994) พบว่าไม่ว่าจะเป็น อายุของใบไม้ ระยะการเติบโตของพืช พื้นที่ฤดูกาล ล้วนมีผลต่อการกระจายตัวและปริมาณของราเอนโดไฟต์ทั้งสิ้น

2.4 ความหลากหลายทางชีวภาพของราเอนโดไฟต์

เนื่องจากราเอนโดไฟต์เป็นจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่มีจำนวนมากและมีความหลากหลายทางชีวภาพสูง ซึ่งบนโลกมีบริเวณป่าเขตอบอุ่นและบริเวณป่าเขตร้อนขึ้นอยู่มากมาย จึงคาดว่าในบริเวณที่มีพรรณพืชมากก็จะมีลักษณะเฉพาะของราเอนโดไฟต์มากเช่นกัน และเอนโดไฟต์

อาจจะมีการวิวัฒนาการตามเหมือนกับพรรณพืชท้องถิ่นแต่ละชนิด ราเอนโดไฟต์เป็นราที่มีความแตกต่างกันทั้งชนิดและนิเวศวิทยา (Bacon และคณะ, 1988) ราเอนโดไฟต์ส่วนใหญ่อยู่ในไฟลัม Ascomycota และ Deuteromycota โดยความถี่ของราเอนโดไฟต์ที่พบจะขึ้นอยู่กับระบบนิเวศวิทยาของถิ่นที่อยู่ของพืชที่อาศัยอยู่

การศึกษาเกี่ยวกับราเอนโดไฟต์ในปัจจุบันจะมุ่งเน้นศึกษาราเอนโดไฟต์ในแต่ละท้องถิ่น โดยเฉพาะความสัมพันธ์ระหว่างแต่ละชนิดของราเอนโดไฟต์กับพืชแต่ละชนิด โดยมีการตั้งข้อสังเกตเกี่ยวกับการกระจายของราเอนโดไฟต์แต่ละท้องถิ่นที่ว่าเป็นไปได้ 2 ลักษณะ คือ การกระจายของเอนโดไฟต์จากพืชชนิดหนึ่งไปสู่พืชชนิดเดียวกันในพื้นที่ต่างกันโดยอาศัยปัจจัยทางธรรมชาติ เช่น ลม สัตว์ที่เป็นพาหนะต่างๆ (แมลง นก เป็นต้น) และการแพร่กระจายอีกลักษณะหนึ่งเป็นการกระจายจากรุ่นหนึ่งไปสู่อีกรุ่นหนึ่งโดยการพัฒนาผ่านเมล็ดและเจริญพร้อมเมล็ดต่อไป (Bayman และคณะ, 1998)



รูปที่ 2.2 วงจรชีวิตของราเอนโดไฟต์ในหญ้า

การเจริญของราเอนโดไฟต์จะจำเพาะเจาะจงกับพืชอาศัยโดยมีกลไกในการจดจำ เช่น การงอกของแอสโคสปอร์ของ *Xylaria* sp. ที่เป็นเอนโดไฟต์จะตอบสนองต่อสารสกัดของ monolignol glucoside ของพืชที่อาศัยอยู่ (Chapela, 1991) Carroll และคณะ (1977) ได้เสนอว่าราเอนโดไฟต์จะจำเพาะต่อเนื้อเยื่อบางชนิด เช่นเดียวกับการศึกษาของ Petrini และ Fisher (1988)

2.5 การศึกษาความหลากหลายของราเอนโดไฟต์ในประเทศไทย

ความรู้ส่วนใหญ่เกี่ยวกับราเอนโดไฟต์มักมีที่มาจากพืชเขตอบอุ่น (Fisher และคณะ, 1994; Strobel, 1996; Taylor และคณะ, 1999) แต่ปัจจุบันได้มีการศึกษาราเอนโดไฟต์ในพืชเขตร้อนกันมากขึ้น (Arnold และคณะ, 2000; 2003; Suryanarayanan และคณะ, 2002; 2003) โดย Arnold และคณะ (2001) พบว่าราเอนโดไฟต์ในพืชเขตร้อนมีมากกว่าพืชในเขตอบอุ่น

ในปัจจุบันการศึกษาเกี่ยวกับความหลากหลายทางชีวภาพราเอนโดไฟต์ในพืชเขตร้อนเพิ่มมากขึ้น แต่ในประเทศไทยกลับมีรายงานเกี่ยวกับความหลากหลายทางชีวภาพราเอนโดไฟต์เพียงไม่กี่ฉบับทั้งที่มีความหลากหลายทางชีวภาพมาก (Panthong., 1991) การศึกษาเกี่ยวกับราเอนโดไฟต์ในประเทศไทยมักมุ่งเน้นในการศึกษาเกี่ยวกับพืชประจำถิ่นเพื่อหาแหล่งผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมากกว่าจะศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของราเอนโดไฟต์ การศึกษาเกี่ยวกับความหลากหลายทางชีวภาพของราเอนโดไฟต์ เช่น ราเอนโดไฟต์ที่แยกจากต้นสัก (Mekkamol และคณะ, 1998) การกระจายของราเอนโดไฟต์จากดอยสุเทพ-ปุย (Lumyong., 1998) ราเอนโดไฟต์ในต้นบุนนาค (*Mesua ferrea*) และ ต้นแตงซัง (*Prunus arborea*) (Hyde และคณะ, 1997) ราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากผล เมล็ด ลำต้น ช่อดอกของต้นลองกอง (*Dimocarpus longana*) (Sardsud และคณะ, 1998) ราเอนโดไฟต์จากกิ่งและใบไม้ (Lumyong และคณะ, 2000) ราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากใบสัก (*Tectona grandis* L.) และใบจามจุรี (*Samanea saman* Merr.) (Chareprasert และคณะ, 2001) นอกจากนี้ในประเทศไทยยังมีป่าอีกหลายเขตที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูงและมีการเข้าไปศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของราเอนโดไฟต์น้อย เช่น ป่าเต็งรัง เป็นต้น

2.6 การแยกราเอนโดไฟต์และการจำแนกชนิดของราเอนโดไฟต์

ในปัจจุบันมีวิธีการแยกราเอนโดไฟต์จากชิ้นส่วนพืชมากมาย ซึ่งขึ้นอยู่กับการนำไปใช้งาน เนื่องจากองค์ประกอบของพืชแต่ละส่วนไม่เหมือนกัน แต่สิ่งหนึ่งที่พึงควรระวังคือการแยกราเอนโดไฟต์ควรแยกจากชิ้นส่วนของพืชที่มีความสดและแข็งแรง ซึ่งในการเก็บตัวอย่างนั้นจำเป็นที่จะต้องป้องกันการสูญเสียจากการคายน้ำของพืช โดยการเก็บแยกส่วนกับบรรยากาศภายนอกเพื่อลดอัตราการตายของเนื้อเยื่อพืช และลดการปนเปื้อนของราและแบคทีเรียภายนอก (Bills, 1996)

วิธีการแยกราเอนโดไฟต์ที่มีจากชิ้นส่วนพืชมากมายนั้น โดยส่วนใหญ่จะมีขั้นตอนการทำ ความสะอาดพื้นผิวของชิ้นส่วนพืชเหมือนกัน (Taylor และคณะ, 1999) การทำความสะอาด พื้นผิวของชิ้นส่วนพืชจะมีเอทิลแอลกอฮอล์เป็นตัว surfactant และมีโซเดียมไฮโปคลอไรด์เป็นตัว ฆ่าเชื้อภายนอก ความเข้มข้นและเวลาในการจุ่มเอทิลแอลกอฮอล์และมีโซเดียมไฮโปคลอไรด์ ขึ้นอยู่กับชิ้นส่วนของพืช จากนั้นจะนำชิ้นส่วนของพืชที่ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อมาแล้ว จากนั้นจะนำไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ขนาดของชิ้นส่วนพืชที่นำไปแยกเอนโดไฟต์มี ความสำคัญเช่นกัน โดยขนาดชิ้นส่วนของพืชที่จะนำไปแยกไม่ควรมีขนาดใหญ่เกินไป (Gamboa และคณะ, 2002)

การจำแนกราเอนโดไฟต์เป็นเรื่องที่ยากมาก เนื่องจากขาดข้อมูลเกี่ยวกับลักษณะและ คุณสมบัติของราที่เจริญบนอาหารชนิดต่างๆ นอกจากนั้นยังมีรายงานเกี่ยวกับสิ่งมีชีวิตที่อยู่ใน เนื้อเยื่อพืชค่อนข้างน้อย (Mekkamol, 1998) ราเอนโดไฟต์หลายชนิดจะไม่สร้างสปอร์บน อาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งบางทีอาจจะต้องใช้เวลาานกว่าที่ราเอนโดไฟต์ชนิดนั้นๆจะสร้างสปอร์ ซึ่ง บางทีอาจจะต้องอาศัยวิธีการอื่นๆในการชักนำให้เกิดการสร้างสปอร์ เช่น การนำไปเพาะลงอาหาร ที่แตกต่างกันไปเพื่อชักนำให้เกิดการสร้างสปอร์ อาหารเลี้ยงเชื้อที่นิยมใช้ในการชักนำให้เกิดการ สร้างสปอร์ได้แก่ oat meal agar (OM), V8 agar, corn meal agar หรือนำไปวางไว้ใต้แสง black light (near UV) ให้ขึ้นแสง 12 ชั่วโมง มี 12 ชั่วโมง หากราที่ยังไม่สามารถสร้างสปอร์จะจัดอยู่ ในกลุ่ม mycelia sterilia

2.6.1 กลุ่มราเอนโดไฟต์ในกลุ่ม Mycelia sterilia

การจำแนกราคตามหลักสัณฐานวิทยาของรา จำเป็นจะต้องอาศัยลักษณะโครงสร้างรูปร่าง สปอร์ของรา ดังนั้นหากไม่เกิดการสร้างสปอร์ก็จะเป็นการยากที่จะจำแนกชนิดของรา (Currah และ Tsuneda, 1993) กลุ่มราที่ไม่สร้างสปอร์จะถูกจัดอยู่ในกลุ่มรา mycelia sterilia ใน การศึกษาเกี่ยวกับราเอนโดไฟต์พบว่ากลุ่มรา mycelia sterilia มักจะพบในพืชทุกชนิดและมีความ หลากหลายทางชีวภาพค่อนข้างสูง การจำแนกกลุ่มรา mycelia sterilia มักอาศัยได้เพียงแค่ รูปร่างภายนอก สีของเส้นใย การกระจายตัวของเส้นใย อัตราการเจริญ (Bill, 1996; Umali และคณะ, 1999; Frohlich และคณะ, 2000) อย่างไรก็ตาม การจำแนกกลุ่มรา mycelia sterilia โดยการอาศัยลักษณะดังที่กล่าวข้างต้นย่อมไม่สะท้อนให้เห็นถึงชนิดของรา และยากในการจัด ออนุกรมวิธานที่ถูกต้องแน่นอน (Guo และคณะ, 2003)

2.6.2 กลุ่มราเอนโดไฟต์ในวงศ์ Xylariaceae

รา Xylariaceae เป็นราตระกูลหนึ่งใน Class Pyrenomycetes โดยพบมากในป่าเขตอบอุ่นและเขตร้อน มักจะพบกลุ่มรา Xylariaceae ตาม ต้นไม้ ดอกไม้ เมล็ดที่ตายแล้ว รากลุ่ม Xylariaceae เป็นราจำพวก saprophyte บางชนิดก็เป็น pathogen ได้เช่นกัน จากการศึกษาพบว่ารากลุ่ม Xylariaceae มักพบในราเอนโดไฟต์ (Carroll และ Carroll, 1978; Petrini และ Mueller, 1979) รากลุ่ม Xylariaceae ที่รู้จักกันดีคือสกุล *Xylaria* *Hypoxylon* และ *Daldenia*

คุณสมบัติที่น่าสนใจของรากลุ่มนี้คือ เป็นกลุ่มราที่มักจะสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมากมายหลายชนิด (Whalley, 1985) เช่น สาร Xyloketal H (Wenqing Yin และคณะ, 2008) *Xylaria* sp. พบสาร depudecin phaseolinone phomenone อนุพันธ์ของ cytochalasin Q และ (E)-methyl 3-(4-methoxy-phenoxy)propenoate ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อมาลาเรียในระดับที่ดี นอกจากนี้ยังพบสาร multiplolides A และ B จาก *Xylaria multiplex* (Boonphong และคณะ, 2001) ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งรา

การบงบอกสายพันธุ์ของกลุ่มรา Xylariaceae เป็นเรื่องที่ยากมาก เนื่องจากการเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงกลุ่มรา Xylariaceae จะสร้างระยะสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศออกมา (anamorph) โดยกลุ่มรา Xylariaceae มักจะไม่สร้างระยะสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (telomorphy) ซึ่งจำเป็นต่อการจำแนกสายพันธุ์ของราในกลุ่มนี้

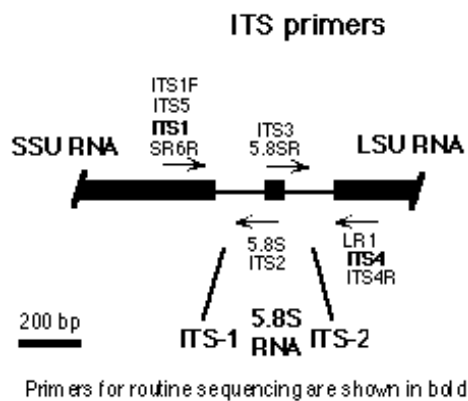
จากปัญหาในการจำแนกกลุ่มรามาจากข้อ 2.6.1 และ 2.6.2 ดังนั้นปัจจุบันจึงได้มีการนำเทคนิคทางอณูชีววิทยาามาประยุกต์ใช้กับการจำแนกกลุ่มราดังกล่าว

2.6.3 การจำแนกกลุ่มราโดยอาศัยเทคนิคทางอณูชีววิทยา

โดยปกติแล้วการจัดอนุกรมวิธานของราจะอาศัยการจำแนกรูปร่างสปอร์ของราชนิดนั้นๆ แต่ก็มีราหลายชนิดที่ไม่อาจทราบถึงชนิดได้เช่นกลุ่มรา *Mycelia sterilia* เป็นต้น ซึ่งในปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคทางอณูชีววิทยาเข้ามาช่วยในการจำแนกชนิดของรา (Bryan และคณะ, 1995; Liu และคณะ 1995; Mazzola และคณะ 1996; Guo และคณะ 2000; 2003) ซึ่งสามารถช่วยแก้ปัญหาในการจำแนกกลุ่มราที่ไม่สร้างสปอร์ได้เป็นอย่างดี (Guo และคณะ 2000; 2003) โดยบริเวณที่นำไปใช้ในการวิเคราะห์ความแตกต่างของราแต่ละชนิดคือบริเวณ Internal transcribed spacer (ITS)

ITS ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ITS1 ซึ่งเป็นบริเวณที่อยู่ระหว่าง 18S กับ 5.8S rRNA gene และ ITS2 อยู่ระหว่าง 5.8S กับ 28S rRNA gene บริเวณที่ได้รับการนิยามอย่างสูงในการศึกษาหาความแตกต่างในระดับชนิดของราเนื่องจากมีข้อดีหลายประการ คือ เป็นบริเวณที่มีลำดับเบสที่มี

การอนุรักษ์สูงมากและมีขนาดไม่ใหญ่มากประมาณ 600-800 คู่เบส ทำให้ง่ายต่อการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ตำแหน่งนี้ด้วย (White และคณะ 1990) นอกจากนี้ยังเป็นบริเวณที่จำนวนซ้ำมาก ทำให้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ง่าย (Gardes และ Bruns, 1993) และมีความแปรปรวนสูงในระดับชนิดแต่มีความแปรปรวนต่ำในระดับสกุล (Gardes และคณะ 1993)



รูปที่ 2.3 แสดงตำแหน่ง primer มาจับที่บริเวณ Internal transcribed spacer (ITS) region

primer name	sequence (5'->3')	reference
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White และคณะ, 1990
ITS2	GCTGCGTTCTTCATCGATGC	White และคณะ, 1990
ITS3	GCATCGATGAAGAACGCAGC	White และคณะ, 1990
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White และคณะ, 1990
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	White และคณะ, 1990
ITS1-F	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	Gardes และ Bruns, 1993
ITS4-B	CAGGAGACTTGTACACGGTCCAG	Gardes และ Bruns, 1993

ตารางที่ 2.3 แสดงลำดับเบสของ Universal primer ที่นำมาใช้ในการจำแนกชนิดของรา

2.7 ป่าเต็งรัง

2.7.1 ลักษณะในการจำแนก

ลักษณะสำคัญในการจำแนกป่าเต็งรังคือ มีการผลัดใบของไม้ส่วนใหญ่ทุกระดับชั้นเรือนยอด และมีไม้ดรรชนีสังคมซึ่งมีความแตกต่างจากไม้ในกลุ่มผลัดใบในสังคมอื่นอย่างชัดเจน ไม้เด่นที่เป็นดรรชนีในป่าเต็งรังประกอบด้วยไม้ในวงศ์ยาง (*Dipterocarpaceae*) ที่มีการผลัดใบในช่วงฤดูแล้งได้แก่ เต็ง (*Shorea obtuse*) รัง (*Shorea siamensis*) เหียง (*Dipterocarpus obtusifolius*) พลวง (*Dipterocarpus tuberculatus*) และยางกราด (*Dipterocarpus intricatus*)

2.7.2 ถิ่นการกระจาย

ป่าเต็งรังพบในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยเฉพาะประเทศไทย ลาว กัมพูชา พม่า และบางส่วนของเวียดนามเท่านั้น ในประเทศไทยมีสังคมของป่าเต็งรังตั้งแต่เพชรบุรีขึ้นไปถึงเชียงราย เป็นสังคมพืชเด่นของภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ขึ้นสลับไปกับป่าผสมผลัดใบโดยยึดครองในส่วนที่มีความแห้งแล้งจัด กักเก็บน้ำได้เลว พบตั้งแต่ระดับความสูง 50 เมตรขึ้นไปถึง 1000 เมตร เหนือระดับน้ำทะเล

2.7.3 ปัจจัยที่เป็นตัวกำหนดป่าเต็งรัง

ป่าเต็งรังขึ้นอยู่กับพื้นที่ที่ฤดูกาลแบ่งแยกกันอย่างชัดเจนระหว่างฤดูแล้งและฤดูฝน ต้องมีช่วงแห้งแล้งจัดเกินกว่า 4 เดือนต่อปี มีไฟป่าเกิดขึ้นเป็นประจำ เป็นสังคมถาวรที่มีไฟป่าเป็นตัวกำหนด หากไม่มีไฟป่าจะคงอยู่ไม่ได้ โดยไฟป่าเป็นปัจจัยสำคัญต่อการจัดโครงสร้าง การคงชนิดพันธุ์ไม้ในสังคมและการสืบพันธุ์ของไม้ในพื้นที่

2.7.4 พันธุ์ไม้และลักษณะโครงสร้างของป่าเต็งรัง

ป่าชนิดนี้สามารถแบ่งได้ออกโดยกว้างๆ ตามลักษณะโครงสร้างทางด้านตั้งออกเป็น 2 สังคมย่อยคือ ป่าเต็งรังสมบูรณ์และป่าเต็งรังแคระ โดยอาจจะนับป่าสนผสมเต็งรังว่ามี 3 สังคมย่อยส่วนการจำแนกในระดับแอสโซซิเอชัน (association) ซึ่งถือเอาไม้เด่นในชั้นเรือนยอดเป็นหลัก

ลักษณะโครงสร้างของป่าเต็งรังสมบูรณ์โดยทั่วไปมีเรือนยอด 3 ชั้นเรือนยอด ซึ่งไม่นับพืชชั้นในป่า (forest floor) ปรากฏในพื้นที่อุดมสมบูรณ์ เรือนยอดชั้นบนมีความสูงประมาณ 20 – 35 เมตร ไม้เด่นในชั้นนี้ประกอบไปด้วย เหียง (*Dipterocarpus Obtusifolius*) พลวง (*Dipterocarpus*

tuberculatus) รั้ง (*Shorea siamensis*) ส่วนเต็ง (*Shorea obtuse*) มักขึ้นผสมอยู่กับไม้ 3 ชนิด ดังกล่าว ไม้ได้เป็นไม้เด่น

ไม้เรือนยอดชั้นรอง สูงประมาณ 10-15 เมตร เป็นไม้ขนาดกลางขึ้นสอดแทรกอยู่ในพืชชั้นบน ชนิดไม้เด่นได้แก่ ยอดเถื่อน (*Morinda elliptica*) ตั้ว (*Cratoxylum formosum*) กาสามปึก (*Vitex peduncularis*) ยอดป่า (*Morinda elliptica*) สมอไทย (*Terminalia Chebula*)

เรือนยอดชั้นไม้พุ่ม สูงไม่เกิน 7 เมตร เป็นไม้ขนาดเล็กโดยธรรมชาติ บางชนิดถ้าพบในป่าอื่นอาจเป็นไม้ขนาดกลาง แต่ถ้าพบในสังคมป่าเต็งรั้งมักจะแคระแกรนได้แก่ แสลงใจ (*Strychnos nuxvomica*) เหมือดโหลด (*Aporosa villosa*) ปรงเหลียม (*Cycas siamensis*)

2.7.5 พันธุ์ไม้ในป่าเต็งรั้งที่นำมาศึกษา

เต็ง (*Shorea obtusa* Wall.)

เต็งเป็นไม้ต้น ผลัดใบ สูง 15-30 ม. เรือนยอดเป็นพุ่มกว้าง ลำต้นมักไม่ค่อยตรง เปลือกสีน้ำตาลเทา แตกร่องและเป็นสะเก็ดหนา มักตกชั้นสีเหลืองขุ่น เปลือกในสีน้ำตาลแกมเหลือง ใบเดี่ยว เรียงสลับ รูปขอบขนาน แผ่นใบ รูปรีแกมรูปขอบขนานถึงรูปไข่กลับ กว้าง 5-7 ซม. ยาว 10-16 ซม. โคนใบและปลายใบมน ผิวใบมีขนสั้นสากมือ ถึงค่อนข้างเกลี้ยง เส้นแขนงใบ 15-20 คู่ ก้านใบยาว 1-1.5 ซม. ดอก สีขาวนวล ออกเป็นช่อตามปลายกิ่ง ผล กลมรี ถึงรูปไข่ กว้างประมาณ 0.8 ซม. ยาวประมาณ 1 ซม. มีปีกยาว 3 ปีก และปีกสั้น 2 ปีก

เต็งมีการกระจายพันธุ์เป็นกลุ่มใหญ่ ในป่าเต็งรั้ง และป่าเบญจพรรณ ดินลูกรัง และเขาหินทรายทั่วทุกภาคของประเทศ ที่ความสูงจากระดับทะเลปานกลาง 150-1,300 ม. ในต่างประเทศพบที่พม่า ลาว กัมพูชา และเวียดนาม ออกดอกเดือนกุมภาพันธ์-พฤษภาคม ผลแก่เดือนเมษายน-กรกฎาคม

รั้ง (*Shorea siamensis* Miq.)

รั้ง (*Shorea siamensis* Miq.) เป็นไม้ยืนต้นผลัดใบ (deciduous tree) มีขนาดกลางถึงขนาดใหญ่ มีความสูงอยู่ระหว่าง 10-25 เมตร เรือนยอด กลมหรือเป็นรูปเจดีย์ ลำต้น โดยทั่วไปมีลักษณะ เปลาดตรง บางต้นคดงอ เปลือก มีสีเทาปนน้ำตาล แตกเป็นร่องลึก เป็นสะเก็ดโต ๆ สับดูเป็นสีน้ำตาล เหลือง มักตกชั้นสีเหลืองขุ่น ๆ กระจุก มีสีน้ำตาลอ่อน แก่น มีสีน้ำตาลเข้ม

ไม้รั้งโดยทั่วไปพบอยู่ในป่าเต็งรั้ง (Dry dipterocarp forest) โดยเฉพาะในสังคมไม้รั้ง (Pentacme suavis community type) ซึ่งแบ่งออกได้เป็นสังคมไม้รั้งที่ชื้นในที่แห้งแล้ง (xeric) และ สังคมไม้รั้งที่ชื้นในที่ชุ่มชื้น (mesic)

สำหรับการใช้ประโยชน์ของไม้รัง โดยทั่วไป เนื้อไม้ใช้ทำเสา หมอนรองรถไฟ ทำส่วนต่าง ๆ ของเครื่องเรือน และการก่อสร้างต่าง ๆ ที่ต้องการความแข็งแรงทนทาน ใช้ทำเรือ และเครื่องมือกลกรรม นอกจากนี้ “ชัน” ซึ่งได้จากไม้รังยังสามารถนำมาผสมกับน้ำมันยางใช้ทำไม้ ยาเรือ ยาแนว ไม้ และภาชนะที่ทำด้วยไม้ไฟ

กระโดน (*Careya sphaerica* Roxb.)

ไม้ต้น ขนาดกลาง ผลัดใบ สูง 10-30 ม. หน้าแล้งจะทิ้งใบหมดแล้วผลิใบใหม่พร้อมดอกใบ เดี่ยว เรียงสลับถี่ๆ ที่ปลายกิ่ง รูปไข่กลับ ปลายแหลม เป็นดิ่งสั้นๆ โคนเรียวยาวดูคล้ายคืบ ขอบหยักเล็กน้อย ดอกใหญ่ ออกเป็นช่อ แต่ละดอกมีใบประดับ 3 ใบ กลีบเลี้ยง 4 กลีบ โคนกลีบติดกันเป็นรูปประฆัง กลีบดอก 4 กลีบ สีขาว เกสรเพศผู้มีจำนวนมาก รังไข่ 4 ช่อง ผลรูปไข่หรือกลม เส้นผ่านศูนย์กลาง 5-8 ซม. ที่ปลายผลมีกลีบเลี้ยงติดอยู่ เมล็ดแบน สีน้ำตาลอ่อน รูปขอบขนาน ผิวเรียบ

เนื้อไม้ค่อนข้างหยาบแข็ง และหนัก สีแดงแก่หรือน้ำตาลแกมแดง เส้นค่อนข้างตรงทนทานในร่ม ใช้ในการก่อสร้างอาคารบ้านเรือน ทำเครื่องเรือน เครื่องมือเครื่องใช้ ถ้าอาบน้ำยาอย่างถูกต้องแล้วใช้เป็นหมอนรองรางรถไฟได้ดี เปลือกใช้เป็นยาแก้ไข้ แก้พิษงู แก้เมื่อยเคล็ด เป็นยาฝ้าตสมาน ใช้เบื่อปลา และใช้เป็นสีย้อม เส้นใยที่ได้จากเปลือก หยาบ ใช้ทำเชือก ทำเบาะรองหลังช้าง ทำกระดาษสีน้ำตาล ใบมีรสฝาด มีแทนนินร้อยละ 19 แพทย์แผนโบราณใช้ใบผสมกับเครื่องยาอื่นๆ ประุงเป็นยาสมานแผล ใช้เบื่อปลา ดอกและยอดกินเป็นผักได้ ดอกและน้ำจากเปลือกสดใช้ผสมกับน้ำผึ้งจิบแล้วชุ่มคอ แก้ไอและแก้หวัด เป็นยาบำรุงหลังการคลอดบุตร ผลกินได้ ช่วยย่อยอาหาร เป็นยาฝ้าตสมาน

ยอป่า (*Morinda elliptica* Ridl.)

ยอป่า เป็นไม้ยืนต้นขนาดเล็กมีความสูงประมาณ 5-15 เมตร ใบเดี่ยว ออกตรงข้ามเรียงสลับเป็นคู่ แผ่นใบรูปรี รูปขอบขนานหรือรูปไข่กลับ กว้าง 4-8 ซม. ยาว 8-17 ซม. ปลายใบแหลม บางครั้งหู่ โคนใบสอบขอบใบเรียบ ผิวใบมีขน ดอกสีขาวออกมารวมกันเป็นกระจุก ฐานดอกเชื่อมติดกัน ช่อดอกออกตามซอกใบ ผลมีขนาดเล็ก ยอป่าถือว่าเป็นไม้มงคลของคนอีสาน ในการนำข้าวขึ้นยุ้งจะต้องตัดเอากิ่งของยอป่ามาค้ายู่ไว้ก่อนนำข้าวขึ้นยุ้ง เพื่อเป็นสิริมงคล มีความหมายว่าให้ข้าวเพิ่มพูน ในทางสมุนไพรใช้แก่นต้มน้ำเป็นยาฟอกเลือด ขับลม ดอกมีกลิ่นหอมอ่อนเหมาะที่จะปลูกตามบ้านเป็นไม้หอมที่ติดอกชนิดหนึ่ง

กระท่อม (*Anthocephalus chinensis* Lamk.)

ไม้ต้นขนาดกลางถึงขนาดใหญ่ ผลัดใบหรือไม่ผลัดใบ สูง 15-30 เมตร กิ่งออกเกือบตั้งฉากกับลำต้น มักกู่ลง หนูปรูปสามเหลี่ยมแคบ ใบรูปไข่ หรือรูปรีแกมขอบขนาน ยาว 12-25 ซม.

แผ่นใบเกลี้ยงหรือมีขนสั้นนุ่มด้านล่าง หูใบเป็นรูปสามเหลี่ยม ดอกสีเหลืองอ่อน มีกลิ่นหอม ออกเป็นช่อกระจุกแน่น กลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4-5 ซม. ก้านช่อยาว 2.5-4 ซม. ดอกเล็กอัดกันแน่น กลีบเลี้ยงเป็นหลอดสั้น กลีบดอก สีเหลืองเชื่อมกันเป็นหลอดยาวรูปดอกเข็ม ผลเป็นกระจุก เปลี่ยนเป็นสีเหลืองและสีน้ำตาลเมื่อแก่ กระจุกมีเขตการกระจายพันธุ์กว้างตั้งแต่เนปาล บังคลาเทศ อินเดีย ศรีลังกา พม่า จีน ภูมิภาคอินโดจีนและมาเลเซีย รวมถึงฟิลิปปินส์ และปาปัวนิวกินี ขึ้นตามชายป่าเบญจพรรณ ป่าดิบแล้ง และป่าดิบชื้น ตามหุบเขาหรือริมลำธาร ระดับความสูงจนถึงประมาณ 1300 เมตร

กระจุกถือว่าเป็นไม้โตเร็ว มีเนื้อไม้ละเอียด สีเหลืองหรือขาว ใช้ทำพื้นและฝาที่ใช้งานในร่ม ทำกล่อง อุปกรณ์หรือสิ่งก่อสร้างอื่นๆ ที่มีน้ำหนักเบา และทำเยื่อกระดาษได้ นิยมปลูกเป็นสวนป่าเพื่อการใช้สอยในประเทศจีนและประเทศอื่นๆ ในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้

สมอไทย (*Terminalia Chebula* Retz.)

เป็นพันธุ์ไม้ที่พบขึ้นอยู่ทั่วไปตามป่าเบญจพรรณแล้งและชื้นในภาคต่างๆ ของประเทศ เป็นไม้ยืนต้นขนาดกลางถึงขนาดใหญ่ ผลัดใบ สูง 15-25 เมตร ผลสมอไทยจะรูปร่างป้อมๆ หรือรูปกระสวย มีเนื้อเยื่อหนาหุ้มเมล็ดซึ่งมีเมล็ดเดี่ยวแข็งๆ ผลโต 2-3 ซม. และยาว 3-4 ซม. มีพู่หรือเกลี้ยงตามยาวตัวผล

นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อไวรัส รวมทั้งเชื้อ HIV และแบคทีเรียบางชนิด บำรุงหัวใจ ต้านอนุมูลอิสระและชะลอความชรา นอกจากนี้ ยังช่วยควบคุมระดับไขมันในเส้นเลือด และช่วยการทำงานของตับในการกำจัดไขมันออกจากร่างกาย รวมทั้งกระตุ้นการเผาผลาญของร่างกายได้อีกด้วย และไม่ใช่แค่ผลสมอไทยเท่านั้นที่ใช้เป็นยาได้ ส่วนอื่นๆ ก็มีสรรพคุณทางยาด้วยเหมือนกัน โดยตามตำรับยาแผนโบราณ ทั้งต้นมีสรรพคุณแก้ท้องผูก เป็นยาสมาน ยาขับเสมหะ แก้อาการเสียวคอและหน้าอก เปลือกเป็นยาขับปัสสาวะ ยาบำรุงหัวใจ ขับน้ำเหลืองเสีย ดอกใช้รักษาโรคบิด ผลอ่อนใช้เป็นยาระบาย โดยการจุ่มกับเกลือรับประทาน หรือรับประทานกับน้ำพริกก็ได้ เนื้อหุ้มเมล็ดใช้รักษาเกี่ยวกับน้ำดี ท้องร่วงเรื้อรัง บิด ท้องผูก ท้องขึ้น อืดเฟ้อ โรคหืด กระเพาะปัสสาวะไม่ทำงาน อาเจียน อากาโรสอีก พยาธิในลำไส้ โรคท้องมาน ตับและม้ามโต

ปอลาย (*Grewia eriocarpa* Juss.)

ไม้ยืนต้นขนาดเล็กถึงขนาดกลาง สูงถึง 15 เมตร ยอดอ่อนมีขนปกคลุมเล็กน้อยต้นแก่ สีเทา-น้ำตาล ใบ ใบเดี่ยว เรียงตัวสลับ ก้านใบ ยาว 5-8 มม. มีขนคลุม โคนก้านใบมีหูใบ 1 คู่ กว้าง 1-2 มม. ยาว 3-5 มม. ใบรูปไข่ โคนใบมนหรือ oblique มีเส้นใบหลักใกล้โคนใบ 3-5 เส้น (nerve) ใบชี้ซ้ายและขวาไม่เท่ากัน ปอลาย ใบแหลม ขอบใบหยัก ผิวใบมีนวล ท้องใบมีขนเล็กน้อยใบกว้าง 1.5-6 ซม. ยาว 3-12 ซม. ดอก ดอกช่อ cymose ช่อละ 3 ดอก ช่อเกิดเป็นกระจุกที่ซอกใบ ก้านช่อ

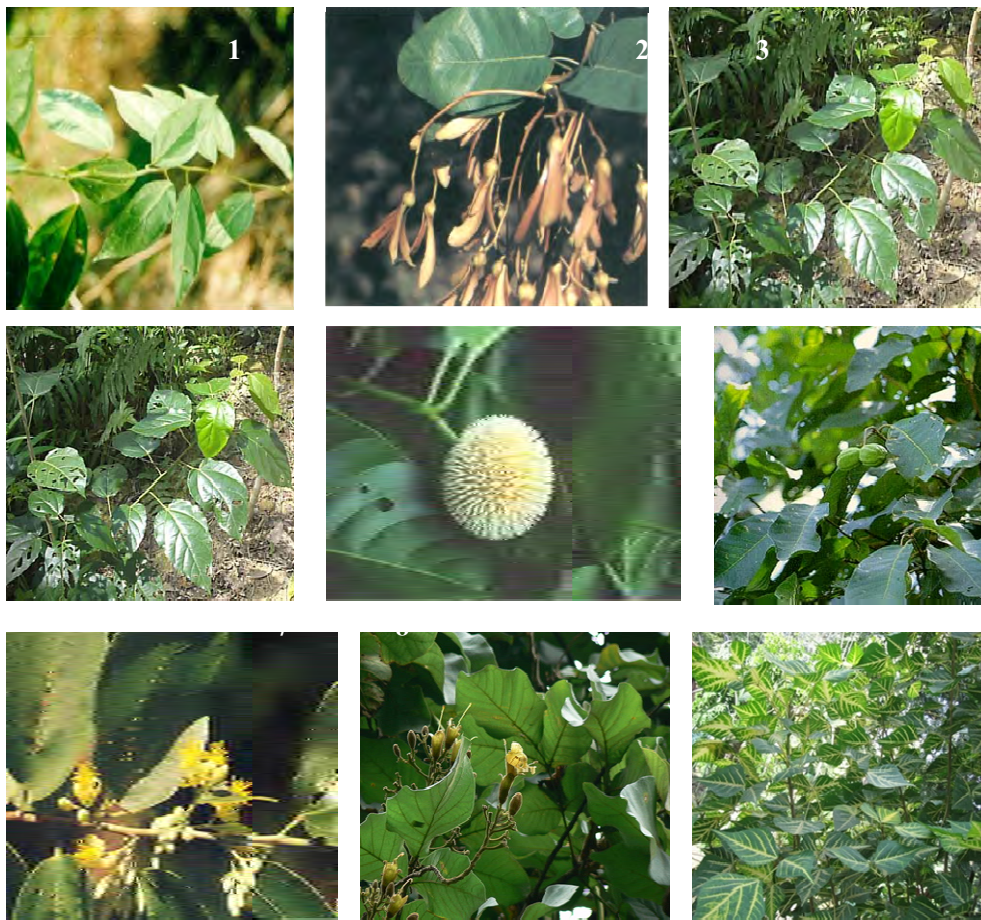
ดอกยาว 1.5-3 ซม. ก้านดอก ย่อยยาว 3-5 มม. กลีบเลี้ยง 5 กลีบ สีเขียวแกมน้ำตาล โคนกลีบติดกันปลายแยกเป็น 5 แฉก แต่ละแฉกรูปใบหอก ปลายแหลม กว้าง 1-1.5 มม. ยาว 5-6 มม. กลีบดอก 5 กลีบ สีเหลือง กลีบแยกกัน รูปใบหอก ปลายแหลม ขอบเรียบ กลีบกว้าง 1 มม. ยาว 2-4 มม. กลีบมีขน เกสรเพศผู้ จำนวนมาก แยกกัน ก้านเกสรเรียบ เกสรเพศเมีย 1 อัน รั้งไข่ superior ovary รูปไข่ สีเขียว 5 ห้อง มีขนปกคลุม ออวุลจำนวน 1-2 อันต่อห้อง ก้านเกสร 1 อันสั้นๆ ยอดเกสรเพศเมียเป็นตุ่มแหลม ผลและเมล็ด ผลแห้งแบบ capsule รูปกลม เส้นผ่าศูนย์กลางผล 3-5 มม. ผลเป็นพู่ 2-4 พู่ ผิวเรียบถึงมี ตุ่มเล็กๆ เมล็ดกลม

แค (*Markhamia stipulate* Wall.)

ลักษณะทั่วไปคล้ายแคหัวหมู (ชนิดย่อย *stipulata*) แต่ใบประกอบแบบสั้นกว่าเล็กน้อย ใบอ่อนมีขนสีน้ำตาลแดงหนาแน่น กลีบเลี้ยงและฝักมีขนแบบขนแกะไม่ใช่แบบเป็นพู่ (หลุดร่วงง่าย) แบบแคหัวหมู แคนหางค่างพบที่จีนตอนใต้ ลาว เวียดนาม และภาคเหนือของไทย ขึ้นในป่าดิบแล้ง และป่าดิบเขา จนถึงระดับความสูงประมาณ 1600 เมตร ต้น ไม้ยืนต้นขนาดเล็ก-ขนาดกลาง สูง 5-20 เมตร ลำต้นมักคดงอ เรือนยอดมักเป็นพุ่มกลมทึบ เปลือกนอกสีชาวม่นหรือสีเทา ค่อนข้างเรียบ มีรอยแตกตื้นๆ ตามยาวต้น เปลือกในสีครีมแซม ด้วยริ้วสีเข้ม ตามกิ่งอ่อนมีขนสีน้ำตาลและมีช่องระบายอากาศทั่วไป ใบ ออกเป็นช่อ ใบย่อยมี 1-4 คู่ ออกตรงข้ามกันที่ปลายสุดของช่อใบ มักเป็นใบเดี่ยวๆ โคนใบมนและ มักเบี้ยว ปลายใบมนและเป็นติ่งแหลมสั้นๆ เนื้อใบหนา หลังใบเกลี้ยง ท้องใบมีขนสากๆ ทั่วไป ดอก สีขาวหรือเหลืองอ่อนออกรวมกันเป็นช่อโตๆ ตามปลายกิ่ง ช่อจะตั้งขึ้นและยาวถึง 40 ซม. โคนกลีบรองกลีบดอกเป็นถ้วย กลีบดอกเป็นหลอดส่วนช่วงบนขยายกว้าง ปลายเป็นริ้วๆ เกสรตัวผู้มี 2 คู่ สั้น 1 คู่ และยาว 1 คู่ ผล เป็นฝักรูปทรงกระบอกแต่โค้งงอเหมือนหางค่าง ขนาดฝักกว้าง 1.5-2.5 ซม. ยาว 35-70 ซม. จะมีสันเป็นเส้นตามยาวฝัก 5 สัน และมีขนสีน้ำตาลแดงทั่วไป ฝักแก่แตกตามรอยประสาน เมล็ด เมล็ดแบน มีเยื่อบางๆ ตามขอบคล้ายปีก

ทองหลาง (*Erythrina variegata* L.)

ลักษณะ : ไม้ต้น ผลัดใบ สูง 5 - 10 เมตร ตามกิ่งต้นอ่อนมีหนาม เรือนยอดเป็นพุ่มกลมโปร่ง ใบ ประกอบมี 3 ใบย่อย ใบกลางจะโตกว่า 2 ใบข้าง เส้นกลางใบและเส้นแขนงใบสีเหลือง ดอก รูปดอกถั่วสีแดงเข้ม ออกรวมกันเป็นช่อยาวประมาณ 30 - 40 เซนติเมตร ผลเป็นฝักยาว 15 - 30 เซนติเมตร



รูปที่ 2.4 แสดงลักษณะใบพืชที่นำมาใช้ในการศึกษา 1. เต็ง (*Shorea obtusa* Wall.) 2. รัง (*Shorea siamensis* Miq.) 3. กระโดน (*Careya sphaerica* Roxb.) 4. ยอป่า (*Morinda elliptica* Ridl.) 5. กระท่อม (*Anthocephalus chinensis* Lamk.) 6. สมอไทย (*Terminalia Chebula* Retz.) 7. ปอลาย (*Grewia eriocarpa* Juss.) 8. แค (*Markhamia stipulate* Wall.) 9. ทองหลาง (*Erythrina variegata* L.)

2.8 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตจากราเอนโดไฟต์

การเพิ่มขึ้นของปัญหาเกี่ยวกับสุขภาพในปัจจุบันไม่ว่าจะเป็นมะเร็งชนิดต่างๆ ปัญหาการดื้อยาของจุลินทรีย์ทั้งหลาย เช่น แบคทีเรีย รา โปรโตซัว และไวรัส ทั้งหลายเหล่านี้ ล้วนแต่ทำให้การศึกษาค้นคว้าในปัจจุบันมุ่งเน้นในการหาตัวยาหรือสารเคมีใหม่ๆ ที่จะมีฤทธิ์ในการต่อต้านปัญหาเกี่ยวกับสุขภาพต่างๆดังที่กล่าวมา

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bioactive Compounds) คือ สารจากสิ่งมีชีวิตตามธรรมชาติที่มีผลต่อสิ่งมีชีวิตทั้งคน สัตว์ และพืช สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีต้องเป็นสารที่มีผลจำเพาะเจาะจง เช่น มีฤทธิ์จำเพาะต่อเซลล์ของมะเร็งเต้านม มีฤทธิ์จำเพาะต่อเชื้อวัณโรค เป็นต้น และสารนั้นจะต้องไม่มีผลทางลบต่อร่างกาย หรือมีผลข้างเคียงน้อยมาก เพราะเมื่อสารนั้นถูกนำมาแปรรูปให้เป็นส่วนประกอบของยา ย่อมไม่ต้องการให้ยาามีผลกับส่วนที่ดีของร่างกาย ยกเว้น เชื้อโรค หรือ ส่วนเกิน (มะเร็ง) ที่เราต้องการขจัดเท่านั้น สารใดก็ตามถ้ามีผลข้างเคียงที่ไม่ต้องการ ก็จะต้องจัดสารนั้นให้อยู่ในพวกสารพิษ (toxic substance) จากงานวิจัยทั้งหลายพบว่าราเอนโดไฟต์สามารถที่จะเป็นแหล่งที่ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้เช่นกัน

ธรรมชาติของราเอนโดไฟต์จะอาศัยอยู่ในช่องว่างระหว่างเซลล์ของพืชที่อาศัย ซึ่งในการอยู่อาศัยภายในนั้นราเอนโดไฟต์จำเป็นต้องปรับตัวในการดำรงชีวิต ซึ่งในกระบวนการปรับตัวนั้นราเอนโดไฟต์จะสร้างสารบางอย่างออกมาเพื่อให้อยู่รอด (Redall และคณะ, 2002) ซึ่งสารที่สร้างออกมานั้นสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างมากมายเพื่อใช้ในทางการแพทย์ เกษตรกรรม และอุตสาหกรรม

Schutz และคณะ (2001) ได้บันทึกเกี่ยวกับการสร้างสารทุติยภูมิของจุลินทรีย์ว่ามีลักษณะเฉพาะที่เหมือนกับสิ่งแวดล้อมนั้นๆ และสามารถอยู่ในสภาพแวดล้อมที่เหมือนกันได้เป็นอย่างดี เมื่อมีการสำรวจและศึกษาอย่างละเอียดจะเห็นได้ว่า สภาพแวดล้อมที่จุลินทรีย์อาศัยอยู่มีผลต่อการผลิตสารทุติยภูมิ ซึ่งบนโลกนี้มีระบบนิเวศมากมาย คาดว่าในบริเวณที่มีพรรณพืชมากก็จะมีจำนวนราเอนโดไฟต์มากเช่นกัน และราเอนโดไฟต์อาจจะมีวิวัฒนาการตามเหมือนกับพรรณพืชท้องถิ่นแต่ละชนิด

ราเอนโดไฟต์แต่ละชนิดจะมีลักษณะเฉพาะที่แตกต่างกันเมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมที่ต่างกัน ดังนั้นราเอนโดไฟต์สามารถที่จะสร้างสารบางชนิดที่เป็นปัจจัยสำคัญต่อการเจริญเติบโตของพืชที่อาศัย (Pugh และคณะ, 1972; Bacon และคณะ, 1991) และสามารถที่จะสร้างสารเพื่อป้องกันการรุกรานจากศัตรูพืชเช่น แมลง (Larry และคณะ, 1992) จุลินทรีย์ (Fisher และคณะ, 1984; 1986)

Schutz และคณะ (2001) ยังพบว่าราเอนโดไฟต์สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ได้มากกว่าราเอพิไฟต์และราที่แยกได้จากดิน โดยพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ที่ผลิตจากราเอนโดไฟต์ 51 เปอร์เซ็นต์ ผลิตจากราที่แยกได้จากดิน 38 เปอร์เซ็นต์

Bill และคณะ (2002) ได้อธิบายถึงความแตกต่างของสารทุติยภูมิจากเอนโดไฟต์ระหว่างในบริเวณป่าเขตอบอุ่นกับบริเวณป่าเขตร้อนชื้น เมื่อเปรียบเทียบจำนวนสารทุติยภูมิที่สกัดได้จาก

ราเอนโดไฟต์จากป่าทั้ง 2 เขต พบว่าสารทุติยภูมิที่สกัดได้จากราเอนโดไฟต์ในบริเวณป่าเขตร้อน ซึ่งมีการออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ดีกว่าสารทุติยภูมิที่สกัดได้จากราเอนโดไฟต์ในบริเวณป่าเขตอบอุ่น นอกจากนี้ราเอนโดไฟต์ในบริเวณเขตร้อนยังมีจำนวนมากกว่าราเอนโดไฟต์ในบริเวณป่าเขตอบอุ่น ซึ่งทำให้มีโอกาสในการพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและราเอนโดไฟต์ชนิดใหม่มีมากขึ้น

ราเอนโดไฟต์มีความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลากหลายกลุ่มมาก เช่น alkaloids, peptides, steroids, terpenoids, isocoumarins, quinones, phenylpropanoids และ lignans, phenols และ phenolic acids, aliphatic compounds ซึ่งในปัจจุบันสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพดังที่กล่าวมานี้ได้นำมาใช้ประโยชน์ในทุกๆด้าน และสามารถที่จะยืนยันได้ว่าราเอนโดไฟต์เป็นแหล่งผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญแหล่งหนึ่ง (Tan and Zou, 2001)

2.8.1 สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์

สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ (Antibiotic) คือ สารที่มีมวลโมเลกุลต่ำผลิตจากจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งๆ มีฤทธิ์ในการต่อต้านหรือยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ (Demain, 1981) เป็นที่รับรู้ว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอนโดไฟต์สามารถที่จะยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆไม่ว่าจะเป็นแบคทีเรีย รา ไวรัส โปรโตซัว

Horn และคณะ (1995) ศึกษาราเอนโดไฟต์ *Phomopsis* sp. จาก *Salix gracilostyla* var. *melanostachys* สามารถผลิตสาร Phomopsichalasin ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Bacillus subtilis*, *Salmonella gallinarum*, *Staphylococcus aureus* และ *Candida tropicalis*

Munday-Finch และคณะ (1998) ศึกษาราเอนโดไฟต์ *Neotyphodium lolii* จาก *Lolium perenne* สามารถผลิต Lolicine A และ B มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์หลายชนิด

Cryptosporiopsis quercina เป็นราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากไม้เนื้อแข็งในแถบยุโรป โดยแยกได้จาก *Tripterigeum wilfordii* ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรในแถบนั้น โดย *Cryptosporiopsis quercina* มีฤทธิ์ในการต่อต้านราก่อโรคเช่น *Candida albican* และ *Trichophyton* spp. โดยผลิตสารออกมาชื่อว่า Crytocandin A (Strobel และคณะ, 1999)

Brandy และคณะ (2000) ศึกษาราเอนโดไฟต์ *Fusarium* sp. จากต้น *Selaginella pallescens* ซึ่งสามารถผลิตสาร CR377 ซึ่งเป็นสารกลุ่ม pentaketide ชนิดใหม่ ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Candida albicans*

Lu และคณะ (2000) ศึกษาราเอนโดไฟต์ *Collectotrichum gloeosporioides* จากต้น *Artemisia annua* ผลิตสารในกลุ่ม ergosterol 7 ชนิด ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Candida albicans* และ *Aspergillus niger*

Harper และคณะ (2003) ศึกษาราเอนโดไฟต์ *Pestalotiopsis microspora* จากต้น *Terminalia morobensis* ซึ่งสามารถผลิตสาร Pestacin ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์และยังมีฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระ

Weber และคณะ (2004) ศึกษาราเอนโดไฟต์ *Phomopsis* sp. จากต้น *Erythrina cristagalli* สามารถผลิตสาร phomol ซึ่งเป็นสารปฏิชีวนะชนิดใหม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียและราหลายชนิด

2.8.2 สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง

ตั้งแต่มีการค้นพบสาร Taxol ที่ผลิตโดยราเอนโดไฟต์ *Pestalotiopsis microspora* จากต้น Himalayan yew (*Taxus wallichiana*) (Strobel และคณะ, 1996) ทำให้ทราบว่าราเอนโดไฟต์สามารถเป็นแหล่งผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญแหล่งหนึ่ง ปัจจุบันพบว่าราเอนโดไฟต์สามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง จึงได้มีการศึกษาเกี่ยวกับราเอนโดไฟต์เพื่อจะหาราเอนโดไฟต์ที่มีความสามารถในการสร้างสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์

Stierle และคณะ (1995) ศึกษาราเอนโดไฟต์ *Taxomyces andreanae* จากต้น *Taxus brevifolia* และสามารถสกัดสาร taxol ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง

Lee และคณะ (1996) ศึกษาราเอนโดไฟต์ *Pestalotiopsis microspora* จากต้น *Torreya taxifolia* ซึ่งสามารถผลิตสาร Torreyanic acid พบว่าสารดังกล่าวมีฤทธิ์ในการทำลายเซลล์มะเร็งหลายชนิด

Strobel และคณะ (1997) พบว่า *Acremonium* sp. จากต้น European yew (*Taxus baccata*) สามารถสร้างสารกลุ่ม Leucino statins ซึ่งเป็นเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง

Jiao และคณะ (2006) แยกสาร Chaetominine ซึ่งเป็นสารกลุ่ม alkaloid ได้จากราเอนโดไฟต์ *Chaetomium* sp. IFB-E015 จากต้น *Adenophora axilliflora* ซึ่งสาร Chaetominine ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวและเซลล์มะเร็งลำไส้ได้

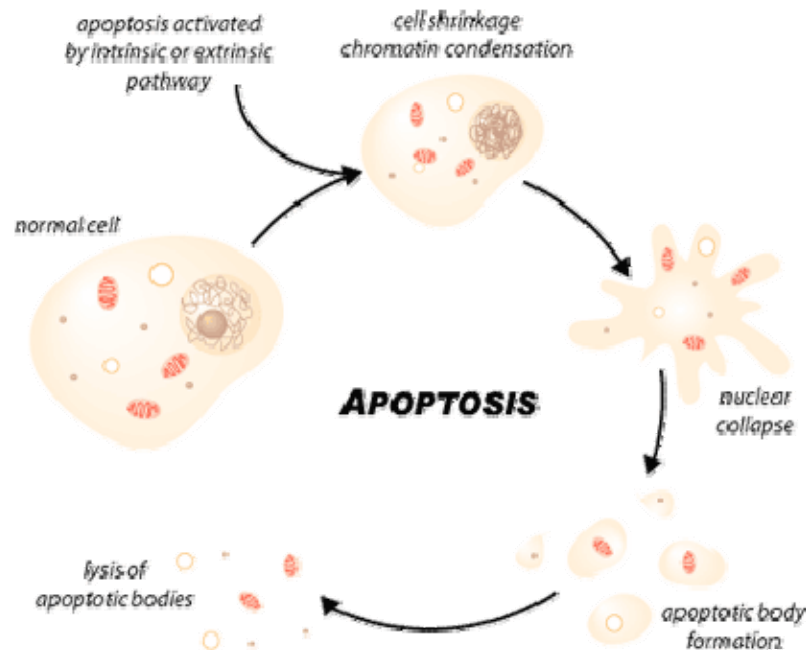
Maloney และคณะ (2006) พบสาร Phaeosphoramides A และ B ซึ่งผลิตโดยราเอนโดไฟต์ *Phaeosphaeria avenaria* โดยสาร Phaeosphoramide A จะไปทำการยับยั้งการส่งสัญญาณของเซลล์ทำให้ควบคุมอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ซึ่งสามารถใช้ในการบำบัดโรคมะเร็ง

Wang และคณะ (2002) ได้รายงานพบว่า brefeldin A ที่สร้างโดย *Paecilomyces sp.* และ *Aspergillus clavatus* ซึ่งแยกได้จากต้น *Taxus mairei* และ *Torreya grandis* มีฤทธิ์ในการยับยั้งมะเร็งหลายชนิด

2.8.3. การตายของเซลล์แบบอะพอพอโตซิส (Apoptosis)

ลักษณะของอะพอพอโตซิส และเนโครซิส

ในปัจจุบันการตายของเซลล์เชื่อว่าเกิดได้สองวิธีคือ วิธีแรกคือ “อะพอพอโตซิส”(apoptosis) ซึ่งเป็นขบวนการที่เซลล์ทำลายตัวเองโดยการควบคุมยีนที่เกี่ยวข้อง เพื่อควบคุมความสมดุลของเซลล์ภายในร่างกาย ส่วนการตายของเซลล์แบบที่สองเรียกว่า “เนโครซิส”(necrosis) เกิดขึ้นจากอุบัติเหตุบางอย่างที่ทำให้เกิดอันตรายต่อเซลล์และสิ่งแวดล้อมของเซลล์อย่างรุนแรงจนเซลล์เน่าสลายไป อย่างไรก็ตามการตายทั้งสองแบบนี้ ทราบจากการเฝ้ามองดูการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น (morphological description) แต่ยังมีรายละเอียดลึกลงไปอีกมาก การตายของเซลล์แบบอะพอพอโตซิสมีลักษณะรูปร่างที่แตกต่างจากการเน่าสลายของเซลล์แบบเนโครซิสนั้นมีขั้นตอนอยู่หลายขั้นตอน โดยที่ระยะเริ่มต้นของ apoptosis bodies ซึ่งจะถูกกำจัดโดย Phagocytes ซึ่งลักษณะเหล่านี้จะแตกต่างจากการเนโครซิสของเซลล์อย่างสิ้นเชิง ที่เมื่อเซลล์ได้รับความบาดเจ็บอย่างรุนแรงจนเน่าตาย จะเกิดการจับกลุ่มของโครมาตินเกิดการรวมขององค์ประกอบต่างๆ (organelles) รวมทั้งไมโทคอนเดรียภายในเซลล์ ในที่สุดผนังเซลล์จะแตกและเซลล์สลายตัวในที่สุดดังรูป



รูปที่ 2.5 แสดงการเกิดอะพ็อบโทซิส

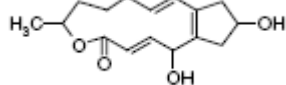
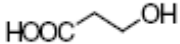
อะพ็อบโทซิสและวิธีการรักษาโรคมะเร็ง

อบโทซิสเป็นกลไกสำคัญในการทำลายเซลล์มะเร็ง และมีงานวิจัยมากมายที่มุ่งศึกษาเกี่ยวกับอะพ็อบโทซิสและการรักษาโรคมะเร็งมากมาย อย่างไรก็ตามผลของการรักษาโรคมะเร็งมีน้อยชนิดมากที่สามารถรักษาให้หายขาดได้ แม้การรักษาส่วนใหญ่เป็นการมุ่งเน้นการกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งทำลายตัวเองหรือเกิดอะพ็อบโทซิสจะได้ผลดีก็ตาม

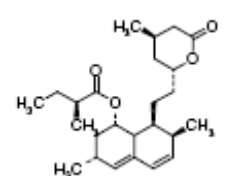
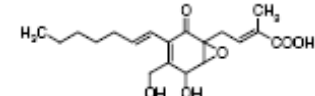
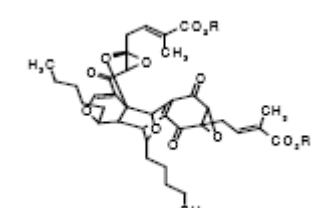
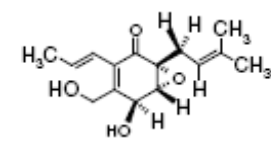
Chen และคณะ (2006) ได้รายงานว่ายีสต์ *Wickerhamiella domercqiae* สามารถสร้างสาร sphorolipids (SLs) ซึ่งชักนำให้เกิดอะพ็อบโทซิสในเซลล์มะเร็งระดับ H7402 โดยทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปริมาณ และระยะเวลาที่เซลล์ได้รับสารด้วย การตรวจสอบการตายของเซลล์มะเร็งระดับสามารถตรวจดูได้จาก การบวมของเซลล์ (blebbing) , การเปลี่ยนแปลงของเยื่อหุ้มเซลล์เช่นการเหี่ยวของเซลล์, 1 นิวเคลียสแตกเป็นชิ้นส่วน, 2 โครมาตินหนาตัวขึ้น, และ 3 ดีเอ็นเอแตกเป็นท่อน

McKillop และ Schrum (2004) ได้รายงานว่ายีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ได้ผลิตสารที่สามารถชักนำให้เกิดอะพ็อบโทซิสในเซลล์มะเร็งระดับ H7402 ได้เช่นกัน

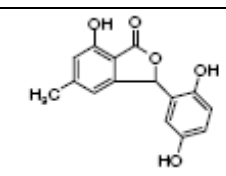
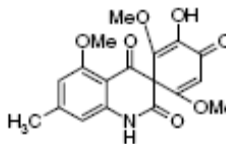
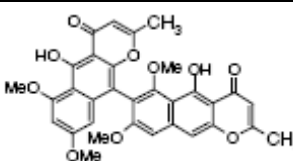
ตารางที่ 2.4 แสดงสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตจากราเอ็นโดไฟต์

Endophyte	Host Plant	Metabolite	Biological activity	Structure
<i>Phoma medicaginis</i>	<i>Medicago sativa</i>	BrefeldineA	Antibiotic activity, initiation of apoptosis in cancer cells	
<i>Phomopsis phaseoli</i>	<i>Betula pendula</i>	3-hydroxypropionic acid	Nematicidal activity Against <i>Meloidogyne</i> <i>incognita</i> , <i>Caenorhabditis</i> <i>elegans</i>	
<i>Phomopsis spp.</i>	<i>Erythrina cristagalli</i>	Phomol	Antifungal, antibacterial antiinflammatory and weak cytotoxic activity	Polyketide lactone

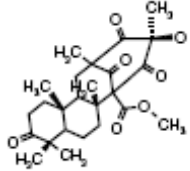
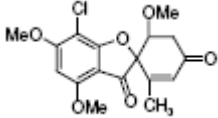
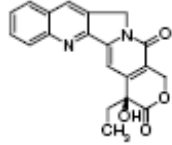
ตารางที่ 2.4 (ต่อ) แสดงสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตจากราเอนโดไฟต์

Endophyte	Host Plant	Metabolite	Biological activity	Structure
<i>Phomosis spp.</i>	<i>Erythrina cristagalli</i>	Mevinic acid	Antiinflammatory activity	
<i>Pestalotiopsis microspora</i>	<i>Torreya taxifolia</i>	Ambuic acid	Antifungal agent	
<i>Pestalotiopsis microspora</i>	<i>Torreya taxifolia</i>	Torreyanic acid	Selectively cytotoxic activity	
<i>Petalotiopsis jesteri</i>	<i>Fragraea bodenii</i>	Jesterone Hydroxy Jesterone	Antimycotic activity against the oomycetous fungi	

ตารางที่ 2.4 (ต่อ) แสดงสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตจากราเอนโดไฟต์

Endophyte	Host Plant	Metabolite	Biological activity	Structure
<i>Pestalotiopsis microspora</i>	<i>Terminalia morobensis</i>	Isopestacin Pestacin	Antimicrobial and antioxidant effect	
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Cynodon dactylon</i>	Asperfumiod, Asperfumin Physion	Inhibit growth of <i>Candida albicans</i>	
<i>Aspergillus niger</i> IBF-E003	<i>Cynodon dactylon</i>	Rubrofusarin B, Aurasperone A	Strong coinhibitors On xantin oxidase, colon cancer cell and some microbial	

ตารางที่ 2.4 (ต่อ) แสดงสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตจากราเอนโดไฟต์

Endophyte	Host Plant	Metabolite	Biological activity	Structure
<i>Penicillium</i> sp.	<i>Melia azedarach</i>	Preaustinod A, B	Exhibit moderate bacteriostatic effect on <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Bacillus</i> sp.	
<i>Xylaria</i> sp. F0010	<i>Abies holophylla</i>	Griseofulvin, Dechlorogriseofulvin	Antifungal antibiotic	
Fungal endophytic isolate	<i>Nothapodytes foetida</i> from	Camptothecin	Anticancer activity	

การศึกษาศาสตร์ออกฤทธิ์ทางชีวภาพของราเอนโดไฟต์ในประเทศไทย ผู้ทำการศึกษาล้วนใหญ่มักเลือกพืชสมุนไพรเป็นหลักเช่นเดียวกับรายงานจากต่างประเทศ เนื่องจากคาดว่าราเอนโดไฟต์ที่อาศัยอยู่ในพืชดังกล่าวจะสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้เช่นเดียวกับพืชที่อาศัยอยู่ ซึ่งรายงานเกี่ยวกับการศึกษาศาสตร์ออกฤทธิ์ทางชีวภาพของราเอนโดไฟต์ในประเทศไทยมีหลายฉบับแล้ว เช่น

Chinworarangi และคณะ (2001) ได้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่จาก *Halorosellinia oceanonica* ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อมาลาเรีย

Wiyakrutta และคณะ (2003) ได้ศึกษาศาสตร์ออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่แยกได้จากราเอนโดไฟต์จากพืชสมุนไพรซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อมาลาเรีย (*Plasmodium falciparum*) เชื้อวัณโรค (*Mycobacterium tuberculosis*) ไวรัส (Hepes simplex virus type 1) และเซลล์ไลน์ของมะเร็งเยื่อช่องปาก (Human oral epidermoid carcinoma cell)

Phothita และคณะ (2003) ได้แยกเชื้อรา *Guignardia cocoicola* และ *Fusarium* sp. ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Colletotrichum musae* และ *Fusarium* sp. ซึ่งเป็นเชื้อราก่อโรคโรคแอนแทรกคโนสในกล้วย

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1) อุปกรณ์

1. ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (incubator) Memmert รุ่น BE600 บริษัท Jebsen and Jessen
2. ตู้ควบคุมอุณหภูมิภายใต้บรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂ incubator) Hepa Class100 รุ่น 311 บริษัท Thermo electron corporation
3. ตู้ถ่ายเชื้อ (laminar flow) CLEAN รุ่น H1 บริษัท Lab Service Ltd, Part.
4. หม้อนึ่งความดัน (autoclave) TOMY รุ่น SS-325 บริษัท Tomy Seiko Co., Ltd. Tokyo, Japan
5. ตู้อบความร้อนแห้ง (hot air oven) Memmert รุ่น UE600 บริษัท Jebsen and Jessen
6. ตู้อบแห้งภายใต้สุญญากาศ (vacuum oven) Hotpack บริษัท Hotpact Corporation, USA.
7. เครื่องชั่งน้ำหนัก (digital scale) รุ่น PB3002 บริษัท Mettler Toledo
8. กล้องจุลทรรศน์ (microscope) Olympus รุ่น BX51 บริษัท Olympus Optical Co., Ltd. Japan
9. กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ (inverted microscope) Olympus รุ่น CK2 บริษัท Olympus Optical Co., Ltd. Japan
10. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope, SEM) JEOL รุ่น JSM-5410 LV, Japan
11. เครื่องระเหยแห้งสุญญากาศแบบหมุน (rotary vacuum evaporator) Eyela รุ่น N-1000 บริษัท Tokyo Rikakikai Co., Ltd. Japan
12. เครื่องระเหยน้ำที่อุณหภูมิต่ำ (lyophilizer) รุ่น FD-1 ยี่ห้อ EYELA บริษัท Tokyo Rikakikai Co., Ltd. Japan
13. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) Hettich รุ่น Rotofix32 บริษัท Becthai, Germany
14. เครื่องวัดค่าความเป็นกรดเบส (pH meter) รุ่น S20-K ยี่ห้อ Mettler Toledo
15. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น WB-710M บริษัท Optima, Japan

16. ฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemocytometer) ขนาด 0.0025 mm^2 ยี่ห้อ Loptik Labor
17. เครื่องอ่านค่าความดูดกลืนแสง (microplate reader) รุ่น ELX800 บริษัท Bio-Tek Instruments, Inc.
18. เครื่องพีซีอาร์ (Authorized thermal cycler) Takara รุ่น TP600 บริษัท Takara Bio, Inc. Japan
19. เครื่อง Electrophoresis chamber set รุ่น Mupid-ex บริษัท Advance
20. เครื่องถ่ายภาพเจล (Gel Doc) ยี่ห้อ Vilber Lourmat
21. เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (micro centrifuge) รุ่น CM-610T บริษัท Hsingtai
22. เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (micro refrigerated centrifuge) Kubota รุ่น 3700 บริษัท Kubota Corporation, Tokyo Japan
23. เครื่องไมโครเวฟ (microwave oven) Turbora รุ่น MW-2020
24. เครื่องแปลงไฟ (Power supply) My Power300 รุ่น AE-8130 บริษัท ATTO
25. ตู้เย็น $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (refrigerator) Mitsubishi รุ่น Tiara บริษัท Mitsubishi electric
26. ตู้เย็น $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ยี่ห้อ Sharp
27. ตู้เย็น $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ รุ่น 8620 บริษัท Thermo Electron Corporation
28. เครื่อง UV-Transilluminator รุ่น TM-10E บริษัท UVP
29. เครื่อง Vortex mixer รุ่น VX-100 บริษัท Labnet International, Inc.
30. โกร่งบดยา (motar)
31. ไมโครปิเปต (automatic adjustable micropipette) บริษัท Gilson P2 (0.1-2 ไมโครลิตร), P10 (0.5-10 ไมโครลิตร), P20 (5-20 ไมโครลิตร), P200 (20-200 ไมโครลิตร), P1000 (0.1- 1 มิลลิลิตร)
32. ปิเปตต์ทิป (pipette tip) บริษัท Axygen Scientific, Inc. USA
33. หลอดไมโครเซนตริฟิวส์ (micro centrifuge tubes) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร บริษัท Axygen Scientific, Inc. USA
34. หลอดพีซีอาร์ (PCR tubes) ขนาด 200 ไมโครลิตร บริษัท Axygen Scientific, Inc. USA
35. พาราฟิล์ม
36. ปีกเกอร์ (beaker)
37. ขวดแก้ว (bottle)
38. กระบอกตวง (cylinder)

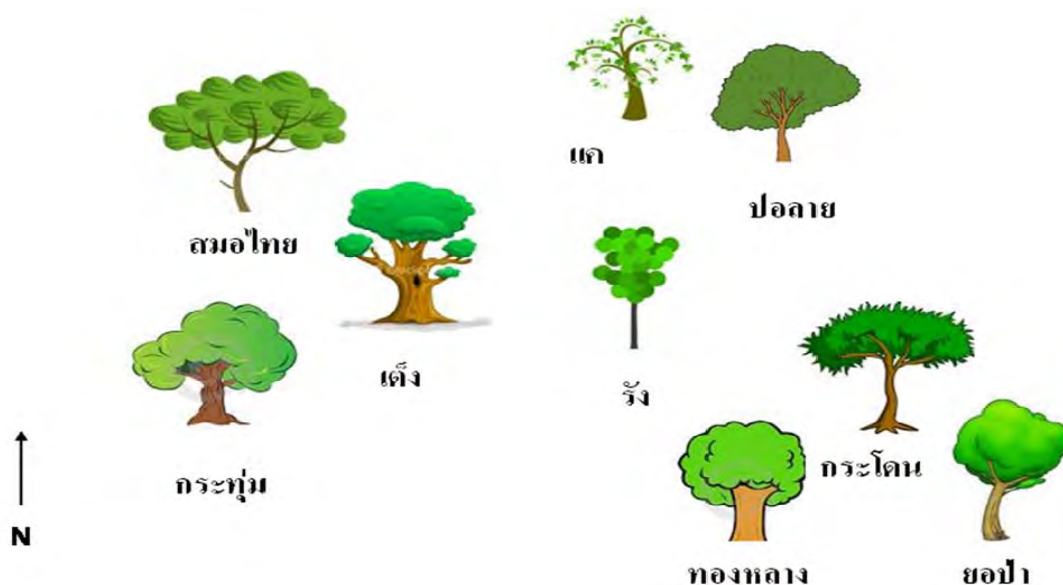
39. ขดลวด (spring coil)
40. ลูป (loop)
41. เข็มเย็บเข็ม (needle)
42. ที่เจาะอาหารวุ้น (cork borer)
43. จานเลี้ยงเชื้อพลาสติก (petridish)
44. จานเลี้ยงเซลล์แบบ 96 หลุม (96 wells plate)
45. จานเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม (24 wells plate)
46. ขวดเลี้ยงเซลล์ ยี่ห้อ Corning บริษัท Corning Incorporated, USA
47. หลอดเก็บเซลล์
48. หลอดเซนต์ปีวีสขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร ยี่ห้อ Corning บริษัท Corning Incorporated, USA
49. ปิเปตแก้ว ขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร
50. เครื่องดูดจากปิเปต (pipette aid) ยี่ห้อ Drummond
51. หัวกรองอาหารเลี้ยงเซลล์ ขนาด 0.22 ไมโครเมตร ยี่ห้อ Corning บริษัท Corning Incorporated, USA
52. เครื่องกวนโดยใช้แม่เหล็ก (magnetic stirrer) ยี่ห้อ Clifton Ceraplate
53. ถังไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen tank) รุ่น 34 HC ยี่ห้อ Taylor-Wharton Cryogenics บริษัท Harsco Corporation, USA
54. เครื่อง DNA sequencing รุ่น 3100XL ยี่ห้อ ABI บริษัท Applied Biosystem Incorporated

3.2) สารเคมี

1. Agar
2. Bacto peptone บริษัท HIMEDIA
3. Glucose
4. Malt extract บริษัท HIMEDIA
5. Magnesium chloride ($MgCl_2$)
6. DMSO (Dimethylsulfoxide) steried บริษัท Sigma, USA
7. Fetal Bovine Serum (FBS) ยี่ห้อ Hyclone บริษัท PERBIO

3.3) การเก็บตัวอย่างใบพืชจากป่าเต็งรัง

เก็บตัวอย่างพืชจากป่าเต็งรัง จังหวัดตาก โดยพืชที่ใช้ในการทำวิจัยมี 9 ชนิดได้แก่ เต็ง รัง ยอป่า กระโดน สมอไทย ทองหลาง กระทุ่มม ปอelay และแควหางค่างโดยเก็บตัวอย่าง 2 ถาดคือ ถาด ฝนช่วงเดือนสิงหาคมพ.ศ. 2550 และถาดเลี้ยงช่วงเดือนมกราคม พ.ศ. 2551 ตัวอย่างที่เก็บต้องเป็นใบที่สมบูรณ์ปราศจากอาการของโรคพืช เก็บตัวอย่างพืชในถุงพลาสติกที่ปิดมิดชิด นำเข้าสู่เย็นที่อุณหภูมิต่ำ 4 องศาเซลเซียส ตัวอย่างที่จะนำมาใช้ในการทดลองต้องเก็บจากต้นมาไม่นานกว่า 48 ชั่วโมง



รูปที่ 3.1 แสดงตำแหน่งในการเก็บตัวอย่าง

3.4) การแยกราเอ็นโดไฟต์จากใบพืช

การแยกราเอ็นโดไฟต์ใช้เทคนิคฆ่าเชื้อที่ผิว (surface sterilization) (Blodett และคณะ, 2000) โดยนำตัวอย่างที่สมบูรณ์ไม่เกิดโรคมาล้างน้ำทำความสะอาด ตัดเป็นชิ้นเล็กๆขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตรในบริเวณกลางใบ โคนใบ และปลายใบ ตัวอย่างละ 20 ตำแหน่ง นำมาฆ่าเชื้อที่ผิวโดยแช่ในเอทานอลที่มีความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที ตามด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ที่มีความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที และแช่ในเอทานอลความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์อีกครั้ง เป็นเวลา 30 วินาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วหลาย

ครั้ง แล้วซัปให้แห้งบนกระดาษกรองที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จากนั้นนำไปวางบน Potato Dextrose gar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิห้อง ทำการถ่ายเชื้อ กระทั่งได้เชื้อบริสุทธิ์โดยทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของราที่แยกได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอโฟโตเมตริก

3.5) จำแนกชนิดของราเอนโดไฟต์

สังเกตลักษณะการเจริญของราเอนโดไฟต์บนอาหาร Potato Dextrose gar (PDA) ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยใช้เทคนิค slide culture โดยวิธีของ Bennett และ Hunter (1987) เพื่อศึกษาลักษณะของเส้นใย ลักษณะของสปอร์ตลอดจน การจัดเรียงตัวของสปอร์ จำนวนสปอร์ ลักษณะผิวของสปอร์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อจัดจำแนกชนิดของราเอนโดไฟต์ในระดับจิ้นัส (genus)

3.6) ศึกษาความหลากหลายของราเอนโดไฟต์

ศึกษาความหลากหลายของราเอนโดไฟต์โดยวิเคราะห์ความถี่ของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากตัวอย่างใบพืชแต่ละชนิด (Colonization Frequency) วิเคราะห์จำนวนราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากตัวอย่างพืชทั้งหมด และวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS (SPSS for Windows version 15, SPSS Inc., Chicago, USA) เพื่อเปรียบเทียบความถี่ของเชื้อราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากตัวอย่างใบพืชต่างชนิดกัน และต่างฤดูกาล

3.7) การเก็บรักษาราเอนโดไฟต์

ทำการเลี้ยงราเอนโดไฟต์ที่บริสุทธิ์ 1-2 สัปดาห์บนอาหารแข็ง จากนั้นทำการเจาะชิ้นส่วนของราเอนโดไฟต์ด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 5 มิลลิเมตร นำชิ้นส่วนของราเอนโดไฟต์ประมาณ 4-5 ชิ้น ไปใส่ในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เก็บที่อุณหภูมิห้อง

3.8) การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์จากน้ำเลี้ยงเชื้อของรา เอนโดไฟต์

3.8.1) จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบการสร้างสารปฏิชีวนะ ได้แก่

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC9027
<i>Escherichia coli</i>	ATCC25922
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC6633
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC25923
<i>Candida albicans</i>	ATCC 70014

3.8.2) อาหารเลี้ยงเชื้อ

Nutrient agar (NA) (ภาคผนวก ก หมายเลข 11)	สำหรับเลี้ยงแบคทีเรีย
Malt extract agar (MEA) (ภาคผนวก ก หมายเลข 13)	สำหรับเลี้ยงยีสต์

3.8.3) การเตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ

การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียทดสอบ

นำแบคทีเรียทดสอบชนิดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อแยกให้เป็นโคโลนีเดี่ยว ใช้ลูปเขี่ยโคโลนีเดี่ยว 4 – 6 โคโลนี ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Nutrient Broth (NB) 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อจะขุ่น ปรับความขุ่นของแบคทีเรียทดสอบโดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ โดยให้มีความขุ่นเทียบเท่า 0.5 McFarland Standard (ภาคผนวก ก หมายเลข 32) จะได้ปริมาณเชื้อประมาณ 10^8 CFU ต่อ มิลลิลิตร

การเตรียมหัวเชื้อยีสต์ทดสอบ

นำยีสต์ทดสอบชนิดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Sabouraud agar (ภาคผนวก ก หมายเลข 3) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อแยกให้เป็นโคโลนีเดี่ยว ใช้ลูปเขี่ยโคโลนีเดี่ยว 4 – 6 โคโลนี ละลายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ปรับความขุ่นของยีสต์ทดสอบโดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ โดยให้มีความขุ่นเทียบเท่า 0.5 McFarland Standard จะได้เซลล์ประมาณ $1 \times 10^6 - 3 \times 10^6$ CFU ต่อ มิลลิลิตร

3.8.4) ทดสอบความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ของราเอนโดไฟต์ด้วยเทคนิค

Paper-Disk diffusion Method

นำส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อ (broth) ที่ได้ มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ โดยนำจุลินทรีย์ที่ทดสอบที่เตรียมไว้ ป้ายบนผิวหน้าอาหาร โดยใช้ไม้พันสำลีปราศจากเชื้อจุ่มลงในหลอดเชื้อ ป้ายลงบนผิวหน้าอาหาร nutrient Agar (สำหรับแบคทีเรียทดสอบ) malt extract Agar (สำหรับยีสต์ทดสอบ) เมื่อป้ายเชื้อทดสอบทั่วแล้ว ทิ้งไว้ 20 นาที เพื่อให้ผิวหน้าของอาหารแห้ง นำแผ่นกระดาษทดสอบขนาด 5 ตารางมิลลิเมตรจุ่มลงในน้ำเลี้ยงเชื้อวางลงบนผิวหน้าของอาหาร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรียทดสอบ ส่วนยีสต์ทดสอบบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง วัดความกว้างของบริเวณวงใสที่เกิดขึ้น (clear zone) โดยตัวควบคุมบวก ของแบคทีเรีย ได้แก่ streptomycin สำหรับยีสต์คือ nystatin ตัวควบคุมลบ คือ ตัวทำลายที่ไม่มีส่วนสกัดละลายอยู่

3.9) การทดสอบประสิทธิภาพของส่วนสกัดออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อเซลล์ของราเอนโดไฟต์

3.9.1) สกัดส่วนสกัดออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอนโดไฟต์

นำราเอนโดไฟต์ที่คัดเลือกได้มาเลี้ยงในอาหารเหลว malt extract broth (MEB) เป็นระยะเวลาประมาณ 4 สัปดาห์ที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงนำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 เพื่อแยกเส้นใยออกจากน้ำเลี้ยงเชื้อ ส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อนำมาสกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ จากนั้นนำไประเหยตัวทำลายด้วยเครื่องระเหย (rotary evaporator)

3.9.2) เซลล์ที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่

Kat0III (HTB- 103)	เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (Human gastric carcinoma)
HepG2 (HB- 8065)	เซลล์มะเร็งตับ (Human liver hepatoblastoma)
SW620 (CCL- 227)	เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (Human colorectal adenocarcinoma)
BT474 (HTB- 20)	เซลล์มะเร็งเต้านม (Human ductal carcinoma)
Jurkat (TIB- 152)	เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (Human acute T-cell leukemia)
Hela	เซลล์มะเร็งปากมดลูก (Human <u>cervical cancer</u> cells)
A375 (CRL-1619)	เซลล์มะเร็งผิวหนัง (Human malignant melanoma)
Vero	เซลล์ปกติจากไตของลิง (Kidney African green monkey cell)

ซึ่งได้รับการอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร. ธนาภัทร ปาลกะ ห้องวิจัย 403 อาคารแถบ นีละนิธิ
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.9.3) การเพาะเลี้ยงเซลล์ทดสอบ

นำเซลล์ทดสอบที่เก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลวมาทำการเพาะเลี้ยง โดยแช่หลอดเก็บ
เซลล์ในอ่างน้ำอุ่น 37 องศาเซลเซียสทันที แก้วหลอดเก็บเซลล์โดยให้รอยต่ออยู่เหนือระดับน้ำใน
อ่างน้ำอุ่น เมื่อละลาย นำเซลล์ทดสอบมาใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI1640
ที่ปราศจากซีรัมอยู่ 7 มิลลิลิตร จากนั้นปั่นเซลล์ให้ตกตะกอนด้วยความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที
เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI1640 complete
media (ภาคผนวก ข หมายเลข 2) ปริมาตร 8 มิลลิลิตร จากนั้นดูดสารละลายเซลล์ใส่ขวดเลี้ยง
เซลล์ ตรวจสอบคุณสมบัติพื้นฐานวิทยาของเซลล์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้
บรรยากาศที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% จนกว่าเซลล์จะเจริญเต็มผิวขวดเลี้ยงเซลล์

การเปลี่ยนถ่ายอาหารเลี้ยงเซลล์ของเซลล์เกาะผิว

การเปลี่ยนอาหารให้เซลล์เกาะผิว ทำโดยการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออกจน
หมด ล้างเซลล์ด้วยสารละลาย 1x PBS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วดูดออก จากนั้นเติม 0.25%
trypsin- EDTA ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศที่มี
ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 1 - 2 นาที (ขึ้นกับชนิดของเซลล์) เพื่อให้เซลล์หลุดออก
จากขวดเลี้ยงเซลล์ จากนั้นใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI1640 ที่ปราศจากซีรัม 5 มิลลิลิตรลงใน
ภาชนะเลี้ยงเซลล์เพื่อหยุดปฏิบัติการย่อยเซลล์ของ 0.25% trypsin- EDTA จากนั้นดูดเซลล์
ทั้งหมดใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์ ปั่นเซลล์ให้ตกตะกอน ด้วยความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา
5 นาที นำส่วนอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI1640 complete media
ปริมาตร 8 มิลลิลิตร จากนั้นดูดสารละลายเซลล์ใส่ขวดเลี้ยงเซลล์ ตรวจสอบคุณสมบัติพื้นฐานวิทยาของ
เซลล์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5%

การเปลี่ยนถ่ายอาหารเลี้ยงเซลล์ของเซลล์แขวนลอย (Jurkat)

ใช้ปิเปตต์แก้วดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ขึ้นลงเบาๆ 2-3 ครั้ง เพื่อให้เซลล์ที่เกาะตัวกัน
อยู่กระจายเป็นเซลล์เดี่ยวๆ จากนั้นดูดเซลล์ทั้งหมดใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์ ปั่นเซลล์ให้ตกตะกอน
ด้วยความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง แล้วเติมอาหาร
เลี้ยงเซลล์ RPMI1640 complete media ปริมาตร 8 มิลลิลิตร จากนั้นดูดสารละลายเซลล์ใส่ขวด
เลี้ยงเซลล์ ตรวจสอบคุณสมบัติพื้นฐานวิทยาของเซลล์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้
บรรยากาศที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5%

การเก็บรักษาเซลล์เพาะเลี้ยงแบบถาวรในไนโตรเจนเหลว

นำหลอดเซลล์เพาะเลี้ยงที่ได้จากการปั่นในข้อ 3.9.2.1 และ 3.9.2.2 มาเทส่วนใส่ทิ้ง ใช้นิวเคลอะหลอดเซนติฟิวจ์เบาๆ เพื่อให้เซลล์กระจายตัว เติมหอาหารสำหรับเก็บเซลล์แช่แข็ง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ดูดขึ้นลงเบาๆ แล้วดูดใส่หลอดเก็บเซลล์แช่แข็ง (cryotube) เก็บในตู้เย็น -80 องศาเซลเซียสนาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเก็บในถังไนโตรเจนเหลว

3.9.4) การนับเซลล์ทดสอบที่มีชีวิต โดยย้อมสี trypan blue

ในกรณีที่จะนำเซลล์ไปใช้ในการทดสอบในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 96 หลุม นำหลอดเซลล์เพาะเลี้ยงที่ได้จากการปั่นในข้อ 3.9.2.1 และ 3.9.2.2 มาเทส่วนใส่ทิ้ง ใช้นิวเคลอะหลอดเซนติฟิวจ์เบาๆ เพื่อให้เซลล์กระจายตัว แล้วเติมหอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI1640 กระจายเซลล์ให้เข้ากันทั่ว นับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต โดยย้อมเซลล์ด้วยสี trypan blue และนับเซลล์ด้วยตัววัดฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemocytometer) เพื่อให้ได้จำนวนเซลล์ $2 - 5 \times 10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยคำนวณตามสูตรดังนี้

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

จากนั้นทำการดูดสารละลายเซลล์ใส่ลงในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 96 หลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร ซึ่งจะมีจำนวนเซลล์ $2 - 5 \times 10^4$ เซลล์ต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 1 วัน เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

3.9.4) การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งโดยวิธี MTT method (Palaga และคณะ, 1996)

ดูดส่วนสกัดจากราเอนโดไฟต์จากข้อ 3.8.1 ปริมาตร 2 ไมโครลิตรโดยมีความเข้มข้นสุดท้าย 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ลงในหลุมเลี้ยงเซลล์ เพื่อทดสอบฤทธิ์การต่อต้านเซลล์มะเร็ง โดยใช้ 100% DMSO เป็นชุดควบคุมลบ และหลุมที่ไม่มีเซลล์เป็นชุดควบคุมบวก บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 18- 24 ชั่วโมง จากนั้นย้อมเซลล์ด้วยสารละลาย MTT (3-(4,5- dimethylthiazolyl-2-) 2,5- diphenylterazolium bromide) (ภาคผนวก ข หมายเลข 3) หลุมละ 10 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 2- 4 ชั่วโมง ดูดสารละลาย MTT และอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากหลุม และเติม 0.004N HCl ใน isopropanol (ภาคผนวก ข หมายเลข 5)

หลุมละ 100 ไมโครลิตร ดูดขึ้นลงให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

3.9.5) การทดสอบการกระตุ้นให้เซลล์ตายแบบอะพ็อพโทซิส (Apoptosis test)

เลี้ยงเซลล์ให้ได้ปริมาณเซลล์ 1×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ดูดสารละลายเซลล์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์ขนาดเล็กที่มีแผ่น cover slip ปราบจากเชื้อวางอยู่ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ตรวจสอบการเกาะของเซลล์บนแผ่น cover slip จากนั้นหยดสารที่จะทดสอบลงบน cover slip ใช้ยา etoposide ซึ่งเป็นยาที่กระตุ้นการอะพ็อพโทซิสเป็นชุดควบคุมบวก บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เซลล์จะเจริญโดยเกาะกับแผ่น cover slip จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก และเติมสารละลาย 1% glutaraldehyde ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในจานเลี้ยงเซลล์ บ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นดูด glutaraldehyde ทิ้ง และล้างแผ่น cover slip ด้วยสารละลาย 1x PBS ปริมาตร 30 ไมโครลิตร นำเซลล์ที่เกาะอยู่กับแผ่น cover slip ตรวจสอบการตายแบบ อะพ็อพโทซิส โดยการหยดสารละลาย 1x PBS ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงบนแผ่นสไลด์ เติมน้ำสี Hoechst 33342 ความเข้มข้น 1 mM ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ใช้ปากคีบ คีบแผ่น cover slip ที่มีเซลล์เกาะอยู่วางคว่ำลงบนแผ่นสไลด์ ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 5 นาที เคลือบขอบ cover slip ยาทาเล็บ นำไปเซลล์ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนซ์ เซลล์ที่ตายแบบ อะพ็อพโทซิสจะมีการหดตัวของเซลล์ และนิวเคลียส

3.10) การจำแนกชนิดของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้ด้วยวิธีทางอนุพันธุศาสตร์

3.10.1) การสกัดดีเอ็นเอจากราเอนโดไฟต์

ส่วนที่ 1 การล้างเซลล์ เพื่อกำจัดสารพอลิแซ็กคาไรด์

1. เลี้ยงราเอนโดไฟต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว PDB ประมาณ 3 – 5 วัน
2. นำเส้นใยประมาณ 20 – 50 มิลลิกรัม ไปบดด้วยโกร่งบดยาเพื่อให้เซลล์เข้ากันเป็นเนื้อเดียว
3. เติม washing buffer (ภาคผนวก ค หมายเลข 3) ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร ผสมกับตัวอย่างที่บด จากนั้นถ่ายลงในหลอดไมโครทิวบ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
4. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที แล้วดูดส่วนน้ำใสทิ้ง

5. ทำซ้ำข้อ 3 และ 4 ประมาณ 2 – 3 ครั้ง จนน้ำใส

ส่วนที่ 2 การทำให้เซลล์แตก (Zhou et al., 1999)

1. เติม 2X CTAB lysis buffer (ภาคผนวก ค หมายเลข 4) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ให้เข้ากับตะกอนเซลล์ บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
2. เติม chloroform : isoamylalcohol ความเข้มข้น 24 : 1 (ภาคผนวก ค หมายเลข 5) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน
3. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 8 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
4. ถ่ายลงในหลอดไมโครทิวป์ใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
5. ทำซ้ำข้อ 2 – 4 อีก 1 รอบ
6. เติม isopropanol ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ลงในส่วนน้ำใส และเก็บไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที
7. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ
8. ดูดส่วนน้ำใสทิ้ง และเติม ethanol ความเข้มข้น 70% ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เพื่อล้างตะกอนดีเอ็นเอ
9. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วเทส่วนน้ำใสทิ้ง
10. ทำให้ตะกอนแห้งโดยทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อแห้งแล้ว ละลายตะกอนด้วย TE buffer (ภาคผนวก ค หมายเลข 7) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

ส่วนที่ 3 การกำจัดอาร์เอ็นเอ

1. เติม RNase ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที
2. เติมสารละลาย PEG (ภาคผนวก ค หมายเลข 6) ปริมาตร 60 ไมโครลิตร แล้วเก็บไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที
3. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วเทส่วนน้ำใสทิ้ง
4. ล้างตะกอนโดยใช้ ethanol ความเข้มข้น 70% ปริมาตร 500 ไมโครลิตร
5. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วเท ethanol ทิ้ง

6. ทำให้ตะกอนแห้งโดยทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อแห้งแล้ว ละลายตะกอนด้วย TE buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร
7. เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

3.10.2) การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่ประมวลรหัส 16S rRNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส

ออกแบบ primer ที่ใช้ โดยอ้างอิงจาก White และคณะ (1990) ได้แก่

ITS1 TCCGTAGGTGAACCTGCGG

ITS4 TCCTCCGCTTATTGATATGC

จากนั้นทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส (Polymerase chain reaction, PCR) โดยใช้สารละลายดีเอ็นเอจากขั้นตอนที่ 3.8.1 เป็นแม่แบบ (template) ซึ่งในส่วนผสมที่ทำให้เกิดปฏิกิริยา ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

- | | |
|----------------------------|------------------------|
| 1. 10x buffer | ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร |
| 2. 2mM dNTP mix | ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร |
| 3. 25mM MgCl ₂ | ปริมาตร 2.0 ไมโครลิตร |
| 4. forward primer (20 μM) | ปริมาตร 0.25 ไมโครลิตร |
| 5. reverse primer (20 μM) | ปริมาตร 0.25 ไมโครลิตร |
| 6. Taq DNA polymerase (5U) | ปริมาตร 0.12 ไมโครลิตร |
| 7. น้ำกลั่นปลอดเชื้อ | ปริมาตร 16.3 ไมโครลิตร |
| 8. DNA template | ปริมาตร 1 ไมโครลิตร |

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสประกอบด้วยขั้นตอน ดังนี้

Initial denaturation	95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
Denaturation	95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
Annealing	53 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
Extension	72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 38 รอบ
Final extension	72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
Hold	4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้งาน

3.10.3) การตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอโดยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

ตรวจสอบยีนที่ได้จากการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยการทำให้เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เตรียมอะกาโรสเจล (ภาคผนวก ค หมายเลข 11) หลอม และเทลงในแม่พิมพ์ที่มีหวี (comb) เสียบอยู่ แล้วปล่อยให้เจลแข็งตัว ผสมสารละลายดีเอ็นเอกับสีติดตาม (loading dye) ในอัตราส่วน 5 : 2 และหยอดตัวอย่างลงในหลุมอะกาโรสเจล จากนั้นนำไปทำอิเล็กโทรโฟรีซิสใน เครื่อง Electrophoresis chamber โดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที ตรวจสอบการเรืองแสงของดีเอ็นเอโดยการย้อมด้วย Ethidium bromide (ภาคผนวก ค หมายเลข 10) ส่องภายใต้รังสี UV ตรวจสอบขนาดของยีนโดยการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp + 1.5 kb DNA ladder

3.10.4) วิเคราะห์ลำดับเบสของชิ้นส่วนยีนที่ประมวลรหัส 16S rRNA

นำผลิตภัณฑ์ของการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ 1 คู่ ได้แก่ ITS1 และ ITS4 ตามขั้นตอนที่ 3.10.2 มาวิเคราะห์ลำดับเบสของชิ้นส่วนยีนที่ประมวลรหัส 16S rRNA โดยวิธี direct sequencing โดยส่งไปวิเคราะห์ลำดับเบสที่ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ.

บทที่ 4

ผลการทดลอง และวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ผลการเก็บตัวอย่างใบพืชจากป่าเต็งรัง จังหวัดตาก

เก็บตัวอย่างพืชจากป่าเต็งรัง จังหวัดตาก โดยพืชที่ใช้ในการทำวิจัยมี 9 ชนิดได้แก่ เต็ง รัง ยอป่า กระโดน สมอไทย ทองหลาง กระพุ่ม ปอลาย และแค โดยเก็บตัวอย่าง 2 ฤดูคือ ฤดูฝนช่วงเดือนสิงหาคมพ.ศ. 2550 และฤดูแล้งช่วงเดือนมกราคม พ.ศ. 2551 ตัวอย่างที่เก็บต้องเป็นใบที่สมบูรณ์ปราศจากอาการของโรคพืช นำตัวอย่างเก็บใส่ถุงพลาสติกที่ปิดมิดชิด นำเข้าตู้เย็น ตัวอย่างที่จะนำมาใช้ในการทดลองต้องเก็บจากต้นมาไม่น้อยกว่า 48 ชั่วโมง ทำการกำหนดรหัสของพืชแต่ละชนิด ดังแสดงผลในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แสดงการกำหนดรหัสของใบพืชตัวอย่าง และขนาดโดยเฉลี่ยของใบพืชตัวอย่าง

ลำดับ	พืช	ชื่อวิทยาศาสตร์	รหัส	
			ฤดูแล้ง	ฤดูฝน
1	เต็ง	<i>Shorea obtusa</i> Wall.	DSO	WSO
2	รัง	<i>Shorea siamensis</i> Miq.	DSS	WSS
3	กระโดน	<i>Careya sphaerica</i> Roxb.	DCS	WCS
4	ยอป่า	<i>Morinda elliptica</i> Ridl.	DME	WME
5	กระพุ่ม	<i>Anthocephalus chinensis</i> Lamk.	DAC	WAC
6	สมอไทย	<i>Terminalia Chebula</i> Retz.	DTC	WTC
7	ปอลาย	<i>Grewia eriocarpa</i> Juss.	DGE	WGE
8	แค	<i>Markhamia stipulate</i> Wall.	DMS	WMS
*9	ทองหลาง	<i>Erythrina variegata</i> L.	DEV	WEV


* หมายเหตุ ตัวอย่างใบของต้นทองหลางในฤดูแล้งไม่สามารถเก็บได้เนื่องจากต้นไม่มีการผลัดใบ

4.2) การแยกราเอนโดไฟต์จากใบพืชและการจำแนกราเอนโดไฟต์







ราเอนโดไฟต์จากใบพืชตัวอย่าง 9 ชนิดจากการเก็บตัวอย่างในฤดูฝน สามารถแยกราเอนโดไฟต์ได้ทั้งสิ้น 136 ไอโซเลต สามารถนำมาจำแนกชนิดของราเอนโดไฟต์ได้โดยการสังเกตลักษณะการเจริญบนอาหาร Potato Dextrose gar (PDA) ทำการจัดกลุ่มอย่างหยาบเพื่อดูลักษณะโคโลนีและรงควัตถุที่ปรากฏอย่างหยาบตามหลักการที่อธิบายโดย Bilal (1996) นำไอโซเลตที่เป็นตัวแทนไปเพาะเลี้ยงเพื่อตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยใช้เทคนิค slide culture เพื่อศึกษาลักษณะของเส้นใย ลักษณะของสปอร์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อจัดจำแนกชนิดของราเอนโดไฟต์ในระดับสกุล (genus) ตาม Bennett และ Hunter (1987)

ราที่ยังไม่พบการสร้างสปอร์ใน 2 เดือนที่อุณหภูมิห้องจะนำไปเพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดอื่นได้แก่ oat meal agar (OM) Sabouraud dextrose agar (SDA) และ malt extract agar (MEA) ในฤดูฝนสามารถจำแนกราเอนโดไฟต์ได้เป็น 13 สกุล 21 ชนิด โดยราที่ไม่สร้างระยะสืบพันธุ์จะจัดอยู่ในกลุ่ม Mycelia sterilia โดยกลุ่มราที่พบแสดงในตารางที่ 4.2







ตารางที่ 4.2 แสดงชนิดและจำนวนของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้ในฤดูฝน

ลำดับ	สกุลของราเอนโดไฟต์	จำนวนราที่แยกได้ (ไอโซเลต)	ลักษณะโคโลนี บนอาหาร PDA
1	<i>Colletotrichum</i> sp.	11	
2	<i>Fusarium</i> sp.	7	







ตารางที่ 4.2 (ต่อ) แสดงชนิดและจำนวนของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้ในฤดูฝน

ลำดับ	สกุลของราเอนโดไฟต์	จำนวนราที่แยกได้ (ไอโซเลต)	ลักษณะโคโลนี บนอาหาร PDA
3	<i>Mycelia sterliria</i> sp.1	13	
4	<i>Mycelia sterliria</i> sp.2	33	
5	<i>Mycelia sterliria</i> sp.4	1	
6	<i>Mycelia sterliria</i> sp.5	5	
7	<i>Mycelia sterliria</i> sp.6	2	
8	<i>Nigrospora</i> sp.	19	


ตารางที่ 4.2 (ต่อ) แสดงชนิดและจำนวนของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้ในฤดูฝน

ลำดับ	สกุลของราเอนโดไฟต์	จำนวนราที่แยกได้ (ไอโซเลต)	ลักษณะโคโลนี บนอาหาร PDA
9	<i>Paecilomyces</i> sp.2	7	
10	<i>Peatalotiopsis</i> sp.	2	
11	<i>Phomopsis</i> sp.1	3	
12	<i>Phomopsis</i> sp.2	4	
13	<i>Phomopsis</i> sp.3	1	
14	<i>Phomopsis</i> sp.4	1	

ตารางที่ 4.2 (ต่อ) แสดงชนิดและจำนวนของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้ในฤดูฝน






ลำดับ	สกุลของราเอนโดไฟต์	จำนวนราที่แยกได้ (ไอโซเลต)	ลักษณะโคโลนี บนอาหาร PDA
15	<i>Phomopsis</i> sp.5	5	
16	<i>Phomopsis</i> sp.6	2	
17	<i>Phomopsis</i> sp.7	2	
18	<i>Phomopsis</i> sp.8	1	
19	<i>Phyllosticta</i> sp.	10	
20	<i>Xylaria</i> sp.13	4	

ตารางที่ 4.2 (ต่อ) แสดงชนิดและจำนวนของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้ในฤดูฝน


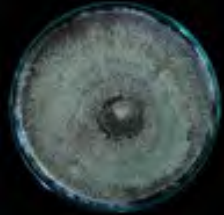




ลำดับ	สกุลของราเอนโดไฟต์	จำนวนราที่แยกได้ (ไฮโซเลต)	ลักษณะโคโลนี
21	<i>Xylaria</i> sp.14	3	
รวม		136	

ในฤดูแล้งเก็บใบพืชตัวอย่าง 8 ชนิด ทำการจำแนกโดยใช้วิธีเดียวกันกับในฤดูฝน สามารถแยกราเอนโดไฟต์ได้ทั้งสิ้น 95 ไอโซเลต โดยสามารถจำแนกราเอนโดไฟต์ได้เป็น 7 สกุล 20 ชนิด







ตารางที่ 4.3 แสดงชนิดและจำนวนของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้ในฤดูแล้ง

ลำดับ	สกุลของราเอนโดไฟต์	จำนวนราที่แยกได้ (ไอโซเลต)	ลักษณะโคโลนี บนอาหาร PDA
1	<i>Glomerella</i> sp.	1	
2	<i>Mycelia sterliria</i> sp.1	1	
3	<i>Mycelia sterliria</i> sp.2	3	
4	<i>Mycelia sterliria</i> sp.3	2	
5	<i>Paecilomyces</i> sp.1	34	




ตารางที่ 4.3 (ต่อ) แสดงชนิดและจำนวนของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้ในฤดูแล้ง

ลำดับ	สกุลของราเอนโดไฟต์	จำนวนราที่แยกได้ (ไฮโซเลต)	ลักษณะโคโลนี บนอาหาร PDA
6	<i>Paecilomyces</i> sp.2	18	
7	<i>Paecilomyces</i> sp.3	11	
8	<i>Phomopsis</i> sp.8	6	
9	<i>Xylaria</i> sp.1	2	
10	<i>Xylaria</i> sp.2	2	
11	<i>Xylaria</i> sp.3	2	

ตารางที่ 4.3 (ต่อ) แสดงชนิดและจำนวนของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้ในฤดูแล้ง

ลำดับ	สกุลของราเอนโดไฟต์	จำนวนราที่แยกได้ (ไฮโซเลต)	ลักษณะโคโลนี บนอาหาร PDA
12	<i>Xylaria</i> sp.4	1	
13	<i>Xylaria</i> sp.5	1	
14	<i>Xylaria</i> sp.6	1	
15	<i>Xylaria</i> sp.7	1	
16	<i>Xylaria</i> sp.8	3	
17	<i>Xylaria</i> sp.9	1	

ตารางที่ 4.3 (ต่อ) แสดงชนิดและจำนวนของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้ในฤดูแล้ง

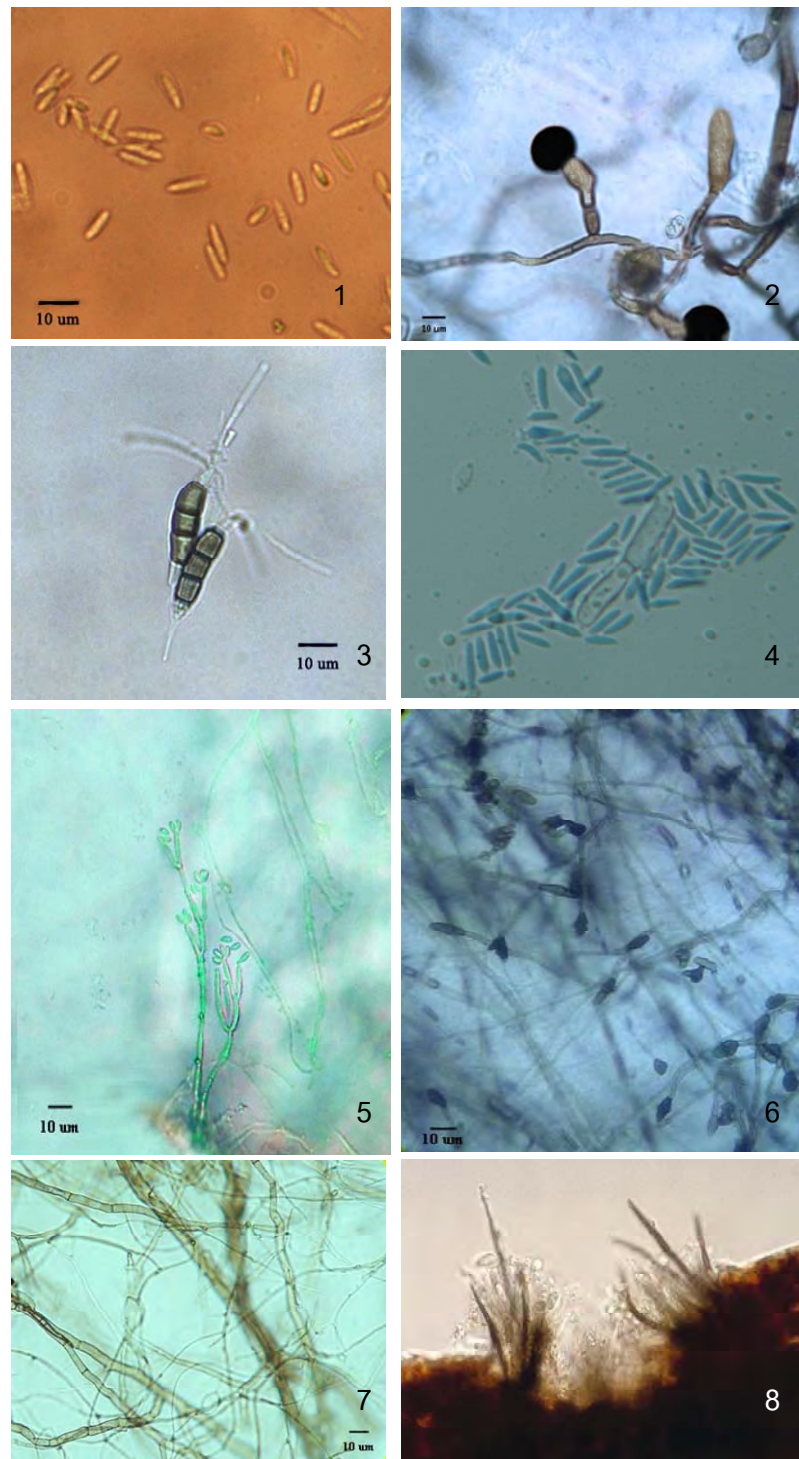
ลำดับ	สกุลของราเอนโดไฟต์	จำนวนราที่แยกได้ (ไอโซเลต)	ลักษณะโคโลนี บนอาหาร PDA
18	<i>Xylaria</i> sp.10	2	
19	<i>Xylaria</i> sp.11	2	
20	<i>Xylaria</i> sp.12	1	
รวม		95	

จากราเอนโดไฟต์ทั้งหมด 231 ไอโซเลตสามารถจำแนกได้เป็นกลุ่มใหญ่ได้ทั้งสิ้น 10 กลุ่ม ได้แก่ *Paecilomyces* spp. (30.3%) *Mycelia sterilia* (26%) *Xylaria* spp. (11.25%) *Phomopsis* spp. (9.52%) *Nigrospora* sp. (8.22%) *Colletotrichum* sp.(4.76%) *Phyllosticta* sp. (4.32%) *Fusarium* sp. (3.03%) *Pestalotiopsis* sp. (0.86%) และ *Glomerella* sp. (0.43%) ดังแสดงในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 แสดงจำนวนของกลุ่มราเอนโดไฟต์ที่แยกได้

กลุ่มราเอนโดไฟต์	จำนวน (ไอโซเลต)		
	ฝน	แล้ง	รวม
<i>Paecilomyces</i> spp.	7	63	70
<i>Mycelia sterilia</i>	54	6	60
<i>Xylaria</i> spp.	7	19	26
<i>Phomopsis</i> spp.	19	6	25
<i>Nigrospora</i> sp.	19	-	19
<i>Colletotrichum</i> sp	11	-	11
<i>Phyllosticta</i> sp.	10	-	10
<i>Fusarium</i> sp.	7	-	7
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	2	-	2
<i>Glomerella</i> sp.	-	1	1
รวม	136	95	231

เมื่อแยกราเอนโดไฟต์ตามชนิดอย่างหยาบพบราเอนโดไฟต์ *Mycelia sterilia* sp.2 มากที่สุด โดยพบเป็นจำนวนทั้งสิ้น 36 (15.5%) ไอโซเลต รองลงมาคือ *Paecilomyces* sp.1 34 (14.7%) ไอโซเลต และ *Paecilomyces* sp.2 25 (10.8%) ไอโซเลต ตามลำดับ โดยราที่เด่นในฤดูฝนได้แก่ *Mycelia sterilia* sp.2 มีจำนวนทั้งสิ้น 33 (24.26%) ไอโซเลตจาก 136 ไอโซเลต และราที่เด่นในฤดูแล้งได้แก่ *Paecilomyces* sp.1 34 (35.78%) ไอโซเลตจาก 95 ไอโซเลต ราเอนโดไฟต์ที่พบทั้ง 2 ฤดูมีเพียง 4 ชนิดเท่านั้น ได้แก่ *Paecilomyces* sp.2 *Phomopsis* sp. 8 *Mycelia sterilia* sp.1 และ *Mycelia sterilia* sp. 2 ดังแสดงตารางที่ 4.5



รูปที่ 4.1 แสดงลักษณะสปอร์และเส้นใยของราแอนโดไฟต์ที่แยกได้ 1. *Phomopsis* spp. 2. *Nigrospora* sp. 3. *Pestalotiopsis* sp. 4. *Fusarium* sp. 5. *Paecilomyces* spp. 6. *Colletotrichum* sp. 7. *Mycelia sterilia* 8. *Glomerella* sp.

ตารางที่ 4.5 แสดงจำนวนชนิดของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากพืชอาศัยแต่ละชนิดทั้ง 2 ฤดู

ชนิดของราเอนโดไฟต์	เต็ง		รัง		กระโดน		ยอป่า		กระท่อม		สมอไทย		ปอลาย		แค		ทองหลาง		จำนวนไอโซเลต
	ฝน	แล้ง	ฝน	แล้ง	ฝน	แล้ง	ฝน	แล้ง	ฝน	แล้ง	ฝน	แล้ง	ฝน	แล้ง	ฝน	แล้ง	ฝน	แล้ง	
<i>Colletotrichum</i> sp.	-	-	-	-	9	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11
<i>Glomerella</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1
<i>Fusarium</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	2	-	-	-	7
<i>Mycelia sterilia</i> sp.1	-	-	-	-	2	1	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	14
<i>Mycelia sterilia</i> sp.2	9	-	3	-	-	-	4	-	4	3	5	-	1	-	-	-	7	-	36
<i>Mycelia sterilia</i> sp.3	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
<i>Mycelia sterilia</i> sp.4	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Mycelia sterilia</i> sp.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	2	-	-	-	5
<i>Mycelia sterilia</i> sp.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	2
<i>Nigrospora</i> sp.	-	-	-	-	8	-	-	-	3	-	-	-	1	-	3	-	4	-	19
<i>Paecilomyces</i> sp.1	-	5	-	5	-	6	-	-	-	7	-	8	-	-	-	3	-	-	34
<i>Paecilomyces</i> sp.2	7	-	-	-	-	3	-	5	-	-	-	-	-	7	-	3	-	-	25
<i>Paecilomyces</i> sp.3	-	1	-	6	-	2	-	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	11
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	2

ตารางที่ 4.5 (ต่อ) แสดงจำนวนชนิดของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากพืชอาศัยแต่ละชนิดทั้ง 2 ฤดู

ชนิดของราเอนโดไฟต์	เต็ง		รัง		กระโดน		ยอดป่า		กระท่อม		สมอไทย		ปอลาย		แค		ทองหลาง		จำนวนไฮโซเลต
	ฝน	แล้ง	ฝน	แล้ง	ฝน	แล้ง	ฝน	แล้ง	ฝน	แล้ง	ฝน	แล้ง	ฝน	แล้ง	ฝน	แล้ง	ฝน	แล้ง	
<i>Phomopsis</i> sp.1	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
<i>Phomopsis</i> sp.2	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4
<i>Phomopsis</i> sp.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Phomopsis</i> sp.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Phomopsis</i> sp.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	3	-	-	-	5
<i>Phomopsis</i> sp.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	2
<i>Phomopsis</i> sp.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	2
<i>Phomopsis</i> sp.8	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	4	-	-	-	-	7
<i>Phyllosticta</i> sp.	-	-	3	-	-	-	-	-	2	-	5	-	-	-	-	-	-	-	10
<i>Xylaria</i> sp.1	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
<i>Xylaria</i> sp.2	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
<i>Xylaria</i> sp.3	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
<i>Xylaria</i> sp.4	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Xylaria</i> sp.5	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1

ตารางที่ 4.5 (ต่อ) แสดงจำนวนชนิดของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากพืชอาศัยแต่ละชนิดทั้ง 2 ฤดู

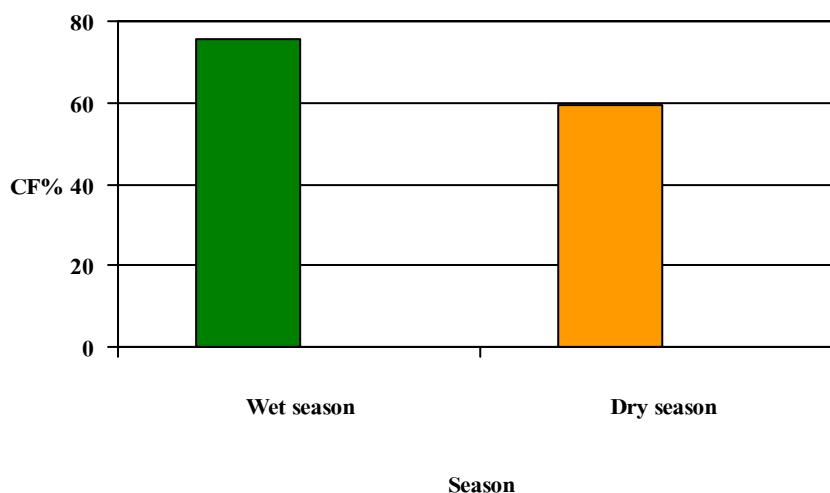
ชนิดของราเอนโดไฟต์	เต็ง		รัง		กระโดน		ยอป่า		กระท่อม		สมอไทย		ปอลาย		แค		ทองหลาง		จำนวนไอโซเลต
	ฝน	แล้ง	ฝน	แล้ง	ฝน	แล้ง	ฝน	แล้ง	ฝน	แล้ง	ฝน	แล้ง	ฝน	แล้ง	ฝน	แล้ง	ฝน	แล้ง	
<i>Xylaria</i> sp.6	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Xylaria</i> sp.7	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Xylaria</i> sp.8	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
<i>Xylaria</i> sp.9	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Xylaria</i> sp.10	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
<i>Xylaria</i> sp.11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	2
<i>Xylaria</i> sp.12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1
<i>Xylaria</i> sp.13	-	-	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4
<i>Xylaria</i> sp.14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	3
จำนวนไอโซเลต	16	14	13	14	23	19	12	7	15	10	15	11	11	11	13	9	18	-	231

4.3) การศึกษาความหลากหลายของราเอนโดไฟต์

ศึกษาความหลากหลายของราเอนโดไฟต์โดยวิเคราะห์ความถี่ของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากตัวอย่างใบพืชแต่ละชนิด (Colonization Frequency)

$$CF\% = \frac{\text{Number of fungal isolates}}{\text{total number of segments studied}} \times 100$$

จากจำนวนชิ้นส่วนที่แยกทั้งหมด 340 ชิ้นนำมาคำนวณความถี่ของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้โดยความถี่ของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้ในฤดูฝนเท่ากับ 75.5 และในฤดูแล้งเท่ากับ 59.3



รูปที่ 4.2 แสดงจำนวนและความถี่ของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้ใน 2 ฤดู

ตารางที่ 4.6 แสดงความถี่ของราเอนโดไฟต์ (colonization frequency) ที่แยกได้จากพืชอาศัยแต่ละชนิดทั้ง 2 ฤดู

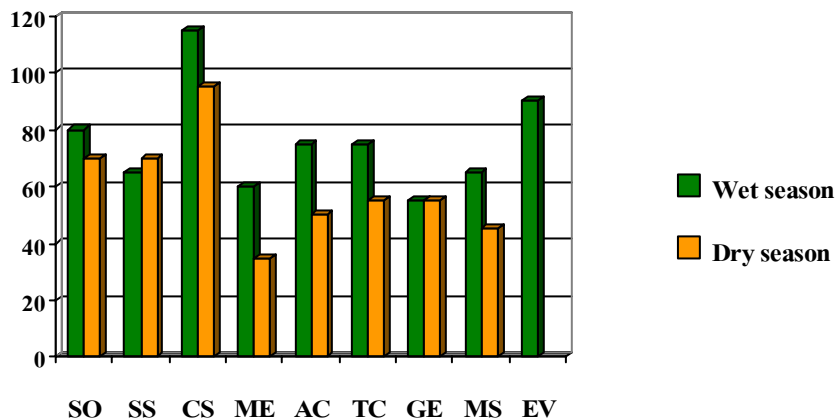
ชนิดของราเอนโดไฟต์	เต็ง		รัง		กระโดน		ยอป่า		กระท่อม		สมอไทย		ปอลาย		แค		ทองหลาง		จำนวน CF%	
	ฝน	แล้ง	ฝน	แล้ง	ฝน	แล้ง	ฝน	แล้ง	ฝน	แล้ง	ฝน	แล้ง	ฝน	แล้ง	ฝน	แล้ง	ฝน	แล้ง		
<i>Colletotrichum</i> sp.	-	-	-	-	45	-	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	55
<i>Glomerella</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	5
<i>Fusarium</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	25	-	-	-	-	-	10	-	-	-	-	35
<i>Mycelia sterilia</i> sp.1	-	-	-	-	10	5	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	25	-	-	70
<i>Mycelia sterilia</i> sp.2	45	-	15	-	-	-	20	-	20	15	25	-	5	-	-	-	35	-	-	180
<i>Mycelia sterilia</i> sp.3	-	-	-	-	-	5	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10
<i>Mycelia sterilia</i> sp.4	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5
<i>Mycelia sterilia</i> sp.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15	-	-	-	10	-	-	-	-	25
<i>Mycelia sterilia</i> sp.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	-	-	10
<i>Nigrospora</i> sp.	-	-	-	-	40	-	-	-	15	-	-	-	5	-	15	-	20	-	-	95
<i>Paecilomyces</i> sp.1	-	25	-	25	-	30	-	-	-	35	-	40	-	-	-	15	-	-	-	170
<i>Paecilomyces</i> sp.2	35	-	-	-	-	15	-	25	-	-	-	-	-	35	-	15	-	-	-	125
<i>Paecilomyces</i> sp.3	-	5	-	30	-	10	-	5	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	55
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	-	-	-	-	-	-	10

ตารางที่ 4.6 (ต่อ) แสดงความถี่ของราเอนโดไฟต์ (colonization frequency) ที่แยกได้จากพืชอาศัยแต่ละชนิดทั้ง 2 ฤดู

ชนิดของราเอนโดไฟต์	เต็ง		รัง		กระโดน		ยอป่า		กระท่อม		สมอไทย		ปอลาย		แค		ทองหลาง		จำนวน CF%
	ฝน	แล้ง	ฝน	แล้ง	ฝน	แล้ง	ฝน	แล้ง	ฝน	แล้ง	ฝน	แล้ง	ฝน	แล้ง	ฝน	แล้ง	ฝน	แล้ง	
<i>Phomopsis</i> sp.1	-	-	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15
<i>Phomopsis</i> sp.2	-	-	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20
<i>Phomopsis</i> sp.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	5
<i>Phomopsis</i> sp.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	5
<i>Phomopsis</i> sp.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	-	15	-	-	-	25
<i>Phomopsis</i> sp.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	-	-	-	-	-	10
<i>Phomopsis</i> sp.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	-	-	-	-	-	10
<i>Phomopsis</i> sp.8	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	5	20	-	-	-	-	35
<i>Phyllosticta</i> sp.	-	-	15	-	-	-	-	-	10	-	25	-	-	-	-	-	-	-	50
<i>Xylaria</i> sp.1	-	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10
<i>Xylaria</i> sp.2	-	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10
<i>Xylaria</i> sp.3	-	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10
<i>Xylaria</i> sp.4	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5
<i>Xylaria</i> sp.5	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5

ตารางที่ 4.6 (ต่อ) แสดงความถี่ของราเอนโดไฟต์ (colonization frequency) ที่แยกได้จากพืชอาศัยแต่ละชนิดทั้ง 2 ฤดู

ชนิดของราเอนโดไฟต์	เต็ง		รัง		กระโดน		ยอป่า		กระท่อม		สมอไทย		ปอลาย		แค		ทองหลาง		จำนวน CF%
	ฝน	แล้ง	ฝน	แล้ง	ฝน	แล้ง	ฝน	แล้ง	ฝน	แล้ง	ฝน	แล้ง	ฝน	แล้ง	ฝน	แล้ง	ฝน	แล้ง	
<i>Xylaria</i> sp.6	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5
<i>Xylaria</i> sp.7	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5
<i>Xylaria</i> sp.8	-	-	-	-	-	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15
<i>Xylaria</i> sp.9	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5
<i>Xylaria</i> sp.10	-	-	-	-	-	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10
<i>Xylaria</i> sp.11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	-	-	10
<i>Xylaria</i> sp.12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	5
<i>Xylaria</i> sp.13	-	-	-	-	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20
<i>Xylaria</i> sp.14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15	-	-	-	15
จำนวน CF%	80	70	65	70	115	95	60	35	75	50	75	55	55	55	65	45	90	-	1155

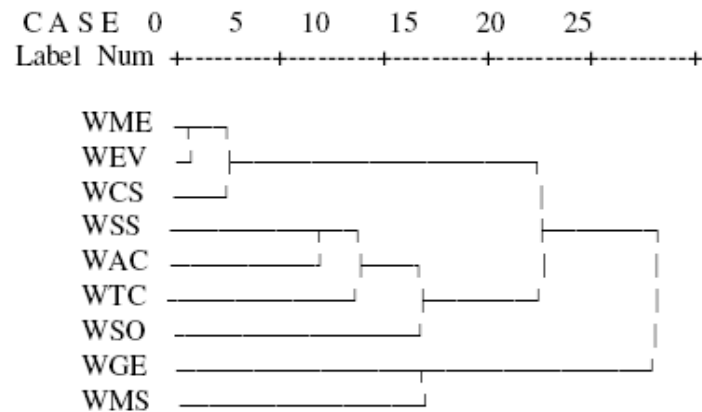


รูปที่ 4.3 แสดงความถี่ของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากใบไม้แต่ละชนิด

จากรูปที่ 4.3 และตารางที่ 4.6 แสดงให้เห็นว่าจำนวนของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากฤดูฝนทั้งหมดมีจำนวนและความถี่มากกว่าราเอนโดไฟต์ที่แยกได้ทั้งหมดในฤดูแล้ง เมื่อนำความถี่ของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากพืชแต่ละชนิดมาเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างความถี่ของราเอนโดไฟต์กับฤดูกาล พบว่าโดยส่วนใหญ่สามารถแยกราเอนโดไฟต์ในฤดูฝนได้มากกว่าในฤดูแล้ง มีเพียงแค่จำนวนราเอนโดไฟต์จากใบรวงเท่านั้นที่แยกได้ในฤดูแล้งมากกว่าฤดูฝน

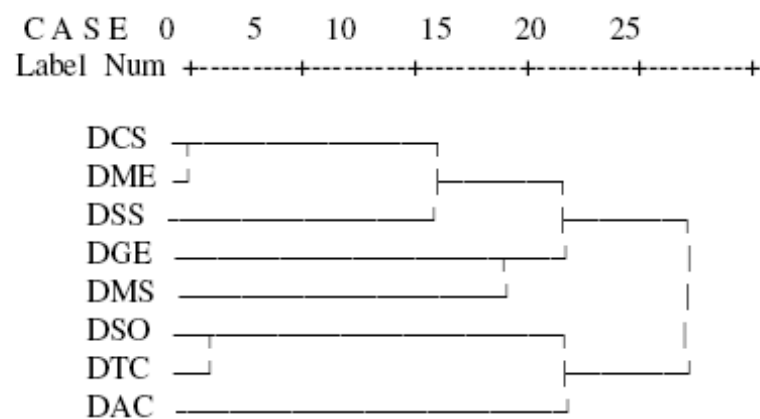
เมื่อเทียบความสัมพันธ์ของจำนวนราเอนโดไฟต์ที่แยกได้กับขนาดของใบพืชตัวอย่าง พบว่าขนาดของใบพืชตัวอย่างค่อนข้างที่จะมีผลต่อจำนวนของราเอนโดไฟต์ โดยที่ใบกระโดนที่มีขนาดใหญ่ที่สุดสามารถแยกราเอนโดไฟต์ได้มากที่สุดเช่นกัน

จากผลการทดลองเมื่อทำการแยกราเอนโดไฟต์ที่ได้จากต้นไม้นิชนิดต่างๆ และนำมาทำการจัดความใกล้เคียงกันของราเอนโดไฟต์ในพืชแต่ละชนิด โดยใช้ Hierarchical cluster analysis ในโปรแกรม SPSS จะสามารถบอกถึงความใกล้เคียงกันของราเอนโดไฟต์ในพืชแต่ละชนิดได้ดังรูปที่ 4.4 4.5 และ 4.6



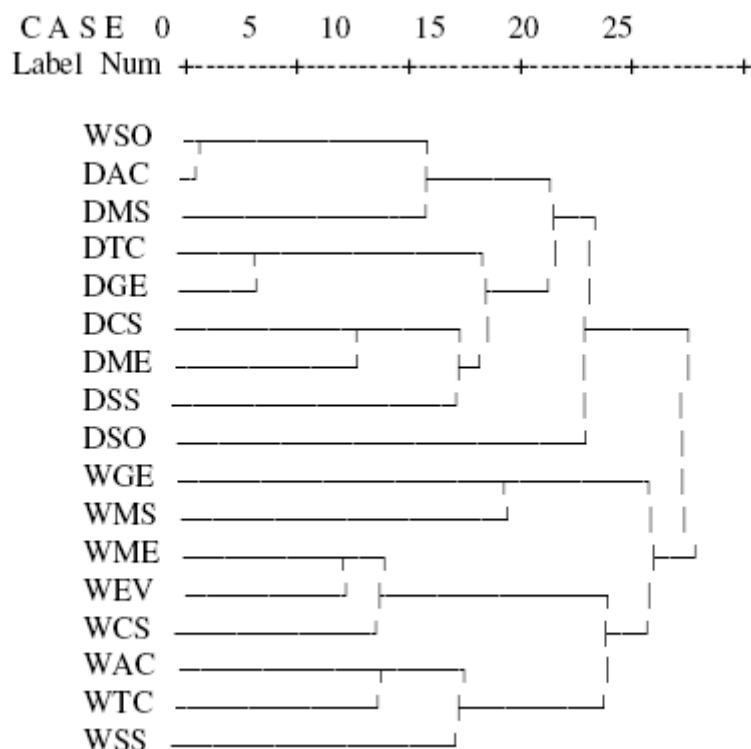
SO = *Shorea obtuse*, SS = *Shorea siamensis*, CS = *Careya sphaerica*, ME = *Morinda elliptica*, AC = *Anthocephalus chinensis*, GC = *Grewia eriocarpa*, MS = *Markhamia stipulate*, TC = *Terminalia chebula*, EV = *Erythrina variegata* (D dry season ; W wet season)

รูปที่ 4.4 การศึกษาความใกล้เคียงกันของราเอโนโดไฟต์ที่แยกได้ในฤดูฝนจากพืชแต่ละชนิดโดยใช้ Hierarchical cluster analysis



SO = *Shorea obtuse*, SS = *Shorea siamensis*, CS = *Careya sphaerica*, ME = *Morinda elliptica*, AC = *Anthocephalus chinensis*, GC = *Grewia eriocarpa*, MS = *Markhamia stipulate*, TC = *Terminalia chebula*, EV = *Erythrina variegata* (D dry season ; W wet season)

รูปที่ 4.5 การศึกษาความใกล้เคียงกันของราเอโนโดไฟต์ที่แยกได้ในฤดูแล้งจากพืชแต่ละชนิดโดยใช้ Hierarchical cluster analysis



SO = *Shorea obtuse*, SS = *Shorea siamensis*, CS = *Careya sphaerica*, ME = *Morinda elliptica*, AC = *Anthocephalus chinensis*, GC = *Grewia eriocarpa*, MS = *Markhamia stipulate*, TC = *Terminalia chebula*, EV = *Erythrina variegata* (D dry season ; W wet season)

รูปที่ 4.6 การศึกษาความใกล้เคียงกันของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้ในฤดูฝนและฤดูแล้งจากพืชแต่ละชนิดโดยใช้ Hierarchical cluster analysis

ผลการศึกษาความใกล้เคียงกันของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้ระหว่างพืชแต่ละชนิดพบว่า ราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากพืชแต่ละชนิดทั้ง 2 ฤดูมีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน โดยที่ความสัมพันธ์ของราเอนโดไฟต์ที่แยกจากพืชตัวอย่างจะจับคู่ความใกล้เคียงกันระหว่างกระโดนและยอป่า กระทุ่มและสมอไทย ปอลายและแคเหมือนกันทั้ง 2 ฤดู และเมื่อนำผลการศึกษาของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้ทั้ง 2 ฤดูมาพิจารณาจากความใกล้เคียงกันของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากพืชทั้ง 2 ฤดูกาลจะพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด

4.4) ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์จากส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อ

นำราเอนโดไฟต์ที่แยกได้มาทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์ มาทดสอบด้วยวิธี paper-disk diffusion กับจุลินทรีย์ทดสอบ 5 ชนิด ได้แก่

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC9027
<i>Escherichia coli</i>	ATCC25922
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC6633
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC25923
<i>Candida albicans</i>	ATCC 70014

โดยมีผลการยับยั้งจุลินทรีย์ดังแสดงในตาราง

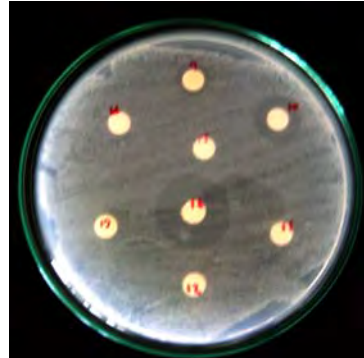
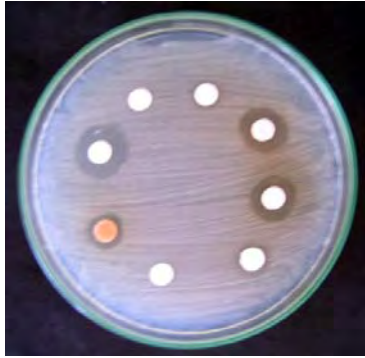
ตารางที่ 4.7 แสดงราเอนโดไฟต์ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

ไอโซเลต	จุลินทรีย์ทดสอบ				
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>
DSO1	++	++	++	+	-
DSO2	++	++	++	+	+
DSO4	-	+	+	-	-
DSO7	-	-	+	-	-
DSS1	+	+	+	-	-
DSS2	+	++	+	-	-
DSS3	+++	+++	-	-	-
DCS1	+++	++	-	-	-
DCS2	+++	++	-	-	-
DCS7	-	-	+	-	-
DCS13	-	-	++	-	-
DAC1	-	-	++	++	-
DTC11	-	-	+	+	+

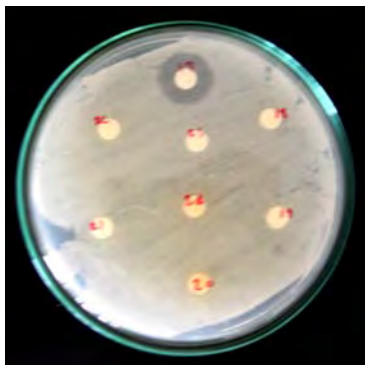
ตารางที่ 4.7 (ต่อ) แสดงราเอ็นโดไฟต์ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

ไอโซเลต	จุลินทรีย์ทดสอบ				
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>
DMS2	++	++	-	-	-
DMS3	+	+	-	-	-
DMS7	-	-	-	+	-
DME2	-	-	+	+	-
WSS11	-	-	-	+	+
WCS1	+	++	++	-	+
WCS3	+	+	+	-	+
WCS20	-	-	+	-	+
WTC4	-	-	++	+	-
WMS1	++	++	-	-	-
WMS3	++	++	-	-	-
WMS7	-	-	++	++	-
WMS8	-	-	++	++	-
WGE7	-	-	++	+	-
WGE9	+	++	-	-	-
WGE10	+	+	-	-	-
WEV1	-	-	+	-	-

หมายเหตุ +++ = เส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสมากกว่า 20 มิลลิเมตร
 ++ = เส้นผ่าศูนย์กลางของวงใส 10 – 20 มิลลิเมตร
 + = เส้นผ่าศูนย์กลางของวงใส 5 – 10 มิลลิเมตร
 - = ไม่ยับยั้ง



รูปที่ 4.7 แสดงความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก



รูปที่ 4.8 แสดงความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ



รูปที่ 4.9 แสดงความสามารถในการยับยั้งยีสต์

4.5) ผลการทดสอบประสิทธิภาพของส่วนสกัดออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อเซลล์ของราเอนโดไฟต์

นำส่วนสกัดที่ได้จากราเอนโดไฟต์ (crude extract) ที่แยกได้ มาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งต่างๆ 7 ชนิด ได้แก่ เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร KatoIII (HTB-103) เซลล์มะเร็งตับ HepG2 (HB-8065) เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ SW620 (CCL-227) เซลล์มะเร็งเต้านม BT474 (HTB-20) และเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว Jurkat (TIB-152) เซลล์มะเร็งผิวหนัง A375 (CRL-1619) (Human malignant melanoma) เซลล์มะเร็งปากมดลูก (Human cervical cancer cells) Hela และเซลล์ปกติ คือ เซลล์จากไตของลิง (Kidney African green monkey cell) Vero cell รวมทั้งสิ้น 8 เซลล์ไลน์ นำมาตรวจสอบด้วยวิธี MTT โดยการวัดการดูดกลืนแสง โดยเซลล์ที่มีชีวิตอยู่จะติดสี หลุมที่มีค่าความดูดกลืนแสงสูงแสดงว่ายังมีเซลล์ที่มีชีวิตอยู่มาก ส่วนหลุมที่มีค่าความดูดกลืนแสงน้อยแสดงว่า เซลล์ถูกยับยั้งการเจริญ

จากนั้นหาค่าเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์ โดยนำค่าความดูดกลืนแสง เปรียบเทียบกับชุดควบคุม และคำนวณดังสูตรต่อไปนี้

$$\% \text{ cell viability} = \frac{\text{total viability cell (unstained)}}{\text{total cell (stained and unstained)}} \times 100$$

ตารางที่ 4.8 เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆของส่วนสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟต์

ไอโซเลต	เซลล์ไลน์							
	A375	Kato III	HepG 2	SW620	Jurkat	Hela	BT474	Vero
DSO1	16.41%	28.29%	45.04%	34.86%	40.00%	55.13%	54.47%	68.35%
DSS1	13.50%	35.18%	50.85%	14.22%	18.03%	36.40%	31.57%	32.22%
DSS2	14.62%	55.60%	60.89%	34.01%	21.42%	54.07%	39.73%	27.36%
DCS1	8.6%	50.00%	21.40%	12.51%	17.04%	9.58%	26.31%	23.88%
DCS4	7.55%	59.02%	23.34%	15.08%	16.50%	39.41%	32.89%	18.19%
DCS7	14.23%	42.85%	26.26%	19.88%	28.93%	35.91%	37.67%	30.41%
DTC11	26.02%	76.35%	54.98%	36.90%	24.65%	41.74%	39.09%	53.47%

ตารางที่ 4.8 (ต่อ) เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆของส่วนสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อรา เอนโดไฟต์

ไอโซเลต	เซลล์ไลน์							
	A375	Kato III	HepG 2	SW620	Jurkat	Hela	BT474	Vero
DMS2	34.73%	55.41%	50.45%	19.22%	15.75%	49.25%	57.58%	21.26%
DMS3	13.57%	40.08%	44.80%	23.55%	20.93%	31.73%	44.10%	21.19%
WCS1	10.95%	31.84%	22.18%	14.85%	18.78%	38.31%	22.64%	24.45%
WAC1	11.55%	45.58%	16.17%	13.14%	18.61%	10.03%	41.41%	28.78%
WAC9	54.87%	69.76%	67.68%	46.47%	18.35%	52.18%	67.28%	72.99%
WAC10	42.06%	81.39%	44.83%	22.15%	24.08%	36.02%	48.49%	49.52%
WTC6	12.53%	43.48%	19.03%	15.00%	22.78%	21.95%	43.41%	38.67%
WMS1	16.85%	56.51%	68.67%	18.92%	22.13%	60.52%	55.55%	26.18%
WMS4	13.78%	34.65%	14.43%	13.62%	16.92%	14.39%	30.05%	16.41%
WME3	13.78%	53.40%	16.86%	15.14%	31.87%	14.03%	29.38%	35.39%
WGE2	64.90%	79.58%	54.40%	25.85%	64.46%	50.10%	73.02%	88.00%
WGE7	31.33%	45.81%	32.31%	17.20%	30.82%	23.38%	84.42%	24.79%
WGE9	32.86%	60.99%	27.74%	22.75%	37.95%	68.00%	30.26%	18.92%
WGE11	47.49%	57.32%	24.80%	22.20%	41.58%	30.16%	49.34%	58.72%
WEV1	19.22%	30.62%	30.68%	13.48%	15.20%	19.90%	26.97%	38.49%
WEV2	13.37%	39.00%	15.34%	9.51%	16.01%	15.70%	31.14%	33.27%
WEV5	17.13%	70.15%	28.29%	21.09%	96.76%	28.59%	63.37%	31.15%
WEV7	16.57%	68.84%	29.70%	14.35%	60.56%	53.02%	62.71%	34.42%
WEV8	16.04%	38.21%	32.10%	16.17%	24.76%	29.48%	50.65%	57.74%

เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆของส่วนสกัดจากราเอนโดไฟต์แสดงดังตารางที่ 4.7 ตัวเลขที่พิมพ์ตัวหนา หมายถึงการยับยั้งแบบจำเพาะเจาะจง

4.6) การจัดกลุ่มความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของราเอนโดไฟต์

จากตารางการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์และ
ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งของราเอนโดไฟต์พบว่าราเอนโดไฟต์แต่ละ
สายพันธุ์มีความสามารถในการสร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์และเซลล์มะเร็งได้ จึงทำการ
จัดกลุ่มความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของราเอนโดไฟต์ ดังแสดงในตาราง
4.9

ตารางที่ 4.9 แสดงการจัดกลุ่มการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของราเอนโดไฟต์

กลุ่มของจุลินทรีย์และเซลล์ ทดสอบทดสอบ	ไอโซเลต (n)	ฤทธิ์ในการยับยั้ง
แบคทีเรียแกรมบวก	DAC1 WTC4 WGE7	มีฤทธิ์ยับยั้ง <i>Bacillus subtilis</i> และ
	WMS8	<i>Staphylococcus aureus</i>
	WMS7 (5)	
แบคทีเรียแกรมลบ	DSO7 DCS7 DCS13	มีฤทธิ์ยับยั้ง <i>Bacillus subtilis</i>
	WCS20	
	WEV1 (5)	
แบคทีเรียแกรมลบ	DMS7 (1)	มีฤทธิ์ยับยั้ง <i>Staphylococcus aureus</i>
	DSS3 DCS1 DCS2	มีฤทธิ์ยับยั้ง <i>Escherichia coli</i>
	DMS2	และ <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
แบคทีเรียแกรมลบ	DMS3 WMS1 WMS3	
	WGE9	
	WGE10 (9)	

ตารางที่ 4.9 (ต่อ) แสดงการจัดกลุ่มการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของราเอนโดไฟต์

ชนิดของจุลินทรีย์และเซลล์ ทดสอบทดสอบ	ไอโซเลต (n)	ฤทธิ์ในการยับยั้ง
แบคทีเรียแกรมบวกและแกรม ลบ	DSO1 (1)	มีฤทธิ์ยับยั้ง <i>Bacillus subtilis</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Escherichia coli</i> และ <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	DSS1 DSS2 (2)	มีฤทธิ์ยับยั้ง <i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> และ <i>Bacillus subtilis</i>
	DSO4 (1)	มีฤทธิ์ยับยั้ง <i>Escherichia coli</i> และ <i>Bacillus subtilis</i>
ยีสต์	ไม่พบ	ไม่พบ
แบคทีเรียแกรมบวกและยีสต์	DTC11 (1)	มีฤทธิ์ยับยั้ง <i>Bacillus subtilis</i> <i>Staphylococcus aureus</i> และ <i>Candida albicans</i>
	WCS20 (1)	มีฤทธิ์ยับยั้ง <i>Bacillus subtilis</i> และ <i>Candida albicans</i>
	WSS11 (1)	มีฤทธิ์ยับยั้ง <i>Staphylococcus aureus</i> และ <i>Candida albicans</i>
แบคทีเรียแกรมลบและยีสต์	ไม่พบ	ไม่พบ

ตารางที่ 4.9 (ต่อ) แสดงการจัดกลุ่มการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของราเอนโดไฟต์

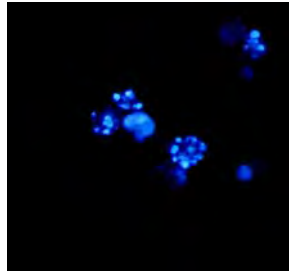
ชนิดของจุลินทรีย์และเซลล์ ทดสอบทดสอบ	ไอโซเลต (n)	ฤทธิ์ในการยับยั้ง
แบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ และยีสต์	DSO2 (1)	มีฤทธิ์ยับยั้ง <i>Bacillus subtilis</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> และ <i>Candida albicans</i>
	WCS3 WCS1 (2)	มีฤทธิ์ยับยั้ง <i>Bacillus subtilis</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> และ <i>Candida albicans</i>
เซลล์มะเร็งแบบจำเพาะ	WGE2 (1)	เฉพาะเซลล์มะเร็งลำไส้
	WAC9 (1)	SW620 เฉพาะเซลล์มะเร็งเม็ดเลือด ขาว Jurkat

4.7) สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้

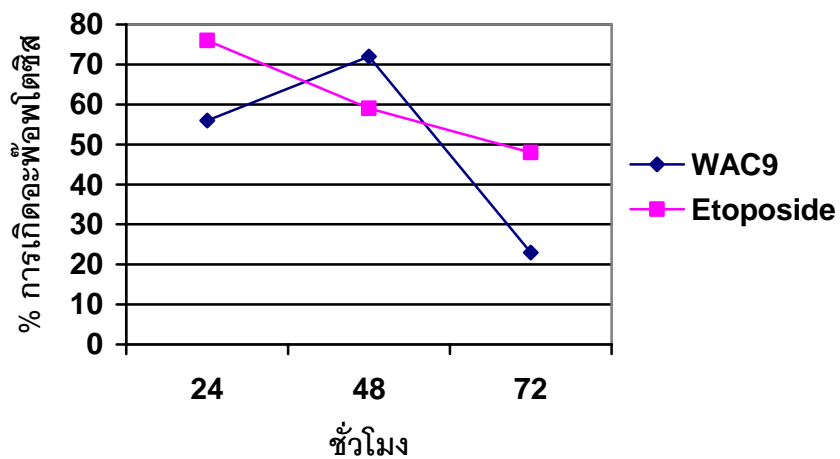
จากการจัดกลุ่มการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของราเอนโดไฟต์ พบว่าราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้เป็นวงกว้างนั้นกลับไม่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้อย่างจำเพาะเจาะจง ดังนั้นในการศึกษานี้จึงให้น้ำหนักในการคัดเลือกสายพันธุ์ของราเอนโดไฟต์จากความสามารถในการยับยั้งของเซลล์มะเร็งอย่างจำเพาะเจาะจง ราเอนโดไฟต์ที่นำมาใช้ในการศึกษาต่อคือ ราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ WAC9 และราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ WGE2

4.8) การทดสอบการกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งตายแบบอะพ็อบโทซิสของราเอนโดไฟต์

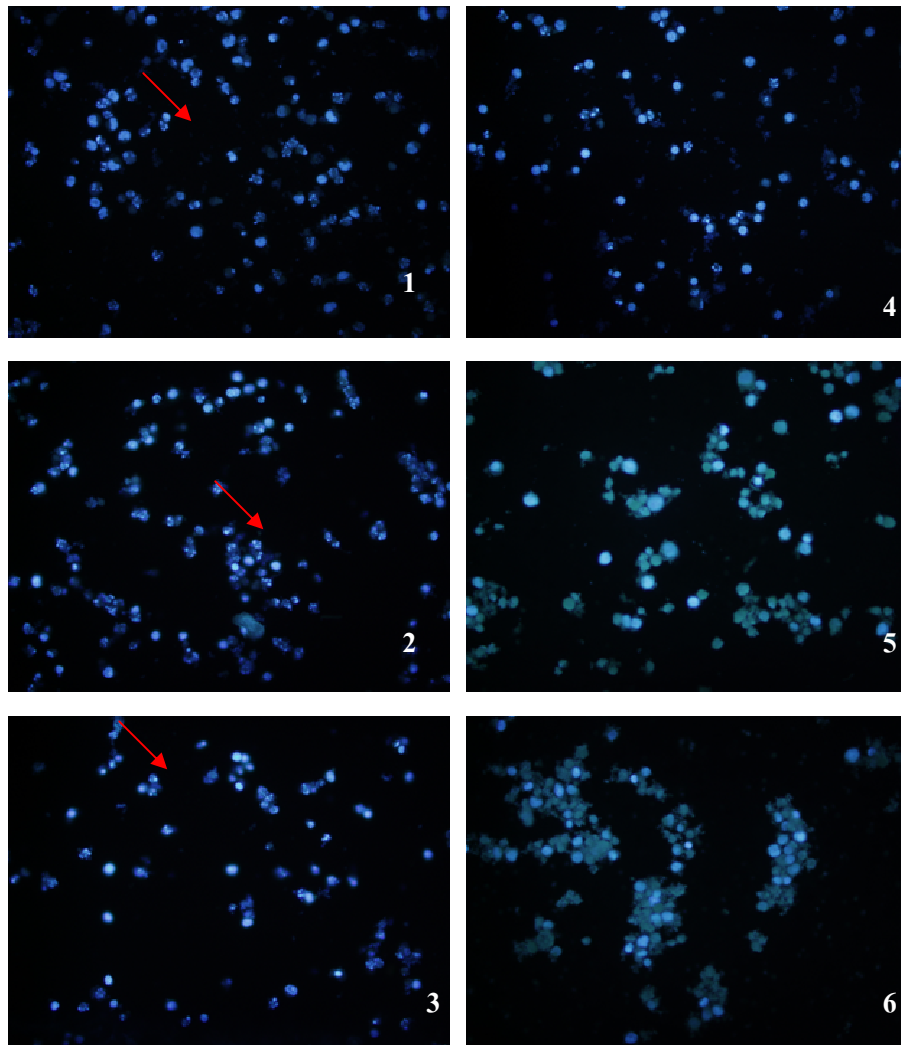
เมื่อนำสารสกัดราเอนโดไฟต์ไอโซเลต WAC9 และราเอนโดไฟต์ไอโซเลต WGE2 มาทดสอบการกระตุ้นให้เซลล์ตายแบบอะพ็อบโทซิสโดยตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนซ์ พบว่าสารสกัดจากราเอนโดไฟต์ไอโซเลต WAC9 มีการหดตัวของเซลล์ และนิวเคลียสเหมือนกับชุดควบคุมบวก ดังแสดงในรูปที่ 4.10 และ 4.12 ลูกศรสีแดง คือเซลล์ที่เกิดการอะพ็อบโทซิส แสดงให้เห็นว่า ราเอนโดไฟต์ไอโซเลต WAC9 กระตุ้นเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (Jurkat) ให้เกิดการตายแบบอะพ็อบโทซิสได้ โดยเปอร์เซ็นต์การตายแบบอะพ็อบโทซิสที่ 24 48 และ 72 ชั่วโมงเท่ากับ 56% 72% 23% ตามลำดับ (รูปที่ 4.11)



รูปที่ 4.10 การเกิดอะพ็อบโทซิสในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว Jurkat

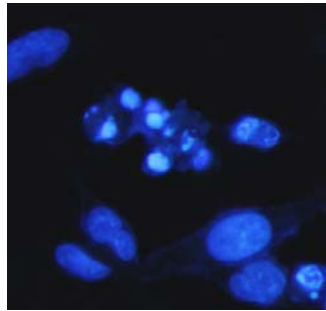


รูปที่ 4.11 ปริมาณการเกิดอะพ็อบซิสในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว Jurkat

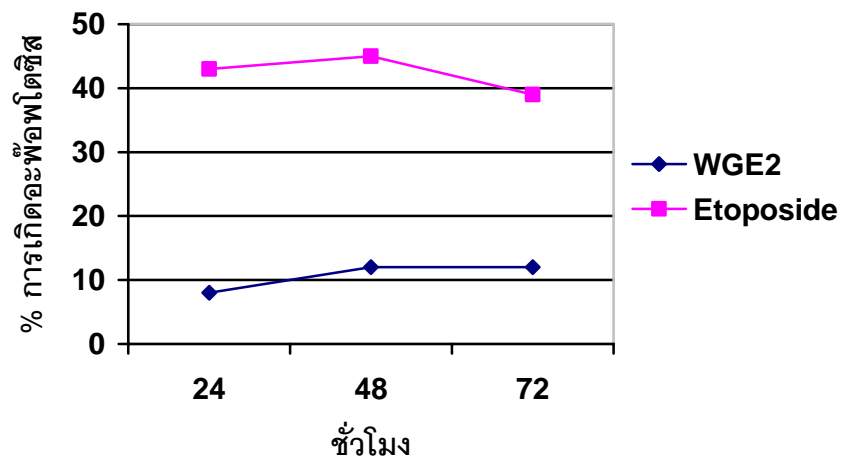


รูปที่ 4.12 การเกิดอะพ็อบโทซิสในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว Jurkat 1) เมื่อสัมผัสกับสารสกัดจากราเอนโดไฟต์ สายพันธุ์ WAC9 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง 2) เมื่อสัมผัสกับสารสกัดจากราเอนโดไฟต์ สายพันธุ์ WAC9 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง 3) เมื่อสัมผัสกับสารสกัดจากราเอนโดไฟต์ สายพันธุ์ WAC9 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง 4) เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว Jurkat ที่เกิดการอะพ็อบโทซิส เมื่อสัมผัสกับยา Etposide (ชุดควบคุมบวก) 5) เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว Jurkat ที่ไม่ได้รับสารสกัดจากราเอนโดไฟต์ 6) เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว Jurkat ไม่เกิดการอะพ็อบโทซิส เมื่อสัมผัสกับ DMSO (ชุดควบคุมลบ) ลูกศรสีแดง หมายถึงเซลล์ที่ตายแบบอะพ็อบโทซิส

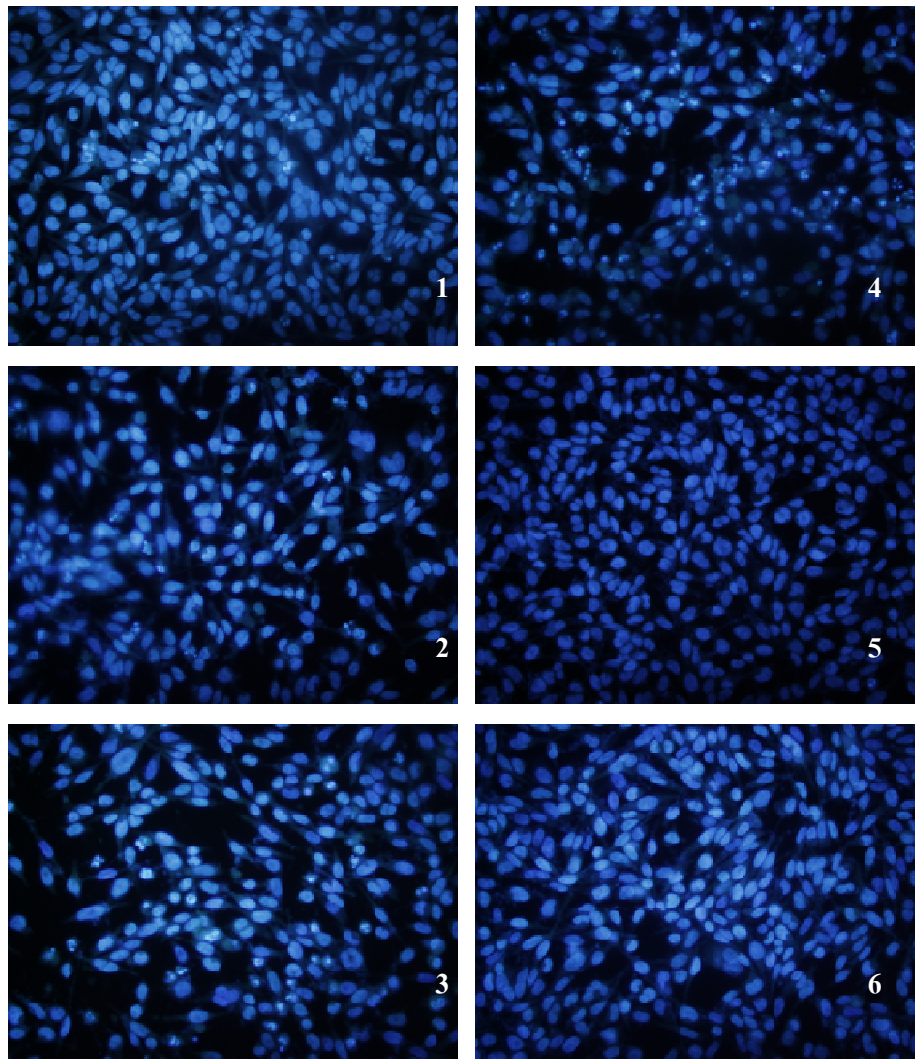
สารสกัดจากราเอนโดไฟต์ไอโซเลต WGE2 มีการหดตัวของเซลล์ และนิวเคลียส เหมือนกับชุดควบคุมบวก ดังแสดงในรูปที่ 4.13 และ 4.15 ลูกศรสีแดง คือเซลล์ที่เกิดการอะพ็อบโทซิส แสดงให้เห็นว่า ราเอนโดไฟต์ไอโซเลต WGE2 กระตุ้นเซลล์มะเร็งลำไส้ (SW620) ให้เกิดการตายแบบอะพ็อบโทซิสได้โดยเปอร์เซ็นต์การตายแบบอะพ็อบโทซิสที่ 24 48 และ 72 ชั่วโมงเท่ากับ 8% 12% 12% ตามลำดับ (รูปที่ 4.14)



รูปที่ 4.13 การเกิดอะพ็อบโทซิสในเซลล์มะเร็งลำไส้ SW620



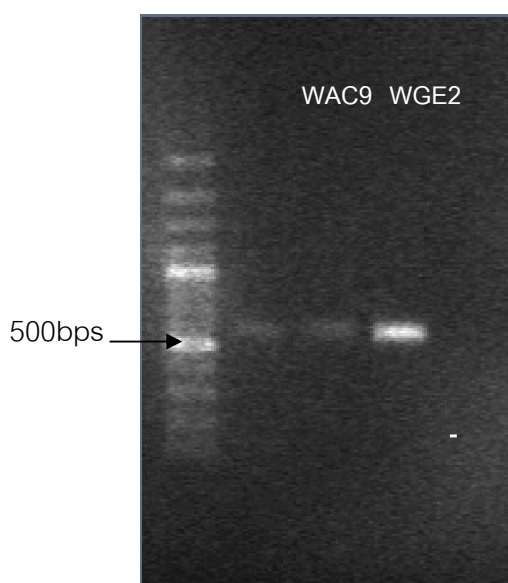
รูปที่ 4.14 ปริมาณการเกิดอะพ็อบโทซิสในเซลล์มะเร็งลำไส้ SW620



รูปที่ 4.15 การเกิดอะพ็อบโทซิสในเซลล์มะเร็งลำไส้ SW620 1) เมื่อสัมผัสกับสารสกัดจากราเอนโดไฟต์ สายพันธุ์ WGE2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง 2) เมื่อสัมผัสกับสารสกัดจากราเอนโดไฟต์ สายพันธุ์ WGE2 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง 3) เมื่อสัมผัสกับสารสกัดจากราเอนโดไฟต์ สายพันธุ์ WGE2 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง 4) เซลล์มะเร็งลำไส้ SW620 ที่เกิดการอะพ็อบโทซิส เมื่อสัมผัสกับยา Etoposide (ชุดควบคุมบวก) 5) เซลล์มะเร็งลำไส้ SW620 ที่ไม่ได้รับสารสกัดจากราเอนโดไฟต์ 6) เซลล์มะเร็งลำไส้ SW620 ไม่เกิดการอะพ็อบโทซิส เมื่อสัมผัสกับ DMSO (ชุดควบคุมลบ) ลูกศรสีแดง หมายถึงเซลล์ที่ตายแบบอะพ็อบโทซิส

4.9) การจำแนกราเอนโดไฟต์ไอโซเลต WAC9 และ WGE2 โดยวิเคราะห์ลำดับเบสของ ยีนที่ประมวลรหัส 16S rRNA

ทำการสกัด และเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของราเอนโดไฟต์ WAC9 และ WGE2 ด้วยปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอเรส เพื่อวิเคราะห์หาลำดับเบสของยีนประมวลรหัส 16S rRNA ซึ่งมีขนาดประมาณ 600 คู่เบส (base pairs; bp) ทำการตรวจสอบขนาดของ PCR product เบื้องต้นด้วยวิธีอะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ดังแสดงในรูปที่ 4.17



รูปที่ 4.16 ขนาดของ PCR product เมื่อใช้ไพรเมอร์ชนิดต่างๆ บนอะกาโรสเจล

จากนั้นทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ ตรวจสอบดีเอ็นเออีกครั้งด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ส่งตัวอย่าง PCR product ของราเอนโดไฟต์ WAC9 และ WGE2 เพื่อวิเคราะห์หาลำดับเบสของ ยีนประมวลรหัส 16S rRNA ที่สำนักงานวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.)

จากนั้นนำลำดับเบสที่วิเคราะห์ได้ของราเอนโดไฟต์ทั้งสองสายพันธุ์ มาเปรียบเทียบกับ ลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัส 16S rRNA ที่รวบรวมไว้ในฐานข้อมูลยีน (Gene Bank database) จากเว็บไซต์ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (เมษายน 2552)

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          10          20          30          40          50
WAC9_ITS CGTAGGGGTG AACCTGCGGA GGGATCATT TCGAGTTACC GTCCTTATA

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          60          70          80          90         100
WAC9_ITS ACCCTTTGTG AACATACCCC AAACGTTGCC TCGGCGGGCA GCCGGAGCCC

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          110         120         130         140         150
WAC9_ITS AGCTCCGTG CCGGAGCCG CCGTCTCGGC GCGCCCCACC CGCCGGCGGA

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          160         170         180         190         200
WAC9_ITS CCACCAAAC CTATTTAAAC GACGTCTCTT CTGAGTGGCA CAAGCAAATA

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          210         220         230         240         250
WAC9_ITS ATCAAAACTT TTAACAACGG ATCTCTTGGT TCTGGCATCG ATGAAGAACG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          260         270         280         290         300
WAC9_ITS CAGCGAAATG CGATAAGTAA TGTGAATTGC AGAATTCAGT GAATCATCGA

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          310         320         330         340         350
WAC9_ITS ATCTTTGAAC GCACATTGCG CCCGCCAGCA TTCTGGCGGG CATGCCTGTT

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          360         370         380         390         400
WAC9_ITS CGAGCGTCAT TTCAACCCTC AAGCACCGCT TGGCGTTGGG GCCCTACGGC

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          410         420         430         440         450
WAC9_ITS TTCCGTAGGC CCCGAAATAC AGTGGCGGAC CCTCCCGGAG CCTCCTTTGC

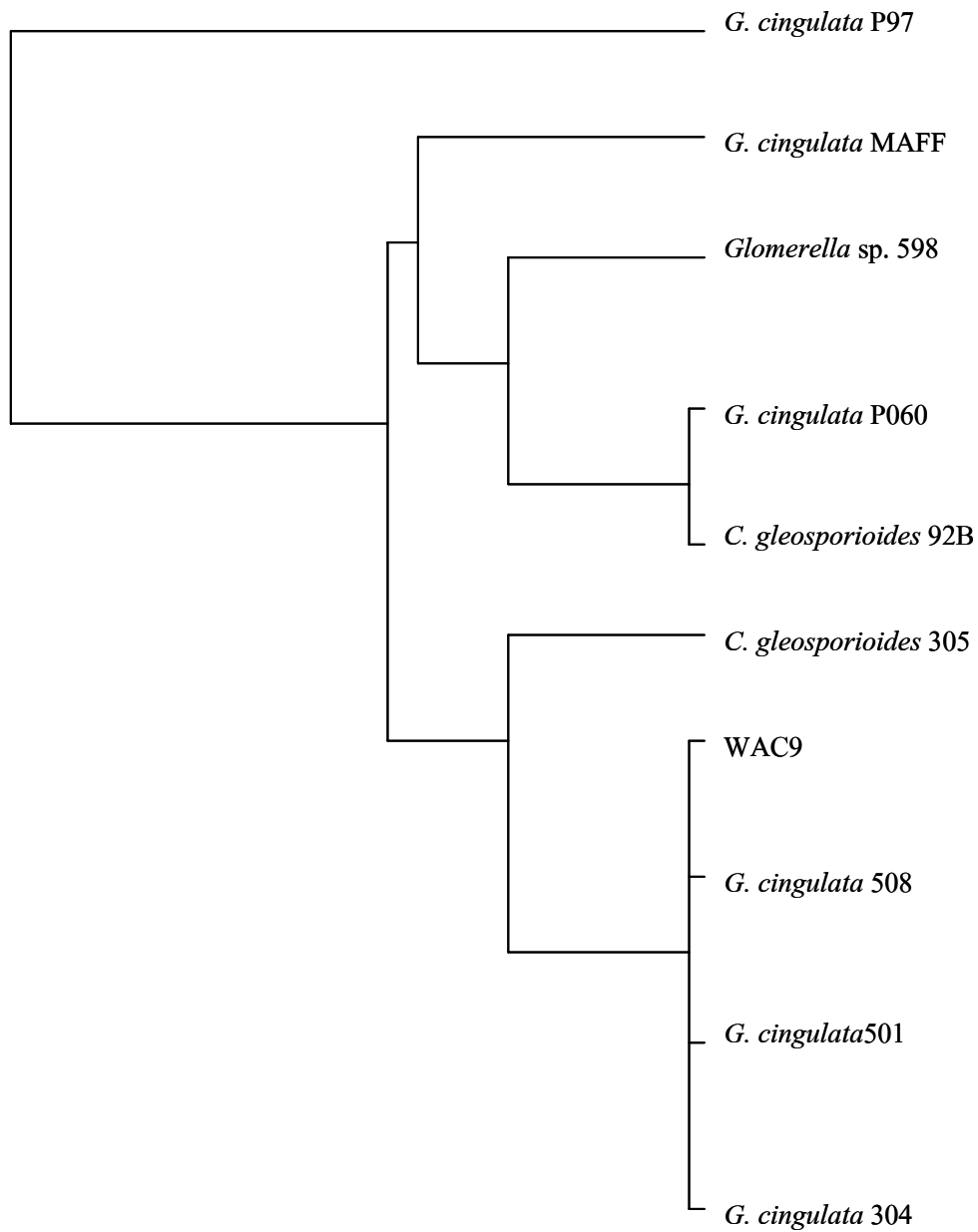
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          460         470         480         490         500
WAC9_ITS GTAGTAACAT ACCACCTCGC ACTGGGATCC GGAGGGACTC CTGCCGTAAA

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          510         520         530         540         550
WAC9_ITS ACCCCCCAAT TTTCCAAGG TTGACCTCGG ATCAGGTAGG AATACCCGCT

.....|.....|.....|
          560
WAC9_ITS GAACTTAAGC ATATC

```

รูปที่ 4.17 แสดงลำดับเบสของราเอนโดไฟต์ WAC9



รูปที่ 4.18 ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของราเอนโดไฟต์ WAC9

เมื่อทำการเปรียบเทียบข้อมูลพบว่าสายพันธุ์ WAC9 มีระดับความเหมือน (% identity) เท่ากับ 100% คล้ายกับยีนที่ประมวลรหัส 16S rRNA ของ *Glomerella cingulata* GC0514 *Glomerella cingulata* GC0508 *Glomerella cingulata* GC0304

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      10      20      30      40      50
WGE2_ITS CGTTGGTGAA CCAGCGGAGG GATCATTGCT GGAACGCGCT TCGGCGCACC

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      60      70      80      90     100
WGE2_ITS CAGAAACCCCT TTGTGAACTT ATACCTTACT GTTGCCCTCGG CGCAGGCCGG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     110     120     130     140     150
WGE2_ITS CCTCTTAGCT GAGGCCCCCC GGAGACGGGG AGCAGCCCGC CGGCGGCCAA

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     160     170     180     190     200
WGE2_ITS CCAAACCTCTT GTTTCTACAG TGAATCTCTG AGTAAAAAAC ATAAATGAAT

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     210     220     230     240     250
WGE2_ITS CAAAACCTTC AACACGGAT CTCTTGGTTC TGGCATCGAT GAAGAACGCA

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     260     270     280     290     300
WGE2_ITS GCGAAATGCG ATAAGTAATG TGAATTGCAG AATTCAGTGA ATCATCGAAT

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     310     320     330     340     350
WGE2_ITS CTTTGAACGC ACATTGCGCC CTCTGGTATT CCGGAGGGCA TGCCTGTTCG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     360     370     380     390     400
WGE2_ITS AGCGTCATTT CAACCCTCAA GCCTGGCTTG GTGTTGGGGC ACTGCTTCGA

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     410     420     430     440     450
WGE2_ITS GAGAAGCAGG CCCTGAAATC TAGTGCGCAG CTCGCTAGGA CCCCGAGCGT

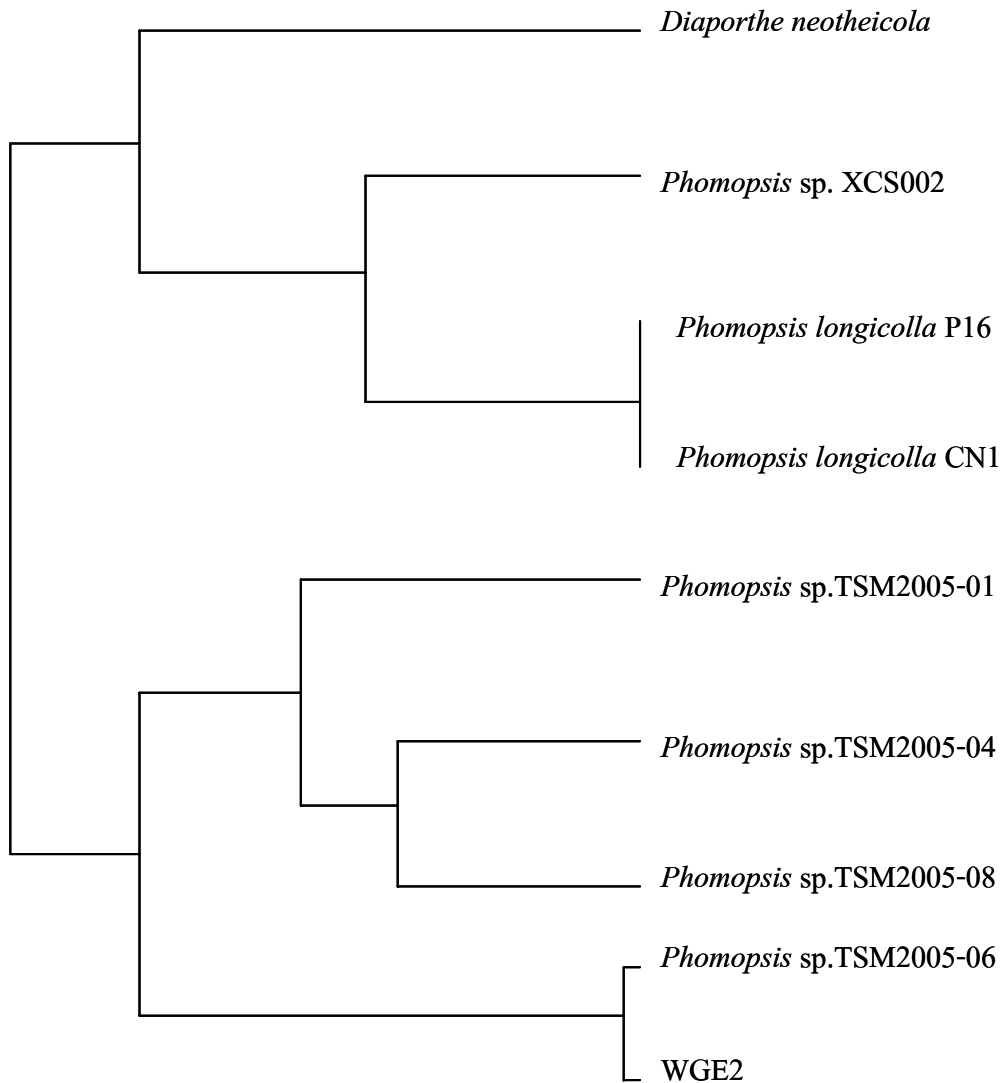
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     460     470     480     490     500
WGE2_ITS AGTAGTTATA TCTCGTTCTG GAAGGCCCTG GCGGTGCCTG CCCGTAAAC

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     510     520     530     540     550
WGE2_ITS CCCCAACTTC TGAAATTTTG ACCTCGGATC AGGTAGGAAT ACCGCTGACT

..
WGE2_ITS TA

```

รูปที่ 4.19 แสดงลำดับเบสของราเอนโดไฟต์ WGE2



รูปที่ 4.20 ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของราเอนโดไฟต์ WGE2

สายพันธุ์ WGE2 มีระดับความเหมือน (% identity) เท่ากับ 98% คล้ายกับยีนที่ประมวลรหัส 16S rRNA ของ *Phomopsis* sp. TSM 2005-06

บทที่ 5

สรุป และอภิปรายผลการทดลอง

ประเทศไทยมีพื้นที่ป่าจัดอยู่ในป่าเขตร้อน (Tropical forest) มีความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตสูงโดยเฉพาะความหลากหลายทางด้านจุลินทรีย์ โดยราเป็นจุลินทรีย์กลุ่มหนึ่งที่มีบทบาทต่อระบบนิเวศวิทยาป่าไม้ และเป็นแหล่งพันธุกรรมที่สำคัญแหล่งหนึ่ง (genetic resource) ที่จะนำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ การเกษตรและอุตสาหกรรมต่างๆ ซึ่งการศึกษาวิจัยในปัจจุบันนี้ได้มีเทคโนโลยีทางชีวภาพเข้ามามีบทบาทในชีวิตประจำวัน ไม่ว่าจะทางด้านอาหาร ยา วัคซีนโรค เนื่องจากมีโรคใหม่ๆ เกิดขึ้นมากมายรวมทั้งการดื้อยาของโรคต่างๆ ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะมีการศึกษาวิจัยที่จะหาแหล่งในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพใหม่ๆ ด้วยเหตุนี้ความหลากหลายของราที่ได้จากป่าจึงนับว่าเป็นแหล่งทรัพยากรที่สำคัญแหล่งหนึ่ง ประเทศไทยมีแหล่งทรัพยากรป่าไม้อย่างมากมายแต่กลับขาดข้อมูลการสำรวจศึกษาเกี่ยวกับราที่ได้จากป่าอย่างจริงจัง จากการศึกษาวิจัยทั้งต่างประเทศและในประเทศพบว่ามีรากลุ่มหนึ่งที่อาศัยอยู่ในพืชและมีความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ รากลุ่มนี้คือ ราเอนโดไฟต์

ราเอนโดไฟต์เป็นราที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชที่มีชีวิตบริเวณทั้งในเซลล์และช่องว่างระหว่างเซลล์พืช ในส่วนของเปลือกไม้ เนื้อไม้ ก้านใบ ใบ และรากของพืชชั้นสูง โดยมีความสัมพันธ์กับพืชในลักษณะที่เป็นภาวะพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกัน (mutualism)

ในการศึกษารั้งนี้ทำการแยกราเอนโดไฟต์จากใบพืชในป่าเต็งรัง 9 ชนิด โดยแยกราเอนโดไฟต์ทั้งหมด 231 ไอโซเลตจากชิ้นส่วนใบไม้ทั้งหมด 340 ชิ้น โดยใช้การคำนวณความถี่ของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้ในการเปรียบเทียบ ราเอนโดไฟต์ที่แยกได้ในฤดูฝนมีจำนวนมากกว่าราเอนโดไฟต์ที่แยกได้ในฤดูแล้ง โดยเปรียบเทียบจากความถี่ของราเอนโดไฟต์ทั้ง 2 ฤดู ความถี่ของราเอนโดไฟต์ในฤดูฝนและฤดูแล้งคือ 75.5 และ 59.3 ตามลำดับ นอกจากนี้ความหลากหลายทางชีวภาพของราเอนโดไฟต์ในฤดูฝนมีมากกว่าในฤดูแล้งด้วย โดยราเอนโดไฟต์ที่พบในฤดูฝน คือ 13 สกุล 21 ชนิด และฤดูแล้งคือ 7 สกุล 20 ชนิด จากผลการทดลองแสดงให้เห็นปริมาณน้ำฝนเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ราเอนโดไฟต์แฝงตัวอาศัยอยู่ในพืชมากขึ้น และเมื่อปริมาณน้ำฝนลดลงการเข้าแฝงตัวภายในพืชก็ลดลงเช่นกัน (Carroll และ Carroll, 1978; Rodrigues, 1994; Wilson, 2000) ซึ่งปริมาณน้ำฝนโดยเฉลี่ย 1 เดือนก่อนเก็บในตัวอย่างในฤดูฝนเท่ากับ 8.8 มิลลิเมตรต่อวัน แต่ในฤดูแล้งไม่มีฝนตกเลย นอกจากปริมาณน้ำฝนซึ่งเป็นปัจจัยระดับมหภาคแล้วยังมีปัจจัยอื่นๆ

ที่ส่งผลให้การแผ่ตัวของราเอนโดไฟต์ภายในพืชเพิ่มขึ้น เช่น ปริมาณเมฆ ระดับภูมิประเทศ ปริมาณหมอก ความชื้นสัมพัทธ์ ลม อุณหภูมิ แร่ธาตุในดิน (Helander, 1994; Carroll, 1995) และปัจจัยระดับจุลภาคเช่น ขนาดชิ้นส่วนของพืชตัวอย่าง อายุของพืชตัวอย่าง ชนิดของตัวอย่าง พืช ตำแหน่งของกิ่งไม้ ความสูงของต้นไม้ (Bernstein และ Carroll, 1977; Petrini และ Carroll, 1981; Fisher, Anson และ Petrini, 1986) เป็นต้น จากผลการศึกษาพบว่าราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากใบกระโดน (*Careya sphaerica*) ซึ่งมีขนาดใหญ่ที่สุดมีจำนวนมากที่สุด ซึ่งขนาดของใบไม้ที่ใหญ่สามารถที่จะมีการแผ่ตัวของราเอนโดไฟต์เพิ่มขึ้น (Mekkamol, 1998) จุดที่น่าสังเกตอีกอย่างเมื่อเปรียบเทียบจำนวนของราเอนโดไฟต์ต่อขนาดเฉลี่ยของใบพืชตัวอย่างพบว่า จำนวนของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้ไม่ได้เพิ่มตามขนาดของใบพืช ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีปัจจัยอย่างอื่นที่เข้ามาเกี่ยวข้องกับปริมาณการแผ่ตัวในใบพืชตัวอย่างดังที่กล่าวมาข้างต้น

ราเอนโดไฟต์ทั้งหมด 231 ไอโซเลตถูกจัดจำแนกตามลักษณะสัณฐานวิทยาได้ทั้งสิ้น 37 สกุล โดย *mycelia sterilia* sp.2 เป็นราเอนโดไฟต์ที่เด่นในฤดูฝน และ *Paecilomyces* sp.1 เป็นราเอนโดไฟต์ที่เด่นในฤดูแล้ง ระดับความหลากหลายทางชีวภาพของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากป่าเต็งรังจังหวัดตากคล้ายกับรายงานจากป่าเขตร้อนและในเขตป่าอบอุ่น (Fisher และคณะ, 1992 Bacon และ White, 1994) และพบราเอนโดไฟต์ที่มักจะพบอยู่เสมอไม่ว่าจะเป็น *Phomopsis* ssp., *Xylaria* ssp., *Phyllosticta* sp. ความหลากหลายทางชีวภาพของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากป่าเต็งรังจังหวัดตากนั้นมีความหลากหลายทางชีวภาพน้อยกว่าทั้งในแง่จำนวนและชนิดของราเอนโดไฟต์เมื่อเปรียบเทียบกับราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากดอยสุเทพ-ปุย (Lumyong, 1998)

จากการศึกษาความกระจายของราเอนโดไฟต์โดยใช้ Hierarchical cluster analysis ในโปรแกรม SPSS จากผลการศึกษาพบว่าราเอนโดไฟต์ที่แยกจากต้นพืชที่อยู่ในบริเวณใกล้เคียงกันจะมีใกล้เคียงกันของชนิดราเอนโดไฟต์ จึงยืนยันทฤษฎีการแพร่กระจายของราเอนโดไฟต์ว่าเป็นแบบกระจายตามพื้นราบ (horizontal) ซึ่งอาศัยลม น้ำ ในการแพร่กระจายสปอร์ออกไป (Carroll, 1988; Helander และคณะ, 1994) ซึ่งต้นไม้ที่อยู่บริเวณใกล้เคียงกันมักจะมีชนิดของราเอนโดไฟต์คล้ายกัน

ในฤดูฝนพบราเอนโดไฟต์หลากหลายชนิด เช่น *Colletotrichum* sp. *Fusarium* sp. *Nigrospora* sp. *Phomopsis* spp. *Peatalotiopsis* sp. และกลุ่ม *mycelia sterilia* โดย *Phomopsis* spp เป็นกลุ่มราเอนโดไฟต์ที่เด่นถ้ามองในแง่จำนวนชนิดที่พบ นอกจากนั้นยังเป็นราเอนโดไฟต์ที่พบเสมอในการแยกจากป่าที่มีความชื้นสูง (Fisher และคณะ, 1993; 1994;

Rodrigues, 1994) เนื่องจากเป็นราเอนโดไฟต์ที่อาศัยน้ำในการสร้างโคนิเดียและการเข้าไปอาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืช (Wilson และ Carroll, 1994)

ราเอนโดไฟต์ที่เด่นในฤดูแล้งคือกลุ่ม *Paecilomyces* spp. และมีจำนวนไอโซเลตมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบทั้ง 2 ฤดูกาล ซึ่งสปอร์ของกลุ่ม *Paecilomyces* spp. สามารถที่จะเจริญในสภาพที่มีปริมาณน้ำน้อยและอากาศแห้งแล้ง ในขณะที่ราชนิดอื่นไม่สามารถที่จะทนสภาพแวดล้อมเช่นนี้ได้ นอกจากนี้กลุ่มราที่พบมากในฤดูแล้งอีกชนิดหนึ่งคือกลุ่ม *Xylaria* spp. ซึ่งพบถึง 12 ชนิดในฤดูแล้ง ซึ่งในการศึกษาของ Mekkamol (1998) ก็พบกลุ่ม Xylariaceae มากที่สุดในเดือนพฤศจิกายน และในการศึกษาของ Chareprasert (2001) ก็สามารถแยกราเอนโดไฟต์กลุ่ม Xylariaceae ถึงเดือนธันวาคม ดังนั้นจึงไม่น่าแปลกใจที่ในการศึกษานี้พบราเอนโดไฟต์กลุ่ม Xylariaceae ในเดือนมกราคม

ในการจำแนกราเอนโดไฟต์พบว่าราเอนโดไฟต์ส่วนใหญ่มักที่จะไม่สร้างสปอร์ ซึ่งจำทำให้ยากในการจำแนกราชนิดนั้นๆ ได้ บางทีอาจจำเป็นรอการสร้างสปอร์เป็นระยะเวลาช้านาน ในการศึกษาหากพบราเอนโดไฟต์ไอโซเลตไม่สร้างสปอร์จะนำไปเพาะเลี้ยงในอาหาร Sabouraud dextrose agar (SDA) malt extract agar (MEA) และ oat meal (OM) เพื่อกระตุ้นให้เกิดการสร้างสปอร์ หากไม่สร้างสปอร์จะจัดอยู่ในกลุ่ม mycelia sterilia และทำการจำแนกโดยอาศัยวิธีอย่างหยาบ ซึ่งปัจจุบันได้นำเทคนิคทางอณูชีววิทยามาช่วยในการจำแนกราเอนโดไฟต์ (Guo และคณะ 2000; 2003)

ในการศึกษาการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของราเอนโดไฟต์ นำราเอนโดไฟต์ที่แยกได้ทั้ง 2 ฤดูกาลเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ป่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 เดือน กรองส่วนของเส้นใย จากนั้นนำส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อไปทดสอบความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ โดยทำการทดสอบกับจุลินทรีย์ทดสอบ 5 ชนิดด้วยเทคนิค paper-disk diffusion พบว่ามีราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ DSO2 เพียงแค่สายพันธุ์เดียวที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้แบบ broad spectrum และเมื่อนำมาจัดกลุ่มการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ สามารถจัดกลุ่มการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้เป็น 5 กลุ่ม คือ ยับยั้งเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก เฉพาะแบคทีเรียแกรมลบ เฉพาะแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ เฉพาะแบคทีเรียแกรมบวกและยีสต์ เฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบและยีสต์ จำนวน 11 9 4 3 และ 3 สายพันธุ์ตามลำดับ

จากนั้นนำส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อของราเอนโดไฟต์ ส่วนของเส้นใย มาทำการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง โดยทดสอบกับเซลล์มะเร็ง 7 ชนิด

เซลล์ปกติ 1 ชนิด ด้วยวิธี MTT assay พบว่าราเอนโดไฟต์ที่แยกได้ส่วนใหญ่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้แตกต่างกัน

จากการศึกษาการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบและยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง พบว่าราเอนโดไฟต์ในกลุ่ม Xylariaceae สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ค่อนข้างดี โดยมีราเอนโดไฟต์ในกลุ่ม Xylariaceae 12 จาก 14 ชนิดที่สร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบและเซลล์มะเร็งแตกต่างกันไป ซึ่งความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพนั้นเป็นคุณสมบัติที่น่าสนใจของราในกลุ่ม Xylariaceae (Whalley, 1985) นอกจากนี้ราเอนโดไฟต์ชนิดอื่นๆ ได้แก่ *Pestalotiopsis* sp. *Phomopsis* spp. *Nigrospora* sp. *Glomerella* sp. *Fusarium* sp. และกลุ่มรา mycelia sterilia บางสายพันธุ์ที่มีการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยกลุ่มราเอนโดไฟต์ที่กล่าวมานี้บางสายพันธุ์มีรายงานเกี่ยวกับการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอยู่แล้ว (Horn และคณะ, 1995; Brandy และคณะ, 2000; Harper และคณะ, 2003) จากการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งมีสายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งแบบจำเพาะเจาะจงเพียง 2 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ WGE2 มีความสามารถในการยับยั้งมะเร็งลำไส้ใหญ่ (SW620) และราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ WAC9 มีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (Jurkat)

นำราเอนโดไฟต์ทั้ง 2 สายพันธุ์นี้มาทำการทดสอบการกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งตายแบบอะพ็อทโทซิส โดยความสำคัญของการศึกษาเกี่ยวกับการกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งตายแบบอะพ็อทโทซิส นั้นเพื่อที่จะควบคุมความสมดุลของเซลล์ภายในร่างกายและไม่ทำให้เกิดอันตรายต่อเซลล์ข้างเคียง นอกจากนั้นยังมีการศึกษาในเรื่องนี้ไม่มากนัก โดยสามารถสังเกตการตายแบบอะพ็อทโทซิสของเซลล์ได้จากการบวมของเซลล์ การเปลี่ยนแปลงของ 10 เยื่อหุ้มเซลล์ เช่น การเหี่ยวของเซลล์, 11 นิวเคลียส แยกเป็นชิ้นส่วน, 12 โครมาติน หนาตัวขึ้น, และ 13 ดีเอ็นเอ แยกเป็นท่อน โดยการย้อมสี Hoechst 33342 จากนั้นนำไปเซลล์ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนซ์ จากผลการทดลองพบว่าราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ WAC9 สามารถกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งตายแบบอะพ็อทโทซิสได้ 56 เปอร์เซ็นต์ 72 เปอร์เซ็นต์ และ 23 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเวลาผ่านไป 24 48 และ 72 ชั่วโมงตามลำดับ ส่วนราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ WGE2 สามารถกระตุ้นให้เกิดการตายแบบอะพ็อทโทซิสได้เช่นกัน แต่กระตุ้นได้จำนวนที่ต่ำมากคือ 8 เปอร์เซ็นต์ 12 เปอร์เซ็นต์ และ 12 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเวลาผ่านไป 24 48 และ 72 ชั่วโมงตามลำดับ

ในการศึกษาครั้งนี้ให้น้ำหนักในการคัดเลือกราเอนโดไฟต์ โดยการเลือกราเอนโดไฟต์ที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ยับยั้งเซลล์มะเร็งแบบจำเพาะเจาะจง จึงเลือกราเอนโด

ไฟต์ WGE2 และ WAC9 ทั้ง 2 สายพันธุ์ มาจำแนกด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยาที่เย็นประมวลรหัส 16s rRNA เพื่อจำแนกชนิดของสายพันธุ์ราเอนโดไฟต์

จากการวิเคราะห์เย็นประมวลรหัส 16s rRNA พบว่าราเอนโดไฟต์ WGE2 และ WAC9 มีขนาด 552 และ 565 bp ตามลำดับ เมื่อนำลำดับเบสมาเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูลจากเว็บไซต์ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> สายพันธุ์ WGE2 มีระดับความเหมือน (% identity) เท่ากับ 98% คล้ายกับเย็นที่ประมวลรหัส 16S rRNA ของ *Phomopsis* sp. TSM 2005-08 และสายพันธุ์ WAC9 มีระดับความเหมือน (% identity) เท่ากับ 100% คล้ายกับเย็นที่ประมวลรหัส 16S rRNA ของ *Glomerella cingulata* GC0514 *Glomerella cingulata* GC0508 *Glomerella cingulata* GC0304

ในงานวิจัยนี้ได้บรรลุวัตถุประสงค์ คือ ได้ศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากใบพืชในบริเวณป่าเต็งรัง จังหวัดตาก ได้จัดจำแนกสกุล และชนิดของราเอนโดไฟต์ ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของราเอนโดไฟต์ และสามารถแยกราเอนโดไฟต์ที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพยับยั้งจุลินทรีย์และเซลล์มะเร็งได้

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- กฤต เพชรสุวรรณ, วินัส สุวรรณนันต์ และ ศวรี ตันติสกุล. 2543. ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและราเอนโดไฟต์จากพืชสมุนไพรไทย โครงการการเรียนการสอนเสริมประสบการณ์ สาขาวิจัยและพัฒนาเภสัชภัณฑ์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- บำรุงศักดิ์ ปุริโส. 2340. ราเอนโดไฟต์ที่แยกจากเปลือกไม้ใหญ่ อ.กฤษณวี. วิทยานิพนธ์ปริญญา
มหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิต
วิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- รัตนา อินทรานุกุล. 2547. การตรวจสอบและการสกัดแยกสารสำคัญจากสมุนไพร
สำนักพิมพ์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาษาอังกฤษ

- Arnold, A.E., Maynard, Z., Gilbert, G.S., Coley, P.D. and Kursar, T.A. 2000. Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? Ecological Letters 3: 267–274.
- Arnold, A.E., Mejía, L.C., Kyllo, D., Rojas, E.I., Maynard, Z., Robbins, N. and Herre, E.A. 2003. Fungal endophytes limit pathogen in a tropical tree. Proceedings of the National Academy of Sciences 100: 15649–15654.
- Arnold, A.E., Maynard, Z. and Gilbert, G.S. 2001. Fungal endophytes in dicotyledonous neotropical trees: patterns of abundance and diversity. Mycological Research 105: 1502–1507.
- Bacon, C.W. and White, J.F. 1994. *Biotechnology of endophytic fungi of grasses*. Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Bacon, C. W., and J. F. White. 2000. Microbial endophytes. Marcel Dekker Inc., New York
- Bayman, P., Angulo-Sandoval, P. and Báez-Ortiz, Z. 1998. Distribution and dispersal of *Xylaria* endophytes in two trees species in Puerto Rico. Mycological Research 102: 944–948.

- Bennett, H.L. and Hunter, B.B. 1987. Illustrated genera of imperfect fungi. 4th ed. MacMillan, New York
- Bernstein, M. E., Carroll, G. C. 1977. Internal fungi in old growth Douglas-fir foliage. Canadian Journal of Botany 55: 644-653.
- Bills, G.F. 1996. Isolation and analysis of endophytic fungal communities from woody plants. In: *Endophytic fungi in grasses and woody plants* (Redlin, S.C. and Carris, L.M. eds.), pp. 31–65. St. Paul, Minnesota: APS Press.
- Bills, G., Dombrowski, A., Pelaez, F., Polishook, J. and An, Z. 2002. Recent and future discoveries of pharmacologically active metabolites from tropical fungi, p. 165-194. In R. Watling, J. C. Frankland, A. M. Ainsworth, S. Issac, and C. H. Robinson. (ed.), Tropical mycology: micromycetes, vol. 2. CABI Publishing, New York, N.Y.
- Blodett, J. T., Swart, W. J., Louw, S. M., and Week, W. J. 2000. Species composition of endophytic fungi in *Amaranthus hybridus* leaves, petioles stem, and roots. Mycologia.92(5): 853-859
- Brandy, S. F., and Clardy, J. 2000. CR377, a new pentaketide antifungal agent isolated from an endophytic fungus. Journal of Natural Product. 63:1447–1448
- Bryan, G.T., Daniels, M.J. and Osbourn, A.E. 1995. Comparison of fungi within *Gaeumannomyces-Phialophora* complex by analysis of ribosomal DNA sequences. Applied and Environmental Microbiology 61: 681–689.
- Bussaban, B., Lumyong, P., McKenzie, E.H.C., Hyde, K.D. and Lumyong, S. 2003a. *Xenosporium amomi* sp. nov. from *Zingiberaceae* in Thailand. Fungal Diversity 14: 61–66.
- Bussaban, B., Lumyong, S., Lumyong, P., Hyde, K.D. and McKenzie, E.H.C. 2003b. Three new species of *Pyricularia* isolated as zingiberaceous endophytes from Thailand. Mycologia 95: 519–524.
- Bussaban, B., Lumyong, S., Lumyong, P., McKenzie, E.H.C. and Hyde, K.D. 2001. Endophytic fungi from *Amomum siamense*. Canadian Journal of Microbiology 47: 943–948.

- Carroll, F. E., Muller, E., Sutton, B. C. 1977. Preliminary studies on the incidence of needle endophytes in some European conifer. Sydowia 29: 87-103
- Carroll, G. C. and Carroll, F. E. 1978. Studies on the incidence of coniferous needles endophytes in the Pacific Northwest. Canadian-Journal of Botany 56: 3034-3043.
- Carroll, G.C. 1988. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. Ecology 69: 2–9.
- Carroll, G. C. 1995. Forest endophytes: pattern and process. Canadian Journal of Botany 73 (Suppl. 1): S1316-S1324.
- Chen J, Song X, Zhang H. 2006a. Production, structure elucidation and anticancer properties of sophorolipid from *Wickerhamiella domercqiae*. Enzyme Microb Technology; 39:501-6.
- Chen, J., Song, X., Zhang, H., Qu, Y., Miao, J. 2006b. Sophorolipid produced from the new yeast strain *Wickerhamiella domercqiae* induces apoptosis in H7402 human liver cancer cells. Apply Microbiol Biotechnology;72:52–9.
- Chinworarungsee, M., Kittahoop, P., Isaka, M., Rungrod, A., Tanticharoen, M. and Thebtaranonth, Y. 2001. Antimalarial Halorosellinic acid from the marine fungus *Halorosellinia oceanica*. Bioorganic and Medicinal Letter 11: 1965–1969.
- Currah, R.S. and Tsuneda, A. 1993. Vegetative and reproductive morphology of *Phialocephala fortinii* (Hyphomycetes, *Mycelium radialis atrovirens*) in culture. Transactions of the Japanese Mycological Society 34: 345–356.
- Daisy, B. H., Strobel, G. A., Castillo, U., Ezra, D., Sears, J., Weaver, D., and Runyon, J. B. 2002. Naphthalene, an insect repellent, is produced by *Muscodor vitigenus*, a novel endophytic fungus. Microbiology 148: 3737-3741
- De Bary, A. 1866. Morphologie und physiologie der plize. Flechten und Myxomyceten. Leipzig, Germany: Englemann.
- Desjardin, D.E., Boonpratuang, T. and Hywel-Jones, N.L. 2003. New spinose species of *Mycena* in sections *Basipedes* and *Polyadelphia* from Thailand. Fungal Diversity 12: 7–17.242

- Desjardin, D.E., Boonpratuang, T. Ruksawong, P. and Hywel-Jones, N.L. 2000. A new species of *Incrustocalyptella* from Thailand. Fungal Diversity 4: 75–79.
- Dickinson, C.H. 1976. Fungi on the aerial surface of higher plants. In: Microbiology of aerial plant surfaces (Preece, T.F. and Dickinson, C.H. eds.), pp. 293–324. London: Academic Press.
- Dreyfuss, M. M., and Chapela, I. H. 1994. Potential of fungi in the discovery of novel, low-molecular weight pharmaceuticals, p. 49-80. In V. P. Gullo (eds), *The discovery of natural products with therapeutic potential*. Butterworth-Heinemann, London, United Kingdom.
- Fisher, P. J., Petrini, O. and Amezcua, M. M. 1992. Endophytic fungi from alpine and Mediterranean species of *Thymus*. Nova Hedwigia 55 : 473-477.
- Fisher, P. J., Petrini, O., Petrini, L. E. and Sutton, B. C. 1994. Fungal endophytes from the leaves and twigs of *Quercus ilex* L. from England, Majorca and Switzerland. New Phytologist 127: 133–137.
- Fisher P. J., Anson, A .E. and Petrini O. *Fungal endophytes in Ulex europaeus and Ulex gallii*. Trans. Br. mycol. Soc. 1986; (86): 153-156.
- Fisher, P. J., Petrini, O., and Sutton, B. C. 1993. A comparative study of fungal endophytes in leaves, xylem and bark of Eucalyptus in Australia and England. Sydowia 45, 2: 338-345.
- Fisher, P. J. : Petrini, O. ; and Sutton, B. C. 1994. Fungal endophytes from the leaves and twigs of *Quercus ilex* L. from England, Majorca and Switzerland. New phytologist 127: 133-137.
- Fröhlich, J., Hyde, K. D. and Petrini, O. 2000. Endophytic fungi associated with palms. Mycological Research 104: 1202–1212.244
- Fröhlich, J. and Hyde, K. D. 1999. Biodiversity of palm fungi in the tropics: are global fungal diversity estimates realistic? Biodiversity and Conservation 8: 77–1004.
- Gamboa, M .A. and Bayman, P. 2001. Communities of endophytic fungi in leaves of tropical timber tree (*Guarea guidonia*: Meliaceae). Biotropica 33: 352–360.

- Gamboa, M.A., Laureano, S. and Bayman, P. 2002. Measuring diversity of endophytic fungi in leaf fragments: does size matter? Mycopathologia 156: 41–45.
- Gardes, M. and Bruns, T. D. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. Molecular Ecology 2: 113–118.
- Gond, S. K., Verma, V. C., Kumer, V., and Kharwar, R. N. 2007. “Study of endophytic fungal community from different parts of *Aegle marmelos* Corraeae(Rutaceae) from Varanasi (India). World journal of Microbiology and Biotechnology,no. 23: 1371-1375.
- Guo, L. D., Hyde, K. D. and Liew, E. C. Y. 2000. Identification of endophytic fungi from *Livistona chinensis* based on morphology and rDNA sequences. New Phytologist 147: 617–630.
- Guo, L. D., Hyde, K. D. and Liew, E. C. Y. 2001. Detection and taxonomic placement of endophytic fungi within frond tissues of *Livistona chinensis* based on rDNA sequences. Molecular Phylogenetics and Evolution 20: 1–13.
- Guo, L. D., Huang, G. R., Wang, Y., Ho, W. H., Zheng, W. H. and Hyde, K. D. 2003. Molecular identification of white morphotype strains of endophytic fungi from *Pinus tabulaeformis*. Mycological Research 107: 680–688.
- Harper, J. K., E. J. Ford, G. A. Strobel, A. Arif, D. M. Grant, J. Porco, D. P. Tomer, and K. Oneill. 2003. Pestacin: a 1,3-dihydro isobenzofuran from *Pestalotiopsis microspora* possessing antioxidant and antimycotic activities. Tetrahedron 59:2471–2476.
- Hawksworth, D. C., and Rossman, A. Y.. 1987. Where are the undescribed fungi? Phytopathology 87:888-891.
- Hawksworth, D.L. 1991. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance and conservation. Mycological Research 95: 641–655.
- Hawksworth, D.L. 2001. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. Mycological Research 105: 1422–1432.247

- Helander, M. L., Sieber, T. N.; Petrini, O. and Neuvonen S. 1994. Endophytic fungi in Scots pine needles: spatial variation and consequences of simulated acid rain. Canadian-Journal of Botany 72: 1108-1113.
- Homchantara, N. and Coppins, B. J. 2002. New species of the lichen family *Thelotrema* in SE Asia. Lichenologist 34: 113–140.248
- Horn, W. S., Simmonds, M. S. J., Schwartz R. E., and Blaney W. M. 1995. Phomopsichalasin, a novel antimicrobial agent from an endophytic *Phomopsis* sp. Tetrahedron 14:3969–3978.
- Hyde, K. D. 2001. Where are the missing fungi? Does Hong Kong have any answers? Mycological Research 105: 1514–1518.
- Hyde, K. D. 1995. Measuring biodiversity of microfungi in the wet tropics of North Queensland. In: Measuring and monitoring biodiversity of tropical and temperate forest (Boyle, T.J.B. and Boontawee, B. eds.), pp. 271–286. Bogor, Indonesia: CIFOR.
- Hyde, K.D., Wong, S.W., Lumyong, S. and Lumyong, P. 1997. *Apiosordaria striatispora*, an endophyte of *Mesua ferrea* and *Prunus arborea* from Thailand. Mycoscience 38: 437–439.
- Hywel-Jones, N. L. and Boonpratuang, T. 2001. An updated preliminary checklist of fungi recorded from Thailand. BIOTEC, database.250
- Jariangprasert, S., Archer, A. W., Elix, J. A. and Anusarnsunthorn, V. 2002. Two new species in the lichen genus *Pertusaria* (Ascomycotina) from Thailand. Mycotaxon 83: 353–356.
- Jariangprasert, S., Archer, A. W., Elix, J. A. and Anusarnsunthorn, V. 2003. New taxa in the lichen genus *Pertusaria* (lichenized Ascomycotina) from Thailand. Mycotaxon 85: 289–295.
- Jiao, R. H., Xu, S., Liu, J. Y., Ge, H. M., Ding, H., Xu, C., Zhu, H. L. and Tan, R. X. 2006. Chaetominine, a cytotoxic alkaloid produced by endophytic *Chaetomium* sp. IFB-E015. Org. Lett. 8: 5709-5712.

- Johnson, J. A., and Whitney, N. J. 1989. An investigation of needle endophyte colonization patterns with respect to high and compass direction in a single crown of balsam fir (*Abies balsamea*). Canadian-Journal of Botany 67: 723-725
- Jones, E. B. G. and Hyde, K. D. 2004. Introduction to Thai fungal diversity. In: *Thai fungal diversity* (Jones, E.B.G., Tantichareon, M. and Hyde, K.D. eds.), pp. 1–6. Thailand: BIOTEC.251
- Ju, Y., Sacalis, J. N., and Still, C. C. 1998. Bioactive Flavonoids from Endophyte-Infected blue Grass (*Poa ampla*). Journal Agricultural Food Chemistry. 46(9): 3785-3788.
- Kim S, Kim J, Seol H, Hyun J, Hwaseon Y. Surfactin from *Bacillus subtilis* displays anti proliferative effect via apoptosis induction, cell cycle arrest and survival signaling suppression. FEBS letters 2007;581:865-71.
- Kirk, P. M., Cannon, P. F., David, J.C. and Stalpers, J.A. 2001. *Ainsworth and Bisby's dictionary of the fungi*, 9th ed. London: CAB Publishing.
- Kumar, D. S. S. and Hyde, K.D. 2004. Biodiversity and tissue-recurrence of endophytic fungi in *Tripterygium wilfordii*. Fungal Diversity 17: 69–90.
- Larry, A. C., Findlay, J. A., Miller, D. and Whitney, N. J. 1992. Metabolites toxic to spruce budworm from balsam fir needle endophytes. Mycol. Res. 94: 281-286.
- Lee, J. C., Strobel, G. A., Lobkovsky, E. and J. C. Clardy. 1996. Torreyanic acid: a selectively cytotoxic quinone dimer from the endophytic fungus *Pestalotiopsis microspora*. Journal of Organic Chemistry. 61:3232–3233.
- Liu, Z. L., Domier, L. L. and Sinclair, J. B. 1995. Polymorphism of genes coding for nuclear 18S rRNA indicates genetic distinctiveness of anastomosis group 10254 from other groups in the *Rhizoctonia solani* species complex. Applied and Environmental Microbiology 61: 2659–2664.
- Liu, J. Y., Song, Y. C., Zhang, Z., Wang, L., Guo, Z. J., Zou, W.X., and Tan, R. X. 2004. *Aspergillus fumigatus* CY018, an endophytic fungus in cynodon dactylon as a versatile producer of new and bioactive metabolite. Journal of Biotech. 114: 279-287.

- Lu, H., W. X. Zou, J. C. Meng, J. Hu, and R. X. Tan. 2000. New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua*. Plant Science. 151:67–73.
- Lumyong, S., Lumyong, P., Boontim, N., and K. D. Hyde. 1998. Distribution of endophytic fungi among indigenous plant species in Doi Suthep-Pui National Park, Thailand.
- Lumyong, S., Thongantha, S., Lumyong, P. and Tomita, F. 2000. Endophytic fungi from 13 bamboo species in Thailand. Biotechnology for Sustainable Utilization of Biological Resources in the Tropics 14: 96–101.
- Maloney, K. N., Hao, W., Xu, J., Gibbons, J., Hucul, J., Roll, D., Brady, S. F., Schroeder, F. C. and Clardy, J. (2006). Phaeosphaeride A, an inhibitor of STAT3-dependent signaling isolated from an endophytic fungus. Organic Letter. 8: 4067-4070.
- Mazzola, M., Wong, O. T. and Cook, R. J. 1996. Virulence of *Rhizoctonia oryzae* and *R. solani* AG-8 on wheat and detection of *R. oryzae* in plant tissue by PCR. Phytopathology 86: 354–360.
- Mckillop, A., Schrum, O., Anick, L., Omarane, B. 2004. Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mutants with enhance resistance to the anticancer drug bleomycin. Curr Genet;45:256-72.
- Mekkamol, S. 1998. Endophytic fungi in *Tectona grandis* L. (teak). Doctorail dissertation, Liverpool John Moore University
- Miles, C. O. 1998. Endophytic Fungi in Indigenous Australasian Grasses Associated with Toxicity to Livestock. Applied and Enviromental Microbiology 64 , 2: 601-606
- Munday-Finch, S. C., Wilkins, A. L., and Mile, C. O. 1998. Isolation of Lolicine A, Lolicine B, Lolitriol and Loliterm N from *Lolium perenne* infected with *Neotyphodium lolii* and evidence for the natural occurrence of 31-Epiloliterm F. Journal of Agriculture Food chemistry. 46: 590-598
- 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.
- Panthong, A., Kanjanapothi, D., Taesotikul, T. and Taylor, W. C. 1991. Ethnobotanical review of medicinal plants from Thai traditional book. Part II: Plants with antidiarrheal, laxative and carminative properties. Journal of Ethnopharmacology 31: 121–156.
- Petrini, O. and Muller, E. 1979. Pilzliche Endophyten, am Beispiel von *Juniperus communis* L. Sydowia. 32: 224-251.
- Petrini, O. , and Carroll, G. 1981. Endophytic fungi in foliage of some Curpressaceae in Oregon. Canadian Journal of Botany 59: 629-636.
- Petrini, O. and Fisher, P. J. 1988. A comparative study of fungal endophytes in xylem and whole stem of *Pinus sylvestris* and *Fagus sylvatica*. Transactions of the British Mycological Society 91: 233–238.
- Petrini, O., 1991. Fungal endophytes of tree leaves. In J. H. Andrews ,and S. S. Hirano (eds.), Microbial Ecology of Leaves. pp. 179–197. New York: Springer-Verlag.
- Photita, W., Lumyong, P., McKenzie, E.H.C., Hyde, K.D. and Lumyong, S. 2002. A new *Dictyosporium* species from *Musa acuminata* in Thailand. Mycotaxon 82: 415–419.
- Photita, W., Lumyong, S., Lumyong, P. and Hyde, K. D. 2000. *Durispora musae*, a new species of ascomycetes from banana in Hong Kong. Nova Hedwigia 71:101–105.261
- Photita, W., Lumyong, S., Lumyong, P. and Hyde, K. D. 2001. Endophytic fungi of wild banana (*Musa acuminata*) at Doi Suthep-Pui National Park, Thailand. Mycological Research 105: 1508–1513.
- Pinruan, U., Jones, E. B. G. and Hyde, K. D. 2002. Aquatic fungi from peat swamp palms: *Jahnula appendiculata* sp. nov. Sydowia 54: 242–247.

- Pinruan, U., Lumyong, S., McKenzie, E.H.C., Jones, E.B.G. and Hyde, K.D. 2004a. Three new species of *Craspedodidymum* from palm in Thailand. Mycoscience 45: 177–180.
- Pinruan, U., McKenzie, E. H. C., Jones, E. B. G. and Hyde, K.D. 2004b. Two new species of *Stachybotrys*, and a key to the genus. Fungal Diversity 17: 145–157.262
- Pinruan, U., Sakayaroj, J., Jones, E. B. G. and Hyde, K. D. 2004c. Aquatic fungi from peat swamp palms: *Phruensis brunniespora* gen. et sp. nov. and its hyphomycete anamorph. Canadian Journal of Botany 96: 1161–1181.
- Promptutha, I., Hyde, K.D., Lumyong, P., McKenzie, E.H.C. and Lumyong, S. 2005a. Fungi on *Magnolia liliifera*: *Cheiromyces magnoliae* sp. nov. from dead branches. Nova Hedwigia 80: 527–532.
- Promptutha, I., Jeewon, R., Lumyong, S., McKenzie, E. H. C. and Hyde, K. D. 2005b. Ribosomal DNA fingerprinting in the identification of non sporulating endophytes from *Magnolia liliifera* (*Magnoliaceae*). Fungal Diversity 20: 167–186.
- Promptutha, I., Jeewon, R., Lumyong, S., McKenzie, E. H. C. and Hyde, K. D. 2005b. Ribosomal DNA fingerprinting in the identification of non sporulating endophytes from *Magnolia liliifera* (*Magnoliaceae*). Fungal Diversity 20:167–186.
- Pugh, G. J. F. 1972. Saprophytic fungi and seeds. In Seed ecology (ed. Heydecker, W.) pp337-345. Butterworth, London.
- Redell, P., and Gordon, V. 2002. Lessons from nature: can ecology provide new leads in the search for novel bioactive chemicals from rainforests?, In S. K. Wrigley, M. A. Hayes, R. Thomas, E. J. T. Chrystal, and N. Nicholson (ed.), Biodiversity: new leads for pharmaceutical and agrochemical industries. p. 205-212. The Royal Society of Chemistry. Cambridge, United Kingdom.
- Rodrigues, K. F. 1994. The foliar fungal endophytes of the Amazonian palm *Euterpe oleracea*. Mycologia 86: 376–385.

- Romero, A., Carrión, G. and Rico-Gray, V. 2001. Fungal latent pathogens and endophytes from leaves of *Parthenium hysterophorus* (Asteraceae). Fungal Diversity 7: 81–87.265
- Rossmann, A. Y. 1994. A strategy for an all-taxa inventory of fungal diversity. In: Biodiversity and terrestrial ecosystems (Peng, C.I. and Chen, C.H. eds.), Monograph series No. 14, pp. 169–194. Taipei: Institute of Botany, Academia Sinica.
- Saikkonen, K., Wäli, P., Helander, M. and Faeth, S. H. 2004. Evolution of endophyte-plant symbioses. Trends in Plant Science 9: 275–280.
- Sanmee, R., Yang, Z. L., Lumyong, P. and Lumyong, S. 2003. *Amanita siamensis*, a new species of *Amanita* from Thailand. Mycotaxon 87: 225–228.266
- Sardsus, V., Sittigul, C., Sardsud, U., Chantrasri, P. and Promin, S. 1998. Endophytic fungi in longan. In: Disease control and storage life extension in Australian Centre for International agriculture research (Fruit Coates, L.M., Hofman, P.J. and Johnson, G.I. eds.), pp. 147–152. Australia.
- Schutz, B. 2001. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites, p. 20. In British Mycological Society, international symposium proceedings: bioactive fungal metabolites—impact and exploitation. University of Wales, Swansea, Wales
- Somrithipol, S., Chatmala, I. and Jones, E. B. G. 2002a. *Cirrenalia nigrospora* sp. nov. and *C. tropicalis* from Thailand. Nova Hedwigia 75: 477–485.
- Somrithipol, S. and Jones, E. B. G. 2003a. *Berkleasmium typhae* sp. nov., a new hyphomycete on narrow-leaved cattail (*Typha angustifolia*) from Thailand. Fungal Diversity 12: 169–172.
- Somrithipol, S. and Jones, E. B. G. 2003b. *Digitoramispora lageniformis* sp. nov., a new graminicolous hyphomycete from Thailand. Nova Hedwigia 77: 373–378.
- Somrithipol, S. and Jones, E. B. G. 2003c. *Pseudoacrodictys dimorphospora* sp. nov., a new graminicolous hyphomycete from Thailand. Sydowia 55: 365–371.268

- Soytong, K. 1994. *Mushrooms and macrofungi in Thailand*. Ubon Rachthanee (in Thai: Sirithumm offset Press).
- Stierle, A. and Strobel, G. 1995. The search for taxol-producing microorganism among the endophytic fungi of Pacific Yew, *Taxus brevifolia*. Journal of Natural Product, 58(9): 1315- 1324.
- Stierle, A. A., Stierle D. B., Bugni T. 1999. Segquiatones A and B: Novel antitumor metabolites isolated from a redwood endophyte. Journal of Organic Chemistry, 64: 5479-5484.
- Strobel, G. A. 1996. Endophytic fungi: new sources for old and new pharmaceuticals. Pharmaceutical News 3: 7–9.
- Strobel, G. A., and Hess, W. M. 1997. Glucosylation of peptide leucinostatin A, produced by an endophytic fungus of European yew, may protect the host from leucinostrain toxicity. Chem. Biol. 4(7): 529-536
- Strobel, G. A., Miller, R. V. C., Condrón, M., Teplow, D. B. and Hess, W. M. 1999. Cryptocandin, a potent antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis cf. quercina*. Microbiology 145:1919–1926
- Strobel, G. A. 2002. Microbial gifts from rain forests. Can. J. Plant Pathol. 24:14–20.
- Strobel, G. A., 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.
- Suryanarayanan, T. S., Murali, T. S. and Venkatesan, G. 2002. Occurrence and distribution of fungal endophytes in tropical forests across a rainfall gradient. Canadian Journal of Botany 80: 818–826.
- Suryanarayanan, T. S., Venkatesan, G. and Murali, T.S. 2003. Endophytic fungal communities in leaves of tropical forest trees: diversity and distribution patterns. Current Science 85: 489–493.
- Suzuki, A., Uchida, M. and Kita, Y. 2002. Experimental analyses of successive occurrence of ammonia fungi in the field. Fungal Diversity 10: 141–165.270

- Taylor, J. E., Hyde, K. D. and Jones, E. B. G. 1999. Endophytic fungi associated with the temperate palm *Trachycarpus fortunei* within and outside its natural geographic range. New Phytologist 142: 335–346.
- Umali, T. E., Quimio, T. H. and Hyde, K. D. 1999. Endophytic fungi in leaves of *Bambusa tuldooides*. Fungal Science 14: 11–18.
- Von Arx J. A. 1978. The genera of fungi sporulation in pure culture. AR Gantner Verlag KG (ed) FL-9490 Vaduz. Liechtenstein.
- Wang, J., Huang, Y., Fang, M., Zhang, Y., Zheng, Z., Zhao, Y., Su W., 2002. Brefidin A, A cytotoxin produced by *Paecilomyces* sp. and *Aspergillus clavatus* isolated from *Taxus mairei* and *Torreya grandis*. FEMS Immunology and medical Microbiology. 34: 51-57.
- Whalley, A. J. L. and Edwards, R. L. 1995. Secondary metabolites and systemic arrangement within the Xylariaceae. Canadian-Journal of Botany 73 (supplement1): S802-S810
- White, T. J., Bruns, T. D., Lee, S. and Taylor, J. W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: “PCR protocols: a guide to methods and applications” (Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. S. and White, T. J. eds.), pp. 315–322. New York: Academic Press.
- White, J. F., Jr., and Morgan-Jones, G. 1996. Morphological and physiological adaptations of Balansieae and trend in the evolution of grass endophytes. In S. C. Redin, and L. M. Carris (eds.) , *Endophytic fungi in grasses and woody plants* 2nd ed., pp. 133-154. St. Paul, MN : The American Phytopathological Society.
- Wilson, D. 1995. Endophyte the evolution of a term, and clarification of its use and definition. Oikos 73: 274–276.
- Wilson, D. 2000. Ecology of woody plant endophytes. In: Bacon, CW., White, JF. Jr. (eds). Microbial endophytes. pp 389–420. Dekker, New York
- Wilson, D. and Carroll, G. C. 1994. Infection studies of *Discula quercina*, an endophyte of *Quercus garryana*. Mycologia. 86: 635-647

- Wiyakrutta, S., Sriubolmas, N., Panphut, W., Thongon, N., Danwisetkanjana, K., Ruangrunsi, N. and Meevootisom, V. 2003. Endophytic fungi with antimicrobial, anti-cancer and anti-malarial activities isolated from Thai medicinal plants. World Journal of Microbiology and Biotechnology 20: 1–8.
- Youpensuk, S., Lumyong, S., Dell, B. and Rerkasem, B. 2004. Arbuscular mycorrhizal fungi in the rhizosphere of *Macaranga denticulate* Muell. Arg., and their effect on the host plant. Agroforestry Systems 60: 239–246.
- Youpensuk, S., Rerkasem, B., Dell, B. and Lumyong, S. 2005. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on a fallow enriching tree (*Macaranga denticulate*). Fungal Diversity 18: 189–199.
- Zhou, Z., Miwa, M., and Hogetsu, T. 1999. Analysis of genetic structure of *Suillus grevillei* population in a *larix kaempferi* stand by polymorphism of Inter simple sequence repeat (ISSR). New Phytologist. 144: 55-63.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรอาหาร สารเคมี และการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Sabouraud Agar

Bacto peptone	10.0	กรัม
Glucose	4.0	กรัม
Agar	20.0	กรัม
Water	1,000	มิลลิลิตร

ปรับ pH เป็น 5.6 ینگฆ่าเชื้อเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน

2. Sabouraud Broth

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

ปรับ pH เป็น 5.6 ینگฆ่าเชื้อเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน

3. PDA (Potato dextrose agar)

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

ปรับ pH เป็น 7.0 ینگฆ่าเชื้อเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน

4. NA (Nutrient Agar)

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

ปรับ pH เป็น 6.8 – 7.0 หนึ่งฆ่าเชื้อเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน

5. NB (Nutrient Broth)

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

ปรับ pH เป็น 6.8 – 7.0 หนึ่งฆ่าเชื้อเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน

6. MEA (Malt Extract Agar)

Malt extract	2.0	กรัม
Peptone	1.0	กรัม
Glucose	20.0	กรัม
Agar	18.0	กรัม
Water	1,000	มิลลิลิตร

ปรับ pH เป็น 6.8 – 7.0 หนึ่งฆ่าเชื้อเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน

7. MEB (Malt Extract Broth)

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

ปรับ pH เป็น 6.8 – 7.0 หนึ่งฆ่าเชื้อเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน

8. Oat Meal Agar (ISP3)

ข้าวโอ๊ต (oat meal)	20	กรัม
Trace salts solution	1.0	มิลลิลิตร (ภาคผนวก ก หมายเลข 30)
Agar	18.0	กรัม
Water	1,000	มิลลิลิตร

ต้มข้าวโอ๊ตในน้ำกลั่นประมาณ 20 นาที นำมากรองผ่านผ้าขาวบาง เติมน้ำกลั่นลงในอาหารจนครบ 1,000 มิลลิลิตร เติม Trace salts solution ปรับ pH เป็น 7.0 หนึ่งฆ่าเชื้อเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน

9. Trace Salts Solution

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1	กรัม
MnCl_2	0.1	กรัม
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1	กรัม
Water	1,000	มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อโดยการกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ที่อุณหภูมิ 45 – 50 องศาเซลเซียส

10. 0.5 McFarland Standard

BaCl_2	0.048	M	ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร
H_2SO_4	0.36	M	ปริมาตร 99.5 มิลลิลิตร

อ่านค่าความดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร ให้อยู่ในช่วง 0.08 – 0.10

11. Vanillin solution

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

ละลายให้เข้ากัน เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้องในขวดสีชา

ภาคผนวก ข

อาหาร สารเคมี และวิธีเตรียมที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์

1. RPMI1640 (stock reagent)

อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ผงสำเร็จรูป	10.4	กรัม
โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต	2	กรัม

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

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

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

3. MTT solution

MTT	50	มิลลิกรัม
PBS (สำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์เท่านั้น)	10	มิลลิลิตร

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

หมายเหตุ MTT เป็นสารก่อมะเร็ง ต้องสวมถุงมือก่อนชั่งหรือเตรียมสารทุกครั้ง

4. 1X PBS ปริมาตร 1 ลิตร

NaCl	8	กรัม
KCl	0.2	กรัม
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	3.63	กรัม
KH ₂ PO ₄	0.24	กรัม

เติมน้ำกลั่น 1 ลิตร ละลายให้เข้ากัน ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.4 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5. 0.04 N HCl ใน isopropanol ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ตวง isopropanol 80 มิลลิลิตร ในกระบอกตวงขนาด 100 มิลลิลิตร

เติม HCl 0.331 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml ด้วย isopropanol ปิดฝา และเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

ภาคผนวก ค

สารเคมี และวิธีการเตรียมที่ใช้ในเทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์

1. 1 M Tris-HCl (pH 8) ปริมาตร 1 ลิตร

Tris base	121	กรัม
น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร

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

2. 0.5 M EDTA (Ethylenediamine tetraacetic acid) ปริมาตร 1 ลิตร

EDTA	186.10	กรัม
น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร

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

3. Washing buffer ปริมาตร 200 มิลลิลิตร

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

เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อจนได้ปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4. 2X CTAB lysis buffer ปริมาตร 200 มิลลิลิตร

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

NaCl	16.36	กรัม
------	-------	------

2-mercaptoethanol	1	มิลลิลิตร
-------------------	---	-----------

เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ จนได้ปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

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

Choloroform	192	มิลลิลิตร
-------------	-----	-----------

Isoamyl alcohol	8	มิลลิลิตร
-----------------	---	-----------

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

Polyethylene glycol 6000	20	กรัม
--------------------------	----	------

NaCl	14.61	กรัม
------	-------	------

เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อจนได้ปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

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

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

0.5 M EDTA (pH 8)	2	มิลลิลิตร (ภาคผนวก ค หมายเลข 2)
-------------------	---	---------------------------------

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

8. Ethidium bromide, 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 มิลลิลิตร

Ethidium bromide	0.2	กรัม
------------------	-----	------

น้ำกลั่น	20	มิลลิลิตร
----------	----	-----------

9. 1.5% Agarose gel (w/w)

Agarose	1.65	กรัม
---------	------	------

0.5 X TBE (pH 8)	110	มิลลิลิตร (ภาคผนวก ค หมายเลข 2)
------------------	-----	---------------------------------

Ethidium bromide	4	ไมโครลิตร
------------------	---	-----------

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายกฤตพงศ์ อรชัยพันธ์ลาภ เกิดเมื่อวันที่ 2 พฤศจิกายน พ.ศ.2526 เข้าศึกษาในระดับประถมศึกษา และมัธยมศึกษาที่โรงเรียนภ.ป.ร. ราชวิทยาลัย ในพระบรมราชูปถัมภ์ จากนั้นสอบเข้าศึกษาต่อในระดับอุดมศึกษา สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตร์บัณฑิต จากภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ในปีพ.ศ. 2548 และเข้าศึกษาต่อในระดับบัณฑิตศึกษา หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยในปีพ.ศ.2549