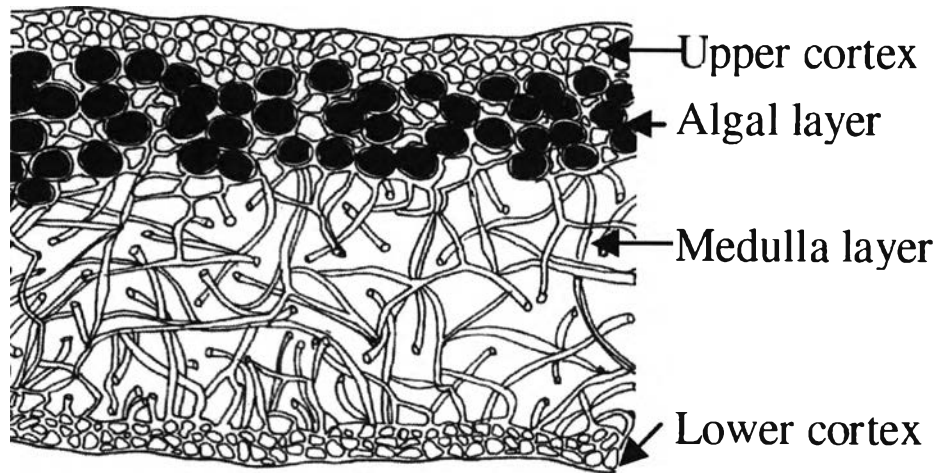




## เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 2.1 ไลเคน

ไลเคน (Lichen) เป็นรูปแบบความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตที่เกิดจากการอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัยกัน (symbiosis) ระหว่างรา (mycobiont หรือ lichen-forming fungi) กับสาหร่าย (algae) หรือ ไซยาโนแบคทีเรีย (photobiont) ในธรรมชาติราที่ก่อให้เกิดไลเคนไม่มีคลอโรฟิลล์และไม่สามารถสร้างอาหาร โดยเฉพาะคาร์โบไฮเดรตได้ด้วยตัวเอง จำเป็นต้องได้สารอินทรีย์จากสาหร่าย ทำให้ต้องดำรงชีวิตอยู่ได้เฉพาะในรูปแบบไลเคนเท่านั้น สาหร่ายที่พบในไลเคนอาจจะมีสาหร่ายเพียงชนิดเดียวหรือมีมากกว่าหนึ่งชนิดอาศัยอยู่ร่วมกัน ซึ่งสาหร่ายจะใช้คาร์บอนไดออกไซด์ จากบรรยากาศ และน้ำในการสังเคราะห์ด้วยแสงสร้างอาหารที่เป็นสารอินทรีย์แล้วแบ่งให้รา โดยมีรูปแบบของสารอินทรีย์ที่สาหร่ายสร้างขึ้นนั้นจะแตกต่างกันไปตามกลุ่มของสาหร่าย ถ้าเป็นในกลุ่มของพวกสาหร่ายสีเขียวจะสร้างสารอินทรีย์อยู่ในรูปของน้ำตาลแอลกอฮอล์ (sugar alcohols) ส่วนกลุ่มไซยาโนแบคทีเรียจะอยู่ในรูปของน้ำตาลกลูโคส (glucose) นอกจากนี้ราจะได้ธาตุไนโตรเจน (nitrogen) จากความสามารถของไซยาโนแบคทีเรียในการตรึงไนโตรเจนได้จากบรรยากาศ ส่วนราจะให้การป้องกันอันตรายจากสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม โดยเฉพาะแสงที่มีความเข้มมากทำให้เป็นอันตรายต่อสาหร่ายได้ (Purvis, 2000) โดยการอาศัยอยู่ร่วมกันในลักษณะนี้ก่อให้เกิดโครงสร้างที่เรียกว่า แทลลัส (thallus) ซึ่งเป็นส่วนที่ราสร้างขึ้นเพื่อเป็นที่อยู่ของสาหร่าย (Ahmadjian, 1993) โดยส่วนใหญ่ราที่พบเป็นราใน Class Ascomycetes ประมาณครึ่งหนึ่งของราใน Class นี้เป็นราที่สัมพันธ์อยู่กับไลเคน และพบราใน Class Basidiomycetes และ Deuteromycetes ได้บางแต่เป็นเพียงส่วนน้อย ในขณะที่สาหร่ายที่พบส่วนใหญ่จะเป็นสาหร่ายสีเขียว (green alga) เซลล์เดียวในสกุล *Trebouxia* หรือพวกที่มีรงควัตถุสีส้มในสกุล *Trentepohlia* ส่วนไซยาโนแบคทีเรีย (cyanobacterium) จัดอยู่ในสกุล *Nostoc* (Ahmadjian, 1993; Honegger, 1996; Purvis, 2000; Kirk และคณะ, 2008; Nash III, 2008)



ภาพที่ 2.1 แสดงลักษณะของแทลลัสของไลเคน (Buaruang , 2009)

จากมติที่ประชุมสมาคมไลเคนนานาชาติในปี ค.ศ.1981 ได้กำหนดนิยามของแทลลัสของไลเคนว่า แทลลัส (thallus) เป็นโครงสร้างพิเศษเปรียบเสมือนร่างกายของไลเคน ประกอบด้วยส่วนของราและสาหร่าย (Hawksworth and Hill, 1984) โดยเรียงตัวเป็นชั้นของเนื้อเยื่อที่สร้างขึ้น ประกอบด้วยชั้นของคอร์เทกซ์ (cortex) และ เมดัลลา (medulla) และชั้นที่อยู่ของสาหร่ายที่มีส่วนของเส้นใยราห่อหุ้มไว้ แสดงดังภาพที่ 2.1 ชั้นคอร์เทกซ์จะทำหน้าที่ปกป้องเซลล์ของสาหร่ายจากความแห้งแล้งและความเข้มแสงสูงๆ ในขณะที่ชั้นเมดัลลาเส้นใยราจะสานกันแบบไม่แน่นเพื่อช่วยให้มีการแลกเปลี่ยนก๊าซได้สะดวกขึ้น (Ahmadjian, 1993) ซึ่งเซลล์สาหร่ายที่กระจายตัวอยู่ในชั้นของสาหร่าย (algal layer) ในแทลลัสมีประมาณ 7% ของแทลลัสทั้งหมด (Collins และ Farrar, 1978) โดยการที่สาหร่ายอยู่ในชั้นสาหร่ายนี้ช่วยให้สาหร่ายได้รับแสงแดดที่ในปริมาณที่เหมาะสมสำหรับใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง (Ahmadjian, 1993) การเรียงตัวและตำแหน่งของราและสาหร่าย ในชั้นแต่ละชั้นของแทลลัสเป็นผลมาจากการปรับตัวให้เหมาะสมกับการดำรงชีวิต เพื่อตอบสนองกับสภาวะแวดล้อมภายนอก (Jahns, 1988) ทำให้เกิดเป็นลักษณะการเจริญของแทลลัสในรูปแบบต่างๆ กันไป สามารถแบ่งชนิดรูปแบบการเจริญของไลเคนตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาออกเป็น 3 ชนิดหลัก ได้แก่

1. ครัสโตส (Crustose) เป็นไลเคนที่มีแทลลัสลักษณะคล้ายแผ่นผงค่อนข้างหนา ไม่มีส่วนของผิวล่าง (lower cortex) โดยส่วนฐานของแทลลัสแนบชิดติดแน่นอยู่กับพื้นที่อาศัยด้วยเส้นใยของราไม่สามารถเคลื่อนย้ายได้ พบเกาะอาศัยอยู่บนเปลือกไม้และหินที่อยู่ในพื้นที่เปิดโล่ง (ภาพที่ 2.2) มีความทนต่อสภาพแวดล้อมที่อยู่อาศัย สามารถพบได้ตั้งแต่ป่าฝน พื้นที่สูงอย่างบริเวณเทือกเขาหิมาลัย (7,400 เมตร) บริเวณที่เป็นน้ำแข็ง ไปจนถึงทวีปแอนตาร์กติกา ไลเคนชนิดครัสโตสมีประมาณ 15,000 ชนิด หรือ คิดเป็นร้อยละ 75 ของไลเคนทั้งหมด (Hertel, 1998)



ภาพที่ 2.2 แสดงลักษณะของแทลลัสแบบครัสโตส

2. โฟลิโอส (Foliose) เป็นไลเคนที่แทลลัสมีลักษณะคล้ายกับใบไม้แบนราบ ขยายแผ่กว้าง และมีลักษณะเป็นลอนหรือกลีบ (lobe) โดยมีบางส่วนติดกับพื้นที่อาศัย เช่น กิ่งไม้และหิน ด้วยเส้นใยของราที่พัฒนาโครงสร้างพิเศษจากบริเวณผิวล่างของแทลลัสที่เรียกว่า ไรซีน (rhizine) แทลลัสของไลเคนชนิดนี้พบทั้งส่วนผิวบน (upper cortex) และผิวล่าง (lower cortex) ของแทลลัส (ภาพที่ 2.3) (Büdel และ Scheidegger, 2008)



ภาพที่ 2.3 แสดงลักษณะของแทลลัสแบบโฟลิโอส

3. ฟรุติโคส (Fruticose) เป็นไลเคนที่ลักษณะคล้ายพุ่มไม้ เลื้อยผม โดยมีการแตกแขนงอย่างอิสระ แทลลัสเป็นรูปร่างทรงกระบอกหรือแบนบางคล้ายกับริบบิ้น โดยยึดติดกันพื้นที่อาศัยที่ปลายด้านหนึ่งด้วยโฮลด์ฟาสท์ (holdfast) (ภาพที่ 2.4) ซึ่งไลเคนในกลุ่มนี้สามารถพบได้ทั่วไปในสภาพภูมิอากาศที่หลากหลาย ตั้งแต่ทะเลทรายที่แห้งแล้งไปจนถึงป่าฝนในเขตร้อนและยังอาศัยอยู่ได้บนพื้นที่อาศัยได้หลากหลายชนิด (Büdel และ Scheidegger, 2008)



ภาพที่ 2.4 แสดงลักษณะของแทลลัสแบบฟรุติโคส

โครงสร้างสืบพันธุ์ของไลเคนเป็นส่วนที่ราสร้างขึ้นมาทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ โดยสร้างโครงสร้างสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศมีหลากหลายขนาดและสีล้วนภายในเป็นเนื้อเยื่อไฮเมนเนียม (hymenium) มีแอสคัส (ascus) ที่บรรจุแอสโคสปอร์ (ascospore) แทรกตัวอยู่ โครงสร้างสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศแบ่งได้ 2 แบบ ได้แก่

1. แอโพทีเซีย (apothecia) มีลักษณะคล้ายถ้วยหรือจาน (cup shape) ขนาดเล็กติดอยู่บนแทลลัส (ภาพที่ 2.5) ภายในเป็นเนื้อเยื่อ hymenium เมื่อแอสโคสปอร์เจริญเต็มที่แอโพทีเซียจะเปิดออกเพื่อปลดปล่อยแอสโคสปอร์ออกสู่ภายนอก (Büdel และ Scheidegger, 2008)



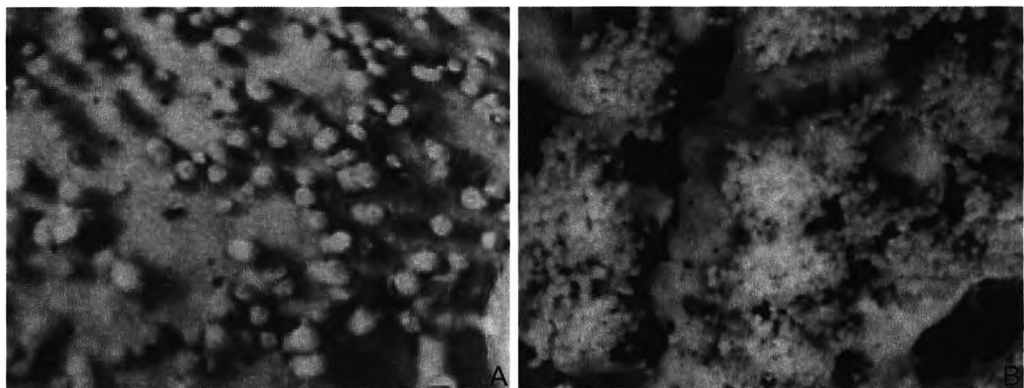
ภาพที่ 2.5 แสดงลักษณะของโครงสร้างสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศแบบแอโพทีเซีย

2. เพอริทีเซีย (perithecia) มีลักษณะคล้ายรูปคนโท (flask shape) ขนาดเล็กฝังตัวอยู่ในแทลลัส (ภาพที่ 2.6) ภายในมีพาราไฟซิส และแอสโคสปอร์ ด้านบนมีช่องเปิดเป็นท่อขนาดเล็กเรียกว่า ostiole ใช้เป็นทางออกของแอสโคสปอร์ เพื่อปลดปล่อยแอสโคสปอร์ที่เจริญเต็มที่ออกสู่ภายนอก (Büdel และ Scheidegger, 2008)



ภาพที่ 2.6 แสดงลักษณะของโครงสร้างสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศแบบเพอริทีเซีย

การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของไลเคน โดยสร้างโครงสร้างพิเศษ ได้แก่ ไอซิดีเยีย (isidia) (ภาพที่ 2.7A) มีลักษณะคล้ายเข็มหรือนิ้วมือเล็กๆ อยู่ด้านบนของชั้นคอร์เทกซ์ และซอริเดีย (soredia) (ภาพที่ 2.7B) มีลักษณะเป็นก้อนฟูซึ่งภายในประกอบด้วยโครงสร้างทั้งสองประกอบไปด้วยราและสาหร่าย สามารถหลุดหรือหักได้จากแทลลัสด้วยแรงลมหรือน้ำ โดยส่วนที่หักได้นี้จะเมื่อไปอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมก็จะสามารถเจริญเป็นไลเคนแทลลัสใหม่ได้ (Hawksworth และ Hill, 1984; Büdel และ Scheidegger, 2008)



ภาพที่ 2.7 แสดงลักษณะของโครงสร้างสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (A) ไอซิดีเยีย (isidia) และ (B) ซอริเดีย (soredia)

## 2.2 ราที่ก่อให้เกิดไลเคน (Lichen-forming fungi)

ในอดีตช่วงก่อนศตวรรษที่ 21 นักวิทยาศาสตร์มีความเข้าใจกันว่าไลเคนเป็นพืชชนิดหนึ่ง แต่ในความเป็นจริงแล้วไลเคนเป็นความสัมพันธ์ระหว่างรา (lichen-forming fungi) กับสาหร่าย (photobiont) โดยปัจจุบันการเรียกชื่อชนิดของไลเคนนั้นจะอ้างอิงจากชื่อของรา (lichen-forming fungi) ซึ่งเป็นราที่ก่อให้เกิดไลเคน (Honegger, 2008) มีประมาณ 13,500 ชนิด โดยร้อยละ 98 หรือ 13,250 ชนิด เป็นรา Ascomycotina (ascomycetes) นอกจากนั้นเป็นราในกลุ่มอื่นๆ แสดงดังตารางที่ 2.1 (Crittenden และ Porter, 1991; Hawksworth, 1988, 1991) เมื่อเร็วๆ นี้ได้มีการประมาณจำนวนชนิดราที่ก่อให้เกิดไลเคน (lichen-forming fungi) ทั่วโลกที่ทราบชนิดแน่นอนแล้ว อยู่ระหว่าง 18,000 - 30,000 ชนิด ซึ่งเป็นร้อยละ 20 ของราทั้งหมด และคิดเป็นร้อยละ 40 ของราใน Ascomycota เป็นราที่ก่อให้เกิดไลเคน (Purvis, 2000; Sipman และ Aptroot, 2001; Kirk และคณะ, 2008) ซึ่งประกอบด้วย 2,720 สกุล กระจายตัวอยู่ใน 37 อันดับ และ 16 อันดับ เป็นราที่ก่อให้เกิดไลเคนโดยเฉพาะ (Sipman และ Aptroot, 2001)

ตารางที่ 2.1 แสดงชนิดของราที่ก่อให้เกิดไลเคนในซัพดิวิชัน (subdivision) ของรา

(Crittenden และ Porter, 1991)

ซัพดิวิชัน	จำนวนชนิด	จำนวนชนิดราที่ก่อให้เกิดไลเคน	ราที่ก่อให้เกิดไลเคน (ร้อยละ)
Ascomycotina	28,650	13,250	46.25
Basidiomycotina	16,000	50	0.31
Mastigomycotina	1,170	1	0.09
Mitosportic fungi	17,000	200	1.18
Myxomycotina	625	2	0.32
Zygomycotina	765	0	0
<b>รวม</b>	<b>64,200</b>	<b>13,500</b>	<b>21</b>

การแยกราที่ก่อให้เกิดไลเคนเกิดขึ้นครั้งแรกโดย Töbler (1909) และ Thomas (1939) ทำการสังเคราะห์ไลเคนขึ้นมาใหม่ในห้องปฏิบัติการจากราและสาหร่ายที่แยกได้ (Turbin, 1996) ต่อมาได้มีการพัฒนาวิธีการสังเคราะห์ไลเคนอย่างต่อเนื่องโดย Ahmadjian และ Heikkita ประสบความสำเร็จเป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1970 ไลเคนที่สังเคราะห์ขึ้นได้ชนิดแรกคือ *Endocarpon pusillum* (Ahmadjian, 1973) Crittenden และคณะ (1995) ประสบในการแยกราที่ก่อให้เกิดไลเคน แต่ไลเคนส่วนใหญ่ที่นำมาศึกษาเป็นไลเคนในเขตอบอุ่น อาร์กติก และแอนตาร์กติกา

ซึ่งไลเคนที่เป็นต้นแบบในการศึกษา คือ *Xanthoria parietina* ซึ่งเป็นไลเคนที่พบได้ทั่วไปในเขตอบอุ่น โดยการแยกแอสโคสปอร์มากระตุ้นให้เจริญและมีการศึกษาหาสภาวะที่มีความเหมาะสมต่อการเจริญของราที่ก่อให้เกิดไลเคนที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ (Christmas, 1980; Oliver และคณะ, 1989; Molina และคณะ, 1997; Molina และ Crespo, 2000)

การแยกราที่ก่อให้เกิดไลเคนสามารถแยกได้จากส่วนของ เส้นใย (hyphae) แทลลัส (thallus) ไอซิดีเย (isidia) และซอริเดีย (soridia) แต่ส่วนใหญ่ไม่ประสบความสำเร็จ เพราะราที่แยกได้ส่วนใหญ่ไม่ใช่ราที่ก่อให้เกิดไลเคน (Ahmadjian, 1993) โดยแทลลัสในสภาพธรรมชาติจะมีสิ่งมีชีวิตหลากหลายชนิดอาศัยหรือปะปนอยู่กับแทลลัส เช่น ราเส้นใย (Petrini, 1990) แบคทีเรีย และ ยีสต์ ดังนั้นการแยกราที่ก่อให้เกิดไลเคนจึงไม่ควรแยกจากส่วนของแทลลัสบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งมีความเสี่ยงสูงที่สิ่งมีชีวิตชนิดอื่นที่ปนเปื้อนจะเจริญออกมาก่อนราที่ก่อให้เกิดไลเคนเจริญ เนื่องจากราที่ก่อให้เกิดไลเคนเจริญค่อนข้างช้า ดังนั้นในการแยกราที่ก่อให้เกิดไลเคนมักนิยมแยกจากแอสโคสปอร์ หากไม่ประสบความสำเร็จจึงจะใช้วิธีแยกจากแทลลัส (Ahmadjian, 1993) โดยสิ่งที่สำคัญในแยกราที่ก่อให้เกิดไลเคนจากแอสโคสปอร์จะเกี่ยวข้องกับการงอกของแอสโคสปอร์ที่ส่วนใหญ่ค่อนข้างงอกยาก (Ostrosky และ Denison, 1980) ซึ่งสปอร์ของไลเคนชนิดครัสโตรสจจะมีเปอร์เซ็นต์การงอกที่สูงกว่าไลเคนชนิด โพลีโอส และฟรุติโคส (Kofler, 1970) โดยลักษณะโคโลนี (colony) ของราที่ก่อให้เกิดไลเคนที่แยกได้ เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีลักษณะเป็นเส้นใยอัดกันแน่น (compact colony) และยกตัวสูงขึ้น เส้นใยลักษณะโป่งออก (balloon) (Ahmadjian, 1993; Lawrey, 1984)

## 2.3 การจัดจำแนกชนิดไลเคน

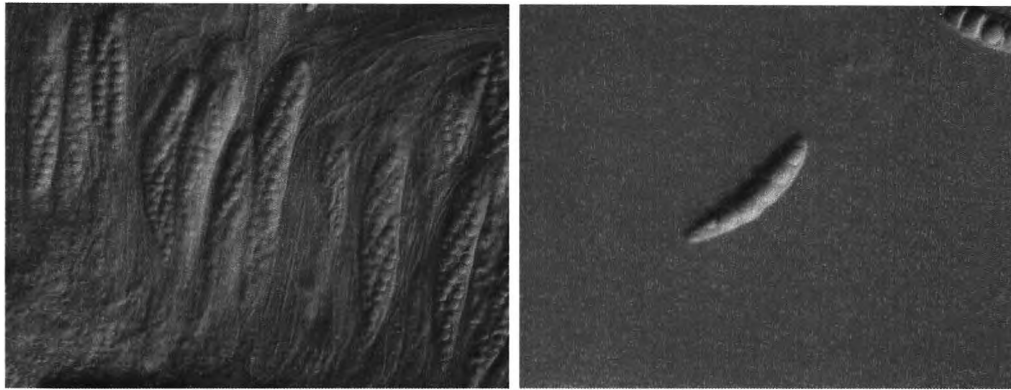
การจัดจำแนกไลเคนตามหลักอนุกรมวิธานนิยมใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสารเคมีเป็นหลักในการจัดจำแนกชนิดของไลเคน โดยสามารถแบ่งออกเป็น 3 ลักษณะหลัก (Harris, 1984; Aptroot, 1991 ; Vongshewarat, 2000) ได้แก่

### 2.3.1 ลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอก

การจัดจำแนกจะสังเกตจากลักษณะที่ปรากฏให้เห็นภายนอก เช่น ชนิดของรูปแบบการเจริญของไลเคน ลักษณะของโครงสร้างสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ สีเส้น และการเรืองแสงอัลตราไวโอเลตของแทลลัส

### 2.3.2 ลักษณะสัณฐานวิทยาภายใน

โดยใช้วิธีการตัดตามขวาง (cross section) แล้วส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อสังเกตลักษณะภายในของแทลลัส โครงสร้างสืบพันธุ์ และลักษณะแอสโคสปอร์ เช่น ชนิด สี ขนาด รูปร่าง จำนวนผนังกัน และการเรียงตัวของผนังกันภายในแอสโคสปอร์ ซึ่งแอสโคสปอร์เป็นส่วนสำคัญในการจัดจำแนกชนิดของไลเคน (ภาพที่ 2.8)



ภาพที่ 2.8 แสดงลักษณะโครงสร้างภายในและแอสโคสปอร์ของไลเคน

### 2.3.3 การทดสอบปฏิกิริยาทางเคมี

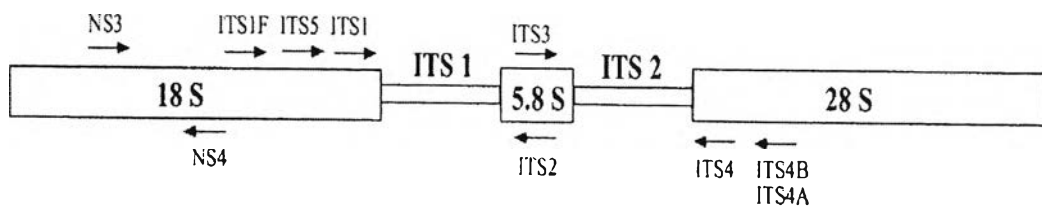
การทดสอบสารเคมีในไลเคนเป็นวิธีหนึ่งที่ใช้เป็นลักษณะในการจัดจำแนก โดยใช้วิธีการทดสอบสี (spot test หรือ color test) โดยทดสอบปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงสีของแทลลัสไลเคนและโครงสร้างสืบพันธุ์ กับสารละลายชนิดต่างๆ เช่น 10% Potassium hydroxide (KOH), Sodium hypochlorite และ Paraphenyldiamine ถ้าผลเป็นบวกจะเกิดการเปลี่ยนแปลงสี เป็นสีแดงหรือน้ำตาลเหลือง แต่ถ้าเป็นผลลบจะไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงใดๆ ซึ่งเป็นวิธีการทดสอบในเบื้องต้น นอกจากนี้ยังมีวิธีการ Thin layer chromatography (TLC) ซึ่งนิยมทดสอบกับระบบตัวทำละลายระบบต่างๆ เช่น toluene / dioxane / acetic acid (180 : 45 : 5) , toluene / acetic acid (170 : 30) และ toluene / ethyl acetate / formic acid (139 : 83 : 8) (Hale, 1979; Elix และ Stocker-Wörgötter, 2008)

โดยทางสัณฐานวิทยาและลักษณะสารเคมีที่ปรากฏจะนำไปเทียบกับรูปวิธาน เพื่อใช้ในการจัดจำแนกชนิดไลเคน แต่บ่อยครั้งที่การจัดจำแนกที่ใช้ลักษณะดังกล่าวเกิดปัญหาและความลำบากในการจัดจำแนกได้ เนื่องจากความสมบูรณ์ของตัวอย่างที่นำมาจัดจำแนก ลักษณะบางลักษณะมีความคล้ายคลึงกัน หรือแม้แต่ไม่พบลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจัดจำแนก เช่น แอสโคสปอร์ ตลอดจนลักษณะสารเคมีที่ปรากฏในบางครั้งไม่สามารถใช้ในการจัดจำแนกถึงระดับชนิดได้ ประกอบกับในบางครั้งรูปวิธานไลเคนที่มีให้อยู่เป็นไลเคนในต่างประเทศ ซึ่งไม่ตรงกับรูปวิธานของไลเคนในเขตร้อน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศไทยซึ่งมีการศึกษาค่อนข้างน้อย

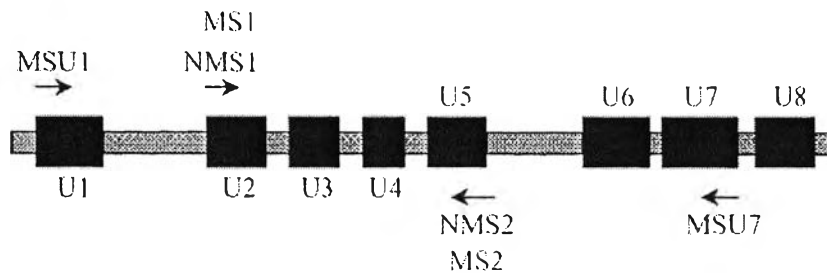


## 2.4 การศึกษาอณูวิทยาของไลเคน

เนื่องจากการจัดกลุ่มและการจัดจำแนกไลเคนอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) และสารเคมีของไลเคนในการจัดจำแนก (Hegnauer, 1962-2001; Brodo, 1978; Culberson, 1969; Hawksworth, 1976; Lumbsch, 1998, 2002) มักจะประสบกับปัญหาหลายๆ ด้าน เช่น ความคล้ายคลึงกันของลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสารเคมีบางลักษณะ และความเชี่ยวชาญของผู้จัดจำแนกที่มีมากน้อยไม่เท่ากัน จึงทำให้เกิดความสับสนในการจัดจำแนกชนิด เพื่อเป็นการกำจัดปัญหาต่างๆ ที่ก่อให้เกิดความสับสนในการจัดจำแนกชนิดไลเคน จึงทำให้ในปัจจุบันมีการนำเทคนิคทางอณูวิทยาเข้ามาช่วยในการจัดจำแนกชนิดไลเคน โดยวิธีการทางอณูวิทยาได้เข้ามามีบทบาทสำคัญในการศึกษาไลเคนทั้งในด้านพันธุศาสตร์ประชากร (population genetics) วงศ์วานวิวัฒนาการ (phylogeny) และการจัดจำแนก (identification) (Gargas และคณะ, 1995; Bridge และ Hawksworth, 1998) โดยมุ่งเน้นไปที่ปัญหาในการจัดระบบวิทยา (systematics) และการจัดจำแนกไลเคนที่มีความแตกต่างกันในระดับสกุล (DePriest, 1993; Gargas และ Taylor, 1995; Lutzoni และ Vilgalys, 1995; Wedin และ Tibell, 1997; Thell และคณะ, 1998; Winka และคณะ, 1998) ด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งอาศัยไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับรา (fungal-specific primers) (Gargas และ Taylor, 1992; Gardes และ Bruns, 1993; Gargas และ DePriest, 1996; Crespo และคณะ, 1997) ของบริเวณดีเอ็นเอที่เป็นตำแหน่งอนุรักษ์ โดยตำแหน่งที่นิยมนำมาศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ เพื่อช่วยในการจัดจำแนกไลเคนนั้น ได้แก่ ตำแหน่ง Internal Transcribed Spacer (ITS) (ภาพที่ 2.9) และ Mitochondria Small Subunit (mtSSU) (ภาพที่ 2.10) ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอที่มีความผันแปรของลำดับเบสระดับสกุลและชนิด (White และคณะ, 1990; Zoller และคณะ, 1999; Young-Mi และคณะ, 2000; Schmitt และคณะ, 2009) โดยทั้ง 2 ตำแหน่ง เป็นตำแหน่งที่นิยมนำมาใช้ในการศึกษาเพราะว่าเป็นตำแหน่งที่มีจำนวน copy ของยีนจำนวนมาก มี variation ในระหว่างชนิดสูง รวมทั้งมีขนาดไม่ใหญ่มาก และง่ายต่อการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอ จึงเป็นตำแหน่งที่เหมาะสมสำหรับนำมาใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของรา (Gardes และคณะ, 1991; Chen และคณะ, 1992; Govind และคณะ, 1992; Lee และ Taylor, 1992; Moulinier และคณะ, 1992; Sheen และคณะ, 1993)



ภาพที่ 2.9 แสดงบริเวณของไพรเมอร์ที่ตำแหน่ง Internal Transcribed Spacer (ITS) ซึ่งลูกศรด้านบนเป็นส่วนของ forward ไพรเมอร์ และลูกศรด้านล่างเป็นส่วนของ reverse ไพรเมอร์ (Larena และคณะ, 1999)



ภาพที่ 2.10 แสดงบริเวณของไพรเมอร์ที่ตำแหน่ง Mitochondria Small Subunit (mtSSU) ของไรโบโซมคลอโรพลาสต์ โดยแถบสีดำแต่ละแถบในภาพแสดงถึงบริเวณที่เป็นบริเวณอนุรักษ์ ซึ่งลูกศรด้านบนเป็นส่วนของ forward ไพรเมอร์ และลูกศรด้านล่างเป็นส่วนของ reverse ไพรเมอร์ (Zhou and Stanosz, 2001)

นอกจากนี้ในการจัดจำแนกและไลเคนนิยมนำเทคนิค RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) มาทำการวิเคราะห์ร่วมกับดีเอ็นเอที่บริเวณตำแหน่งอนุรักษ์โดยเฉพาะตำแหน่ง ITS (Horton และ Bruns, 2001) ซึ่งเทคนิค RFLP เป็นเทคนิคที่ทำให้เกิดรูปแบบความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) (สุรินทร์ปิยะโชคณากุล, 2548) โดยรูปแบบของขนาดดีเอ็นเอที่ต่างกันถูกนำมาใช้ในการจัดจำแนกไลเคนในระดับชนิดที่ยากจะจัดจำแนกได้โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Guzow-Krzeminska และ Wegrzyn, 2000)

Aras และคณะ (2007) ได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ในวงศ์วานวิวัฒนาการของไลเคนสกุล *Aspicilia* ด้วยเทคนิคอนุวิธาน โดยใช้การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง ITS พบว่าสามารถจัดกลุ่มได้เป็น 2 กลุ่มหลัก อยู่ใน Ostropomycetidae และ Lecanoromycetidae

Schmitt และ Lumbsch (2004) ได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ในวงศ์วานวิวัฒนาการของไลเคนวงศ์ Pertusariaceae โดยใช้เทคนิคอณูวิทยาที่ตำแหน่ง nuclear large subunit (nu LSU) and the mitochondrial small subunit (mt SSU) และ mitochondrial large subunit (mt LSU) โรโบโซมอลดีเอ็นเอควบคู่ไปกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสารเคมี พบว่าเป็น polyphyletic โดยสามารถจัดกลุ่มภายในสกุล *Pertusaria* ได้เป็น 3 กลุ่มหลัก ได้แก่ *Pertusaria* s.str.-group, *Variolaria*-group และ *Varicellaria*-group.

Guzow-Krzeminska และ Wegrzyn (2000) ได้ทำการศึกษาลักษณะทางอณูวิทยาเพื่อเป็นข้อมูลในการจัดจำแนกไลเคนสกุล *Melanelia* โดยใช้ด้วยเทคนิค RFLP ร่วมกับการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *AluI* และ *HaeIII* กับผลิตภัณฑ์ซีอาร์ที่ตำแหน่ง SSU และ LSU โรโบโซมอลดีเอ็นเอ

## 2.5 สารทุติยภูมิของไลเคน

ไลเคนเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีความสำคัญในทางการแพทย์และทางการเกษตร (Culberson และ Armaleo, 1991) ในอดีตไลเคนใช้ในเป็นส่วนหนึ่งของตำรับยาแผนโบราณ (folk medicine) ของชนพื้นเมืองอเมริกัน (Turner, 1977) ชาวอินเดีย (Saklani และ Upreti, 1992) และชาวจีนใช้ไลเคนเป็นยาขับเสมหะ (Expectorant) (Elix, 1996) ในแคว้น Andalusia ทางตอนใต้ของประเทศสเปน มีบันทึกเกี่ยวกับสรรพคุณทางยาของไลเคนบางชนิด เช่น *Ramalina bourgeana* ใช้เป็นยาขับปัสสาวะ *Xanthoria parietina* ใช้ในการรักษาอาการผิดปกติของไตและประจำเดือน รวมทั้งเป็นยาบรรเทาความเจ็บปวด และ *Pseudevernia furfuracea* ใช้ในการรักษาความผิดปกติในการหายใจ (Gonzalez-Tejero และคณะ, 1995) ในการแพทย์สมัยใหม่ได้ให้ความสนใจมุ่งเน้นไปที่ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารอินทรีย์ รวมทั้งลักษณะและองค์ประกอบทางเคมีเพื่อระบุชนิดของสารอินทรีย์ ในไลเคน (Sun และคณะ, 1990; Li และคณะ, 1991) ในปี ค.ศ. 1860s Nylander ได้เริ่มมีการวิเคราะห์สารเคมีจากไลเคนเป็นครั้งแรก โดยได้ทำการทำทดสอบสี (spot test หรือ color test) กับสารละลาย เพื่อสังเกตลักษณะการเปลี่ยนแปลงสีในเนื้อเยื่อของแทลลัสไลเคน (Nylander, 1866) ต่อมา Asahina และ Shibata (1954) ได้ทำการศึกษาโครงสร้างและจัดจำแนกสารไลเคนขึ้นเป็นครั้งแรก โดยอาศัยหลักการของโครงสร้างของสารและวิถีการสังเคราะห์สารอินทรีย์ (biosynthetic pathways) หรือ สารทุติยภูมิ (secondary metabolites) ซึ่งมีการจัดกลุ่มสารทุติยภูมิในไลเคนออกเป็น 3 กลุ่มหลัก ดังแสดงในตารางที่ 2.2 (Elix และ Stocker-Wörgötter, 2008) สารทุติยภูมิของไลเคนมีคุณสมบัติที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ได้แก่

1. มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (antimicrobial activity) เช่น usnic acid สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก (gram-positive) ได้ เช่น *Streptococcus mutans* โดยในยุโรปให้เป็นส่วนผสมในครีมอาบน้ำ ในชื่อทางการค้าว่า Usno® และ Evosin® นอกจากนี้ยังใช้เป็นสารแก้อาการแพ้ (antihistamine) และยับยั้งการเจริญของไวรัส (antiviral agent) (Elix, 1996) (ตารางที่ 2.3)

2. มีฤทธิ์ในการยับยั้งการอักเสบ (anti-inflammatory) และต่อต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) เช่น leukotrienes หรือ prostaglandin มีประโยชน์ในการช่วยยับยั้งการอักเสบ และอาจจะมีฤทธิ์ในการควบคุมการเจริญของเซลล์มะเร็ง (Marx, 2001) ส่วน depsides depsidones และ anthraquinones มีฤทธิ์ในการต่อต้านอนุมูลอิสระ (Hidalgo และคณะ, 1994; Choi และคณะ, 2000) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง lipid peroxidation (Ichinose และคณะ, 1994) (ตารางที่ 2.3)

3. มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง (anticancer), ฤทธิ์ยับยั้งก่อกลายพันธุ์ (antimutagenic) และฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของไวรัส (antiviral) สารไลเคนบางชนิดมีฤทธิ์ยับยั้งก่อกลายพันธุ์ เช่น chrysophanol เป็นสารอยู่ในกลุ่มของ anthraquinones มีฤทธิ์ยับยั้งการกลายพันธุ์ (Choi และคณะ, 1997) โดย Neamati และคณะ (1997) ได้ทำการศึกษาโครงสร้างสามมิติ และพบว่าสารหลายชนิดในกลุ่มของ depsides และ depsidones มีฤทธิ์ต้านเอนไซม์ HIV-1 integrase และยังพบว่าสาร 3-O-Acyl ซึ่งเป็นสารอนุพันธ์ของ triterpene, ursolic acid มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ HIV (anti-HIV activity) (Kashiwada และคณะ, 2000) (ตารางที่ 2.3)

4. อุตสาหกรรมสารสีและเครื่องสำอางค์ โดยไลเคนบางชนิดนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำหอม (Schulz และ Albroscheit, 1989; Sanchez และคณะ, 1997) เช่น *Evernia prunastri* และ *Pseudevernia furfuracea* นำมาใช้ในการผลิตน้ำหอมในทางตอนใต้ของยุโรป และประเทศโมร็อกโก (Romagni และ Dayan, 2002) มีการใช้ไลเคนเป็นสีในการย้อมเส้นผม (Bachmann และ Portmann, 1981) (ตารางที่ 2.3)

สารทุติยภูมิ (secondary metabolites) ที่ไลเคนผลิตขึ้นมาทั้งหมดสร้างจากรา โดยส่วนใหญ่จะสร้างขึ้นเมื่ออยู่ในสภาวะที่พหุอาศัยซึ่งกันและกัน ในสภาพธรรมชาติไลเคนจะผลิตสารทุติยภูมิออกมาเพื่อป้องกันแสงแดดให้กับสาหร่าย (Fahsel, 1994) ป้องกันราที่เป็นปรสิต ป้องกันตัวจากการถูกแมลงกินและสัตว์อื่นๆ (Emmerichet และคณะ, 1993) สารทุติยภูมิจะถูกสร้างจากภายในเซลล์ แต่จะถูกส่งออกมาเก็บสะสมไว้บริเวณผิวนอกของเส้นใยมากกว่าที่จะเก็บไว้ในเซลล์เอง สารทุติยภูมิส่วนใหญ่จะเป็นสารที่ไม่ละลายน้ำและต้องอาศัยสารละลายอินทรีย์ในการสกัด (Romagni และ Dayan, 2002; Elix และ Stocker-Wörgötter, 2008) โดยสารทุติยภูมิที่พบโครงสร้างแล้วมีมากกว่า 800 ชนิด (Huneck และ Yoshimura, 1996; Huneck, 1999;

Dembitsky และ Tolsikov, 2005) ได้มีการศึกษาพบว่าสารทุติยภูมิเกิดจากการสร้างของรา และราที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการสร้างสารทั้งที่เหมือนและแตกต่างไปจากที่พบในไลเคนธรรมชาติ (Stocker-Wörgötter, 2001) ในขณะที่สาหร่ายจะสร้างสารปฐมภูมิ (primary metabolites) ซึ่งเป็นสารจำพวกคาร์โบไฮเดรตที่เกิดจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง (Mosbach, 1969) โดยสารทุติยภูมิส่วนใหญ่ที่พบจะเป็นสารที่พบได้เฉพาะในไลเคนเท่านั้น มีส่วนน้อยประมาณ 50-60 ชนิด ที่พบเหมือนกับในพืชชั้นสูงหรือราชนิดอื่น (Culberson, 1969; Elix, 1996; Elix และ Stocker-Wörgötter, 2008) ตัวอย่างเช่น anthraquinone และ parietin เป็นรงควัตถุสีส้มที่พบได้ในไลเคนวงศ์ Teloschistales และยังสามารถพบได้ในราสกุลอื่นๆ เช่น *Aspergillus* และ *Penicillium* รวมทั้งในพืชหลายชนิด เช่น *Rheum*, *Rumax* และ *Ventilago* (Romagni และ Dayan, 2002)

## ตารางที่ 2.2 แสดงกลุ่มของสารทุติยภูมิหลักที่พบในไลเคน

---

### 1. Acetyl-polymalonyl pathway

#### 1.1 Secondary aliphatic acids, esters and related derivatives

#### 1.2 Polyketide derived aromatic compounds

##### 1.2.1 Mononuclear phenolic compounds

##### 1.2.2 Di- and tri-aryl derivatives of simple phenolic units

##### 1.2.2a Depsides, tridepsides and benzyl esters

##### 1.2.2b Depsidones and diphenyl ethers

##### 1.2.2c Depsones

##### 1.2.2d Dibenzofurans, usnic acid and derivatives

##### 1.2.3 Anthraquinones and biogenetically related xanthenes

##### 1.2.4 Chromones

##### 1.2.5 Naphtaquinones

##### 1.2.6 Xanthenes

### 2. Mevalonic acid pathway

#### 2.1 Di-, sester- and triterpenes

#### 2.2 Steroids

### 3. Shikimic acid pathway

#### 3.1 Terphenylquinones

#### 3.2 Pulvinic acids derivative

---

ตารางที่ 2.3 รายงานการใช้ประโยชน์สารเมตาบอไลต์จากไลเคน (ดัดแปลงจาก Romagni และ Dayan, 2002)

ชื่อสาร	ชนิดของไลเคน	การใช้ประโยชน์
	<i>para</i> -Depside	
Anziaic acid	<i>Anzia japonica, Cetrrelia spp.</i>	Inhibitot of prostaglandin synthesis
Atranorin	many spp.	Anticancer, fungitoxin, antifeedant, traditional medicine, perfume industry
Diffractaic acid	<i>Usnea spp., Parmelia spp.</i>	Anticancer, fungitoxic
	<i>meta</i> – deposite	
Boninic acid	<i>Ramalina boninensis</i>	Inhibitor of prostaglandin synthesis
Decarboxythamnolic acid	<i>Cladonia spp., Siphula decumbens</i>	Vasodilators
Alectoronic acid	<i>Parmelia spp., Cetrrelia spp.</i>	Anti-inflammatory
Norstictic acid	<i>Parmelia spp., many spp.</i>	Antiviral
Pannarin	<i>Pannaria fulvescens</i>	Traditional medicine
Physodalic acid	<i>Hypogymnia physodes</i>	Photoprotection Anti-mutagenicity
	Usnic acid	
(+) and (-) usnic acid	<i>Cladonia spp., Cetraria stacheyi, Alectoria spp., many spp.</i>	Anticancer, cosmetic, deodorant, toothpaste, preservative, antimicrobial, fungicidal, acne protection, herbicidal, treatment for tyrosinemia

ตารางที่ 2.3 (ต่อ) รายงานการใช้ประโยชน์สารเมตาบอไลต์จากไลเคน

ชื่อสาร	ชนิดของไลเคน	การใช้ประโยชน์
	Chromones	
Coeuplectin	<i>Flavoparmelia euplecta</i>	Anticancer
Euplectin	<i>Flavoparmelia euplecta</i>	Anticancer
Lepraric acid	<i>Sagenidium molle</i>	Anticancer
	Depsidone	
Siphulin	<i>Siphula ceratites</i>	Anticancer
Sordinone	<i>Lecanora spp.</i>	Anticancer
	Xanthones	
Arthothelin	<i>Arthothelium pacificum,</i>	Antidepressant
Lichexanthone	<i>Lecanora vinetorum</i> <i>Parmelia spp., Lecidea</i> <i>Stigmatea</i>	Dye, adhesive
	Anthraquinone	
Chiodectonic acid	<i>Herpothallon sanguineum</i>	Anti-mutagenic
Chrysophanol	<i>Acroscyphus</i> <i>sphaerophoroides</i>	Anti-mutagenic, aborteficient, dye
Emodin	<i>Nephroma</i> <i>laevigatum, Heterodermia</i>	Antioxidant, medicinal, DNA repair, tyrosine kinase inhibitor, anti-mutagenic
Parietin	<i>Xanthoria parietina, many</i> Others	Drug delivery, Photoprotection
Rugulosin	<i>Acroscyphus</i> <i>sphaerophoroides</i>	Antibiotic
Skyrin	<i>Acroscyphus</i> <i>sphaerophoroides</i>	Diabetes treatment
Solorinic acid	<i>Solorina crocea</i>	Antiviral, monoamine
Teloschistin	<i>Xanthoria fallax</i>	oxidase inhibitor Anti-mutagenic

ตารางที่ 2.3 (ต่อ) รายงานการใช้ประโยชน์สารเมตาบอไลต์จากไลเคน

ชื่อสาร	ชนิดของไลเคน	การใช้ประโยชน์
	Diterpene	
(-)-16 $\alpha$ -hydroxykaurane	<i>Ramalina ceruchis</i>	Immunosuppression, cytotoxic
	Triterpene	
Retigeranic acid	<i>Lobaria subretigera</i>	Antimicrobial
Triterpene C	<i>Lobaria spp.</i>	Antiviral, antimicrobial
Triterpene D	<i>Lobaria spp.</i>	Antiviral, antimicrobial
Triterpene N-1	<i>Parmelia entotheiochroa</i>	Antiviral
	Sterols	
Ergosterol	Many spp.	Medicinal
Sitosterol	<i>Lecanora dispersa</i>	Cosmetic, dermatology, food additive
	Terphenylquinone	
Polyporic acid	<i>Sticta coronata</i>	Antileukemic, antitumor, antibacterial
Thelephoric acid	<i>Lobaria spp.</i>	Endopeptidase inhibitor, lipid peroxidation inhibitor
	Pulvinic acids	
Calycin	<i>Sticta spp.</i> , <i>Lecidea lucida</i> , Many others	Hair and skin care
Vulpinic acid	Many spp.	Anti-herbivory
	Dibenzopyranone	
Entotheonin	<i>Parmelia auralenta</i>	Bactericidal, anticancer

สารทุติยภูมิที่ราผลิตขึ้นจะมีความแตกต่างไปขึ้นอยู่กับลักษณะความสัมพันธ์ของรากับสาหร่าย ได้แก่ 1. ลักษณะความสัมพันธ์แบบไลเคนในสภาพธรรมชาติ 2. ลักษณะความสัมพันธ์แบบไลเคนที่สังเคราะห์ขึ้นในห้องปฏิบัติการ หรือ 3. ราที่ก่อให้เกิดไลเคนที่แยกมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ (Ahmadjian, 1993) โดยจะเห็นได้จากตัวอย่างในไลเคน *Cladonia cristatella* ซึ่งไลเคนในสภาพธรรมชาติจะผลิต usnic, barbatic, didymic, และ acids ขณะที่ไลเคนที่



สังเคราะห์ขึ้นในห้องปฏิบัติการจะผลิต barbatic, didymic acids และ usnic acids ในปริมาณน้อย (Culberson และคณะ, 1983; Bastian, 1984; Huovinen และคณะ, 1989) และในการเลี้ยงราที่ก่อให้เกิดไลเคนของ *C. cristatella* ในห้องปฏิบัติการพบว่าบางครั้งผลิตเฉพาะ didymic acids (Ahmadjian และ Jacobs, 1983) โดยมีรายงานการศึกษาการสังเคราะห์สารของราที่ก่อให้เกิดไลเคนในสภาพการเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ แสดงดังตารางที่ 2.4 (Ahmadjian, 1993)

นอกจากนี้ลักษณะของสารทุติยภูมิในไลเคนเป็นสิ่งที่มีความสำคัญ โดยใช้เป็นลักษณะที่ช่วยในการจัดจำแนกชนิดไลเคน (Culberson, 1966; Romagni และ Dayan, 2002) ซึ่งแต่เดิมนั้นการจัดจำแนกไลเคนในบางชนิดอาศัยรูปแบบของสารทุติยภูมิที่ปรากฏขึ้น มาใช้ในการจัดจำแนกชนิดไลเคน (chemotaxonomic) (Harris และคณะ, 2000; Trinkaus และ Mayrhofer, 2000; Rosato และ Scutari, 2000)

ตารางที่ 2.4 แสดงสารทุติยภูมิที่ผลิตขึ้นจากการเพาะเลี้ยงราที่ก่อให้เกิดไลเคนและราที่ดำรงชีวิตอย่างอิสระ (free-living fungi)

ราและราที่ก่อให้เกิดไลเคนที่ผลิตสารเคมีในธรรมชาติ	สารเคมีที่ผลิตได้ในสภาพการเพาะเลี้ยง	เอกสารอ้างอิง
<i>Aspergillus parasiticus</i>	Norsolorinnic acid	Lee และคณะ, 1971
<i>Aspergillus terreus</i>	4-O-demethylbarbatic acid	Yamamoto และคณะ, 1976
<i>Aspergillus unguis</i>	Unguinol (depsidone)	Stodala และคณะ, 1972
<i>Aspergillus versicolor</i>	Norsolorinnic acid	Hamasaki และคณะ, 1967
<i>Caloplaca ferruginea</i> , <i>Xanthoria calcicola</i> <i>X. elegans</i> , <i>X. fallax</i> <i>X. parietina</i>	Anthraquinones	Piatelli และ de Nicola, 1968; Nakano และคณะ, 1972;
<i>Candelariella vitellina</i> (stictaurin)	Vulpinic acid	Renner และ Gerstner, 1978; Honegger และ Kutasi, 1990 Mosbash, 1969
<i>Cladonia crispate</i> (squamatic acid)	Squamatic acid	Ejiri และ Shibata, 1975

ตารางที่ 2.4 (ต่อ) แสดงสารทุติยภูมิที่ผลิตขึ้นจากการเพาะเลี้ยงราที่ก่อให้เกิดไลเคนและราที่ดำรงชีวิตอย่างอิสระ (free-living fungi)

ราและราที่ก่อให้เกิดไลเคนที่ผลิตสารเคมีในธรรมชาติ	สารเคมีที่ผลิตได้ในสภาพการเพาะเลี้ยง	เอกสารอ้างอิง
<i>Cladonia cristatella</i> (bar-basis acis, didymic acid, usnic acid)	Didymic acid	Ahmadjian และ Jacobs, 1983
<i>Cladonia grayi</i> (4-0-demethylsphaerophorin), grayanic acid, 4-0-demethylgrayanic acid	Some as in natural lichen	Culberson และ Armaleo, 1992
<i>Dimelaena oreina</i> (gyrophoric acid, usnic acid)	Gyrophoric acid	Ahmadjian และ Culberson (unpublished)
<i>Lecanora chlarotera</i>	Gangaleodin	Santessen , 1969
<i>Lecanora dispersa</i> (2,7-dichlorolichexanthose)	Pannarin, dechloropannarin, argopsin	Leuckert และคณะ, 1990
<i>Lecanora rupicola</i> (atranorin, chloroatranorin, thiophanic acid, roccellic acid)	Roccellic acid	Fox และ Huneck, 1969
<i>Pyricularia</i>	Lecanoric acid	Umezawa และคณะ, 1974
<i>Ramalina crassa</i> (atranorin, salazinic acid, usnic acid)	Usnic acid, salazinic acid	Komiya และ Shibata, 1969; Kurokawa, 1971
<i>Ramalina pertusa</i>	Usnic acid	Hamada, 1991
<i>Ramalina siliquosa</i> (atranorin, protocetraric acid, usnic acid)	4-0-demethylbarbatic acid, usnic acid	Hamada และ Ueno, 1987; Hamada, 1989, 1991

ตารางที่ 2.4 (ต่อ) แสดงสารทุติยภูมิที่ผลิตขึ้นจากการเพาะเลี้ยงราที่ก่อให้เกิดไลเคนและราที่ดำรงชีวิตอย่างอิสระ (free-living fungi)

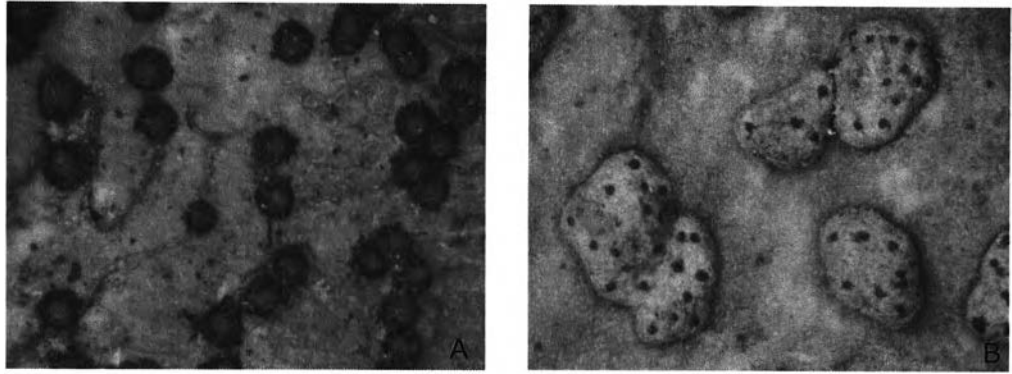
ราและราที่ก่อให้เกิดไลเคนที่ผลิตสารเคมีในธรรมชาติ	สารเคมีที่ผลิตได้ในสภาพการเพาะเลี้ยง	เอกสารอ้างอิง
<i>Ramalina subbreviscula</i> (salazinic acid, divaricatic acid)	4-0-demethylbarbatic acid	Hamada, 1988
<i>Ramalina subcomplanata</i> (salazinic acid, sekikaic acid derivatives)	4-0-demethylbarbatic acid	Hamada, 1988
<i>Ramalina yasudae</i>	Usnic acid	Komiya และ Shibata, 1969
<i>Stereocaulon curtatum</i> (atranorin, miriquidic acid)	Lecanoric acid	Hamada และ Ueno, 1990
<i>Trypethelium eluteriae</i>	1,2-naphthoquinones	Mathey และคณะ, 1980
<i>Usnea flexilis</i> (salazinic acid, usnic acid, protocetraric acid)	Protocetraric acid, salazinic acid)	Yoshimura และคณะ, 1989

## 2.6 ราที่ก่อให้เกิดไลเคนสกุลทริพิทีเลียม

ทริพิทีเลียม (*Trypethelium*) มีรากศัพท์มาจากภาษากรีก คือ *trype* แปลว่า a hole และ *thele* แปลว่า a nipple ซึ่งชื่อที่ตั้งขึ้นมานี้มาจากลักษณะรูปร่างและช่องว่างมากมายของแอสโคมาตา (ascomata) (Aptroot, 2009b) จัดอยู่ในไลเคนวงศ์ทริพิทีเลียซียี (Trypetheliaceae) เป็นไลเคนสกุลที่ตั้งเป็นสกุลแรกในไลเคนวงศ์นี้ (Harris, 1984) โดย Sprengel ในปี ค.ศ. 1804 (Farr และคณะ, 1979) ต่อมาในปี ค.ศ. 1831 Fée ได้ทำการศึกษาและบรรยายลักษณะของไลเคนสกุลทริพิทีเลียมจำนวน 19 ชนิด ปัจจุบันมีไลเคนสกุลทริพิทีเลียมทั่วโลกประมาณ 50 ชนิด (Kirk และคณะ, 2008) สามารถพบได้ทั่วไปในเขตร้อนและกึ่งเขตร้อน (Makhija และ Patwardhan, 1993)

ลักษณะโดยทั่วไปของไลเคนสกุลทริพิทีเลียม (*Trypethelium*) เป็นไลเคนที่มีแทลลัสประเภทครัสโตโรส (crustose) สีของแทลลัสมีหลายสีตั้งแต่ สีเขียวมะกอก เทา และน้ำตาลอ่อนไปจนถึงเหลือง พื้นผิวของแทลลัสจะเรียบไปจนถึงขรุขระเชื่อมติดกันเป็นแผ่น บางครั้งอาจจะมีรอยแตกร้าวแทรกอยู่ในแผ่นแทลลัส ที่พื้นผิวของแทลลัสของทริพิทีเลียมบางชนิดจะมีการสร้าง pruinose คล้ายฝุ่นผง สีขาว ส้ม หรือ เหลือง ปกคลุมอยู่บนแทลลัส (ภาพที่ 2.11) แทลลัสของทริพิทีเลียมสามารถแบ่งออกเป็น 3 ชั้น ได้แก่ ชั้นคอร์เทกซ์ (cortex) ชั้นสาหร่าย (algal layer) และชั้นเมดัลลา (medulla) โดยชั้นคอร์เทกซ์ประกอบไปด้วยส่วนของเส้นใยราที่มีลักษณะใสไม่มีสีหรือในบางครั้งเป็นเหลืองซีด ส่วนชั้นของสาหร่ายเป็นชั้นที่มีการพัฒนาค่อนข้างน้อย โดยปกติจะมีลักษณะบาง เชื่อมติดกับชั้นเมดัลลา แต่บางครั้งก็พบกระจายตัวอยู่ในชั้นเมดัลลา ซึ่งสาหร่ายที่อาศัยอยู่ร่วมกันเป็นสาหร่ายในสกุล *Trentepohlia* และชั้นเมดัลลาเป็นชั้นที่ประกอบด้วยส่วนของเส้นใยราสีขาวหรือไม่มีสี ยึดเกาะอยู่กับเซลล์ของเปลือกไม้ที่อาศัยอยู่ แทลลัสยังประกอบไปด้วย pseudostroma ที่มีลักษณะเป็นแบบ monocarpic หรือ polycarpic มีหลากหลายสีตั้งแต่ เทา แดง น้ำตาลไปจนถึงสีดำ มีลักษณะรูปทรงเป็นรูปไข่ ผนังของ pseudostroma มีคาร์บอนเป็นองค์ประกอบหลัก (carbonize) หรือ ไม่มีคาร์บอน (non-carbonize) ในส่วนของ ascomata นั้นมีทั้งที่เป็นแบบแยกกันและร่วมตัวกัน ผนังอยู่ใน pseudostroma มีช่องเปิด (ostiole) เป็นรูเล็กๆ สีน้ำตาลหรือดำ (carbonize) ภายในประกอบด้วย แอสคัส (ascus) ชนิด bitunicate รูปร่างคล้ายกระบอก ภายในบรรจุแอสโคสปอร์ (ascospore) ซึ่งหน่วยสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศจำนวน 8 แอสโคสปอร์ต่อแอสคัส แอสโคสปอร์ใสไม่มีสี (hyaline) ภายในมีผนังกันตามแนวขวางแบ่งเป็นช่องแบบ transversely septate มีจำนวนผนังกันแตกต่างกันไปตั้งแต่ 3 จนถึงมากกว่า 3 ผนังขึ้นไป ซึ่งลักษณะของแอสโคสปอร์มีตั้งแต่เป็นรูปกลมรีเหมือนรูปไข่ (ellipsoid) ไปจนถึงรูปกระสวยที่มีปลายหลายเรียวยาวทั้งสองข้าง (fusiform) ระหว่างผนังกันมีเซลล์ช่องว่างที่มีรูปร่างหลายแบบ มีทั้งช่องว่างแบบกลม หรือแบบมีมุม ห้าเหลี่ยม (pentagonal) หกเหลี่ยม (hexagonal) แต่ส่วนมากจะเป็นกลม (Aptroot, 2009b; Sprengel, 1804; Makhija และ Patwardhan, 1993)

สารเคมีที่พบในไลเคนสกุลทริพิทีเลียมส่วนใหญ่อยู่ในแทลลัส หรือ pseudostroma เป็นสารในกลุ่ม lichexanthone (หรือ 1,8-dihydroxy-3,6-dimethoxyxanthone) และ anthraquinone (Aptroot, 2009b) เช่น parietin (Makhija และ Patwardhan, 1993) และ secalonic acid (dianthraquinone) ซึ่งเป็นสารที่พบครั้งแรกใน *Trypethelium eluteriae* (Mathey, 1979) และ lichexanthone ส่วนใหญ่พบในแทลลัส โดยจะสังเกตเห็นได้ด้วย การนำแทลลัสไปส่องใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ซึ่งจะเห็นเรืองแสงเป็นสีเหลืองออกมา (Makhija และ Patwardhan, 1993)



ภาพที่ 2.11 แสดงตัวไลเคนสกุลทริพิทีเลียม (A) *Trypethelium tropicum* และ (B) *Trypethelium eluteriae*

โดยลักษณะของขนาด รูปร่าง สีสัณ และการทำปฏิกิริยากับสารละลาย โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (Potassium Hydroxide) ของ pseudostroma เป็นลักษณะที่ใช้สำหรับจัดจำแนกชนิด และนอกจากลักษณะของ pseudostroma ที่ใช้ในการจัดจำแนกแล้ว แอสโคสปอร์ยังเป็นส่วนสำคัญอีกส่วนหนึ่งที่มีความน่าเชื่อถือที่สุดในการจัดจำแนกชนิดของไลเคนสกุลทริพิทีเลียม (Makhija และ Patwardhan, 1993) ซึ่งในบางครั้งการจัดจำแนกชนิดอาจจะทำได้ยากเนื่องจาก อาจไม่พบแอสโคสปอร์หรือแอสโคสปอร์ยังเจริญไม่สมบูรณ์เต็มที่ทำให้รูปร่างและลักษณะที่ จำเป็นบางประการไม่ตรงกับรูปวิธาน จึงทำให้เกิดความสับสน และไม่สามารถจัดจำแนกสกุลหรือ ชนิดได้อย่างถูกต้องแม่นยำได้

ถึงแม้ว่าไลเคนสกุลทริพิทีเลียมจะสามารถพบได้ทั่วไปในเขตร้อนทั่วโลก แต่ก็ยังขาด การศึกษาไลเคนสกุลทริพิทีเลียมในด้านการจัดจำแนกที่ถูกต้อง และการนำมาใช้ประโยชน์ในทาง อุตสาหกรรม โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศไทย ซึ่งเป็นประเทศในเขตร้อนที่มีความหลากหลาย ทางชีวภาพสูง จึงสมควรที่จะมีการศึกษาไลเคนสกุลทริพิทีเลียมเพื่อการใช้ประโยชน์ในอนาคต แต่ จนถึงปัจจุบันการศึกษาไลเคนสกุลทริพิทีเลียมไม่เพียงแต่ในประเทศไทยเท่านั้น ทั่วโลกก็มีการ ศึกษาค่อนข้างน้อย ซึ่งมีรายงานการศึกษาไลเคนสกุลทริพิทีเลียมดังต่อไปนี้

Sprengel (1804) ได้ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไลเคนวงศ์ทริพิทีเลียม โดยได้นำเสนอชื่อสกุลทริพิทีเลียมเป็นครั้งแรก และได้อธิบายลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไลเคน สกุลนี้

Mathey (1979) ได้ทำการศึกษาไลเคนวงศ์ทริพิทีเลียมโดยพบสาร secalonic acid (dianthraquinone) เป็นครั้งแรกใน *Trypethelium eluteriae*

Mathey และคณะ (1980) ได้ทำการศึกษาศรเคมีที่ได้จากแยกและการเพาะเลี้ยง mycosymbiont ของไลเคน *Trypethelium eluteriae* ในห้องปฏิบัติการพบสาร trypethelone และ สารอนุพันธ์

Harris (1984) ได้ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาไลเคนวงค์ทริพิทิลีเยซอใน ประเทศบราซิล บริเวณป่าอะเมซอน เพื่อการจัดทำรูปวิธานสำหรับใช้ในการจัดจำแนก จาก การศึกษาพบไลเคนทั้งหมด 6 สกุล 35 ชนิด และพบไลเคนชนิดใหม่ 10 ชนิด

Makhija และ Patwardhan (1993) ได้ทำการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของไลเคนใน สกุลทริพิทิลีเยมในประเทศอินเดีย ได้จัดกลุ่มชนิดของไลเคนสกุลทริพิทิลีเยมออกเป็น 12 กลุ่ม โดยใช้ลักษณะโครงสร้างของ pseudostroma เพื่อใช้ในการแยกชนิดภายในไลเคนสกุลทริพิทิลีเยม

Vongshewarat (2000) ได้ทำการศึกษาอนุกรมวิธานและนิเวศวิทยาของไลเคนวงค์ทริพิทิลีเยซอ โดยกระทำจากตัวอย่างที่เก็บรวบรวมจำนวน 559 ตัวอย่าง จากพื้นที่ต่างๆ ใน ประเทศไทยจำนวน 26 แห่ง และวิเคราะห์ไลเคนตามหลักอนุกรมวิธาน สามารถจัดจำแนกชนิดได้ 6 สกุล 33 ชนิด 1 สายพันธุ์ โดยพบว่า *Laurera benguelensis* และ *Trypethelium eluteriae* เป็นไลเคนที่สามารถพบได้เกือบทุกระบบนิเวศ โดยเฉพาะไลเคนสกุลทริพิทิลีเยมเป็นสกุลที่พบมากที่สุดคิดเป็นร้อยละ 45 ของไลเคนทุกสกุล ซึ่ง *Trypethelium tropicum* (ภาพที่ 2.11A) และ *Trypethelium eluteriae* (ภาพที่ 2.11B) เป็นชนิดไลเคนในสกุลทริพิทิลีเยมที่พบได้มากที่สุด

Del Prado และคณะ (2006) ได้ทำการศึกษากำหนดตำแหน่งของไลเคนวงค์ทริพิทิลีเยซอ ด้วยการวิเคราะห์วงค์วานวิวัฒนาการ (phylogenetic) จากลำดับเบสของตำแหน่ง mtSSU และ nuLSU ไรโบโซมอลดีเอ็นเอ โดยจากการศึกษาพบว่าไลเคนวงค์ทริพิทิลีเยซอเป็น monophyletic และถูกจัดอยู่ใน Dothideomycetes โดยก่อนหน้านั้นถูกจัดให้อยู่กลุ่มเดียวกับวงค์ไพรีนูลาซอ (Pyrenulaceae) และจัดให้วงค์ไพรีนูลาซอจัดอยู่ใน Chaetothyriomycetes