

บทที่ 4

ผลการทดลอง



4.1 ผลการสำรวจและเก็บตัวอย่างไลเคน

ทำการเก็บตัวอย่างไลเคนสกุลทริพิทิเลียมในพื้นที่ 17 แห่ง จาก 15 จังหวัดในประเทศไทยได้จำนวน 623 ตัวอย่าง โดยในแต่ละแห่งมีรหัส และจำนวนตัวอย่างแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 4.1 โดยสังเกตจากลักษณะภายนอกตัวอย่างไลเคนทั้งหมด พบว่ามีลักษณะสีแทลัสส์ และเพอริทีเซียแตกต่างกัน ได้แก่ แทลัสส์สีเขียวถึงน้ำตาลและมีเพอริทีเซียสีเหลือง แทลัสส์สีเขียว และมีเพอริทีเซียสีขาว และ แทลัสส์สีเขียวถึงน้ำตาลและมีเพอริทีเซียสีดำ ดังแสดงในภาพที่ 4.1

4.2 ผลการแยกและเพาะเลี้ยงราที่ก่อให้เกิดไลเคนสกุลทริพิทิเลียม

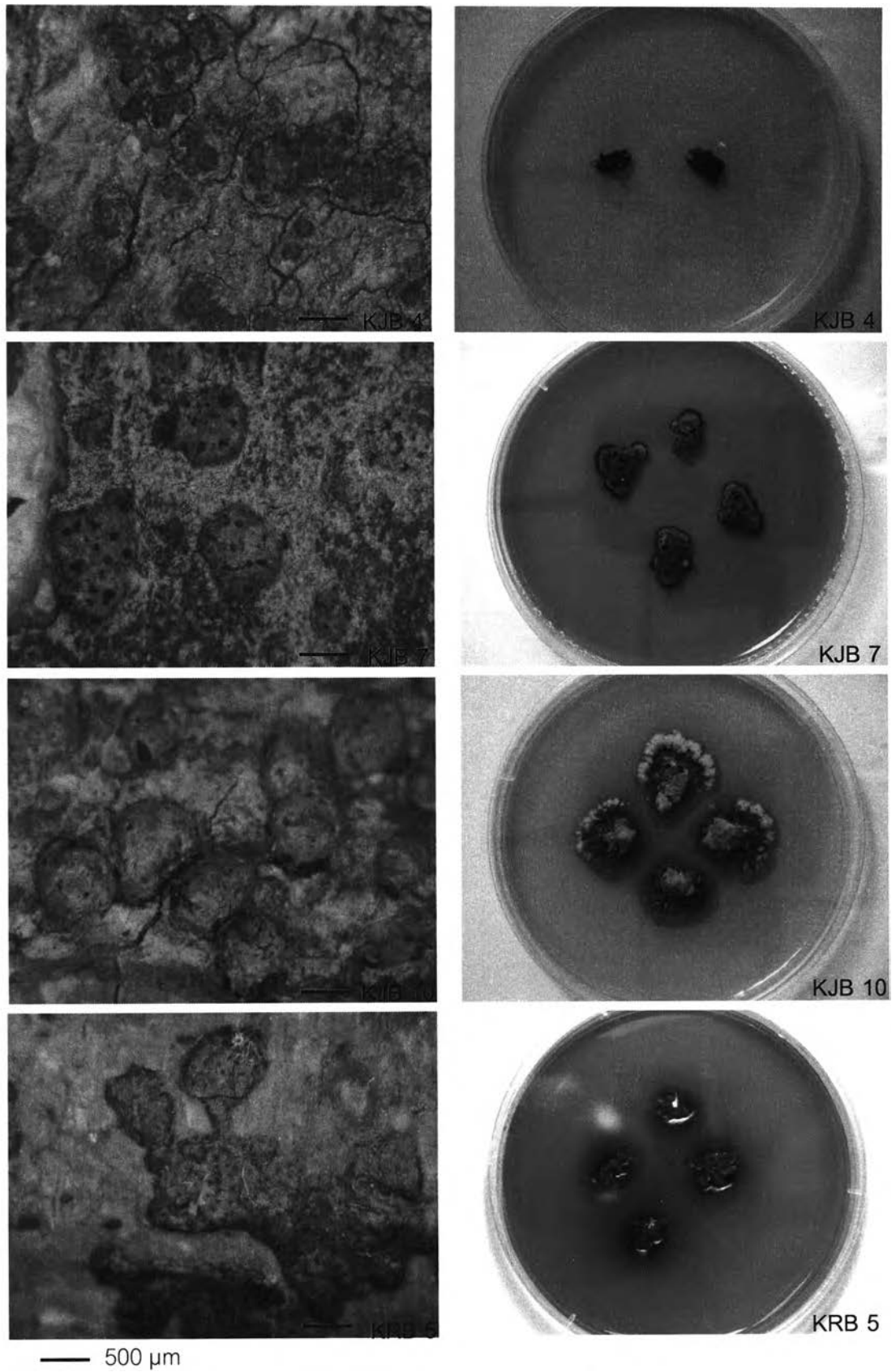
จากการแยกราที่ก่อให้เกิดไลเคนสกุลทริพิทิเลียมด้วยวิธี Ascospore discharge technique และเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Malt-Yeast Extract Agar (MYA) ตามวิธีดำเนินการทดลองข้อ 3.3.2 พบว่าสปอร์สามารถงอกเป็นเส้นใยและพัฒนาเป็นโคโลนี (Colony) ได้จำนวน 64 ไอโซเลต (ตารางที่ 4.1) โดยมีลักษณะแทลัสส์และเส้นใยของแต่ละไอโซเลต ดังแสดงในภาพที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แสดงแหล่งที่มา จำนวนตัวอย่างไลเคนที่เก็บ และจำนวนที่แยกได้

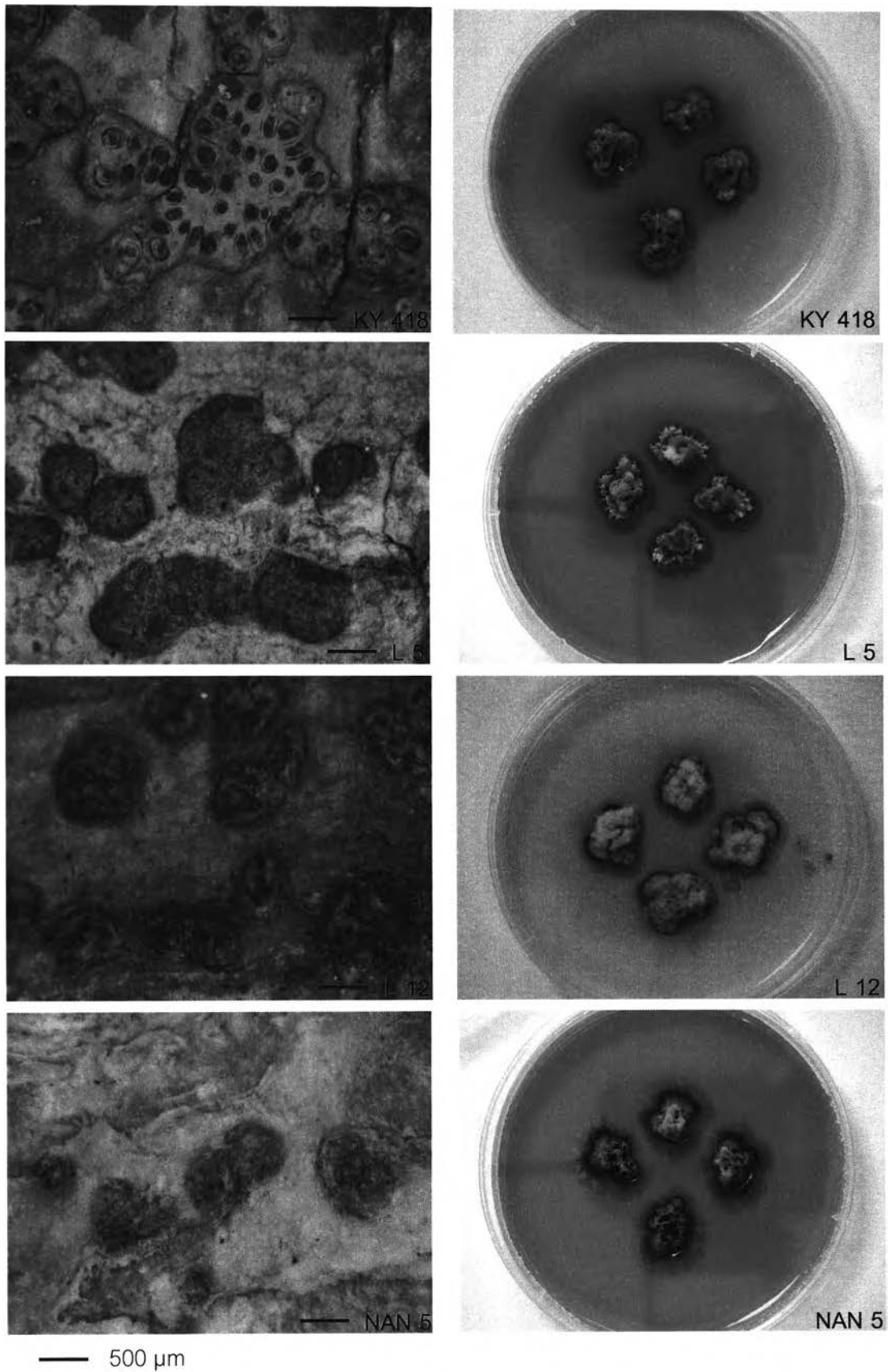
แหล่งที่เก็บ	รหัส	สถานที่เก็บ	Mycobiont ที่แยกได้
1	CM	สถานีวิจัยสัตว์ป่าดอยเชียงดาว อ.เชียงดาว จ.เชียงใหม่	-
2	CP	วัดป่าสุชะโต จ.ชัยภูมิ	-
3	DKT	อุทยานแห่งชาติดอยขุนตาน จ.ลำพูน	-
4	HRK	อุทยานแห่งชาติภูหินร่องกล้า จ.พิษณุโลก	-
5	KJB	อ.ศรีสวัสดิ์ จ.กาญจนบุรี	KJB 4, 7, 10

ตารางที่ 4.1 (ต่อ) แสดงแหล่งที่มา จำนวนตัวอย่างไลเคนที่เก็บ และจำนวนที่แยกได้

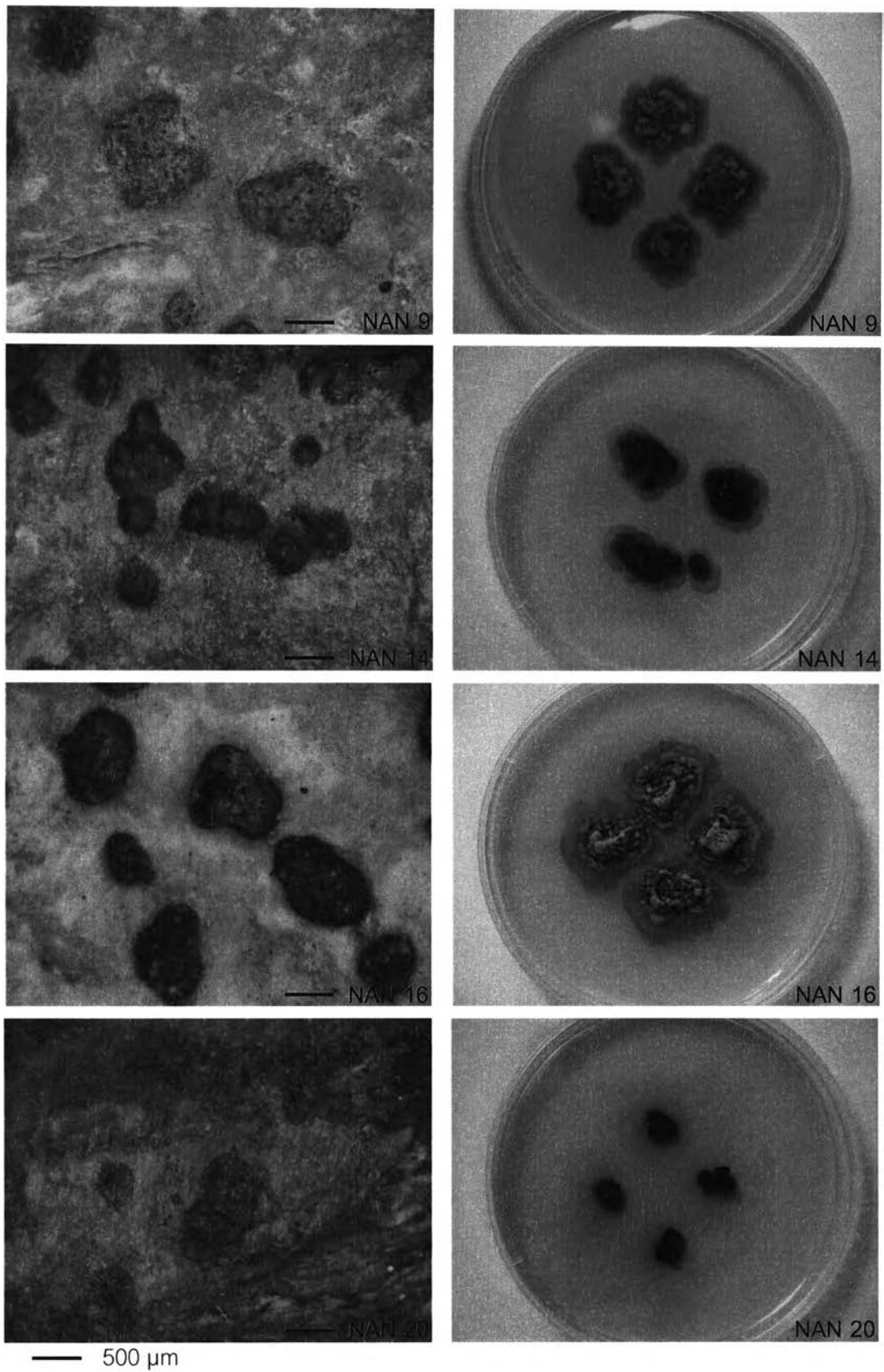
แหล่ง ที่เก็บ	รหัส	สถานที่เก็บ	Mycobiont ที่แยกได้
6	KRB	สระมรกต อ.คลองท่อม จ.กระบี่	KRB 5
7	KY	อุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ จ.นครราชสีมาและนครนายก	KY 418
8	L	จ.เลย	L 5,12
9	NAN	ต.ไหล่น่าน อ.เวียงสา จ.น่าน	NAN 5, 9, 14, 16, 20, 23, 29, 34, 36, 39, 40, 42, 43, 50, 51, 59, 71, 72, 76, 83, 86, 87, 90, 93, 104, 106, 107
10	NBR	จ.นนทบุรี	-
11	NSR	บ้านทานพอ อ.ฉวาง จ.นครศรีธรรมราช	NSR 6, 16, 34, 37, 52, 59
12	PB	อ.เมือง จ.เพชรบูรณ์	PB 2, 4, 5
13	PL	น้ำตกแก่งโสภา อ.นครไทย จ.พิษณุโลก	PL 3, 4, 10, 19
14	RN	อ.เมือง จ.ระนอง	RN 5
15	SMS	เกาะเสม็ดสาร จ.ชลบุรี	SMS 17
16	TLN	อุทยานแห่งชาติทับลาน จ.ปราจีนบุรี	TLN 3
17	TSL	อุทยานแห่งชาติทุ่งแสลงหลวง จ.พิษณุโลก และ จ.เพชรบูรณ์	TSL 11, 32, 35, 36, 42, 55, 63, 65, 67, 72, 103, 107, 110, 120



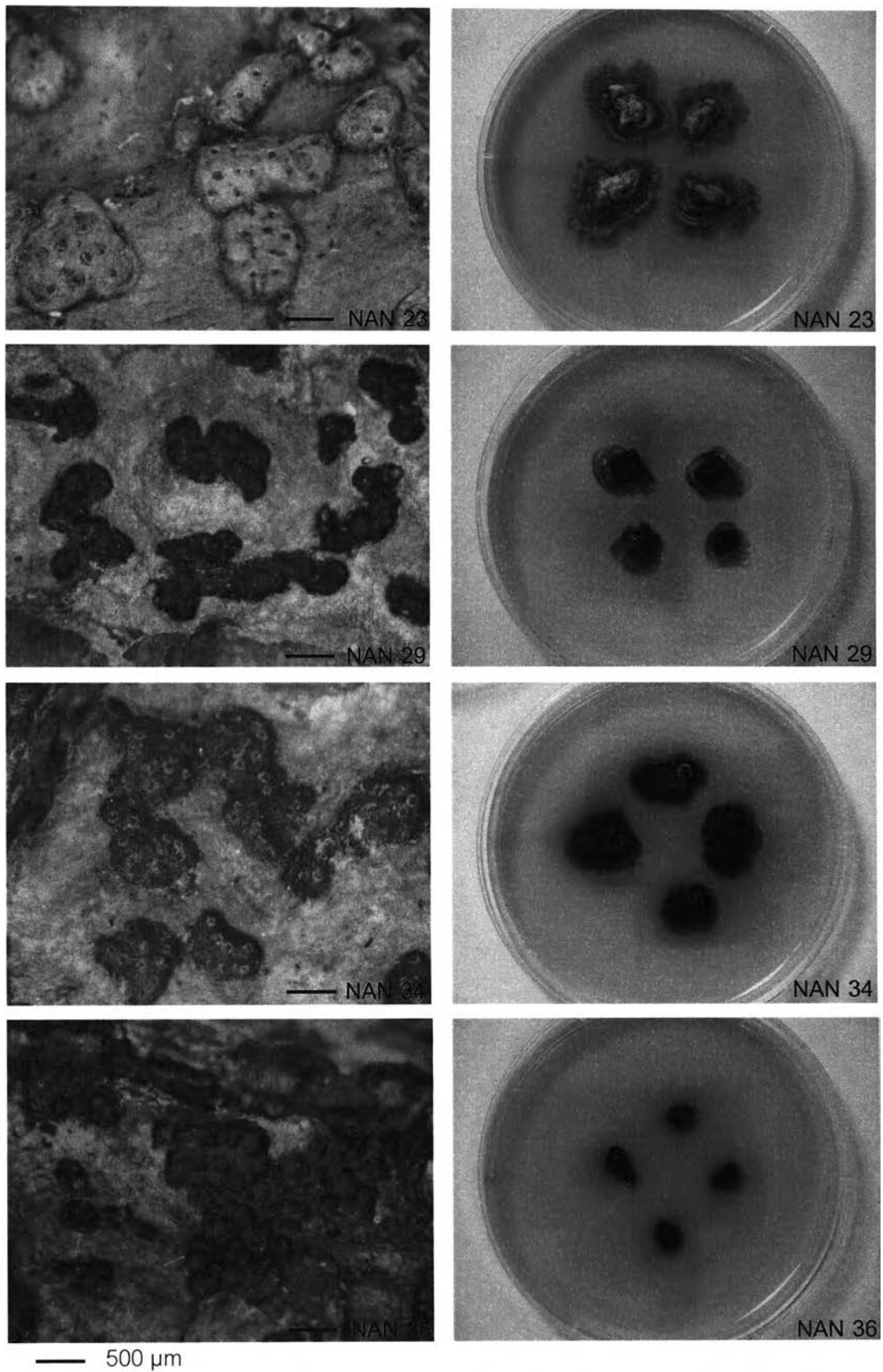
ภาพที่ 4.1 แสดงลักษณะของเทลีสที่สามารแยกราที่ก่อให้เกิดไลเคนได้ (ซ้าย) และ ลักษณะโคโลนีของราที่แยกได้บนอาหาร MYA เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (ขวา)



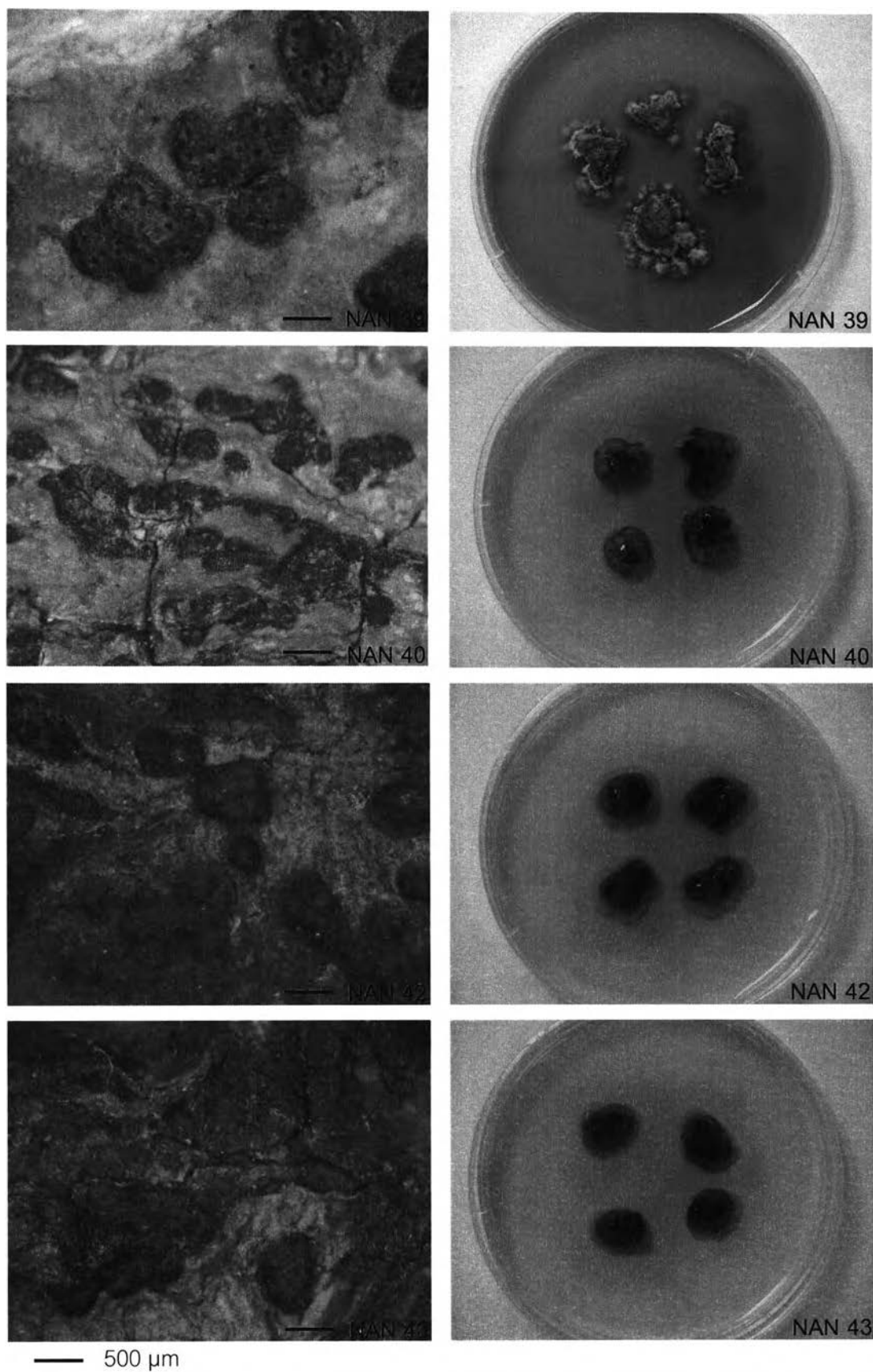
ภาพที่ 4.1 (ต่อ) แสดงลักษณะของแทลด์ส์ที่สามารถแยกรากที่ก่อให้เกิดเอทานอลได้ (ซ้าย) และลักษณะโคโลนีของรากที่แยกได้บนอาหาร MYA เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (ขวา)



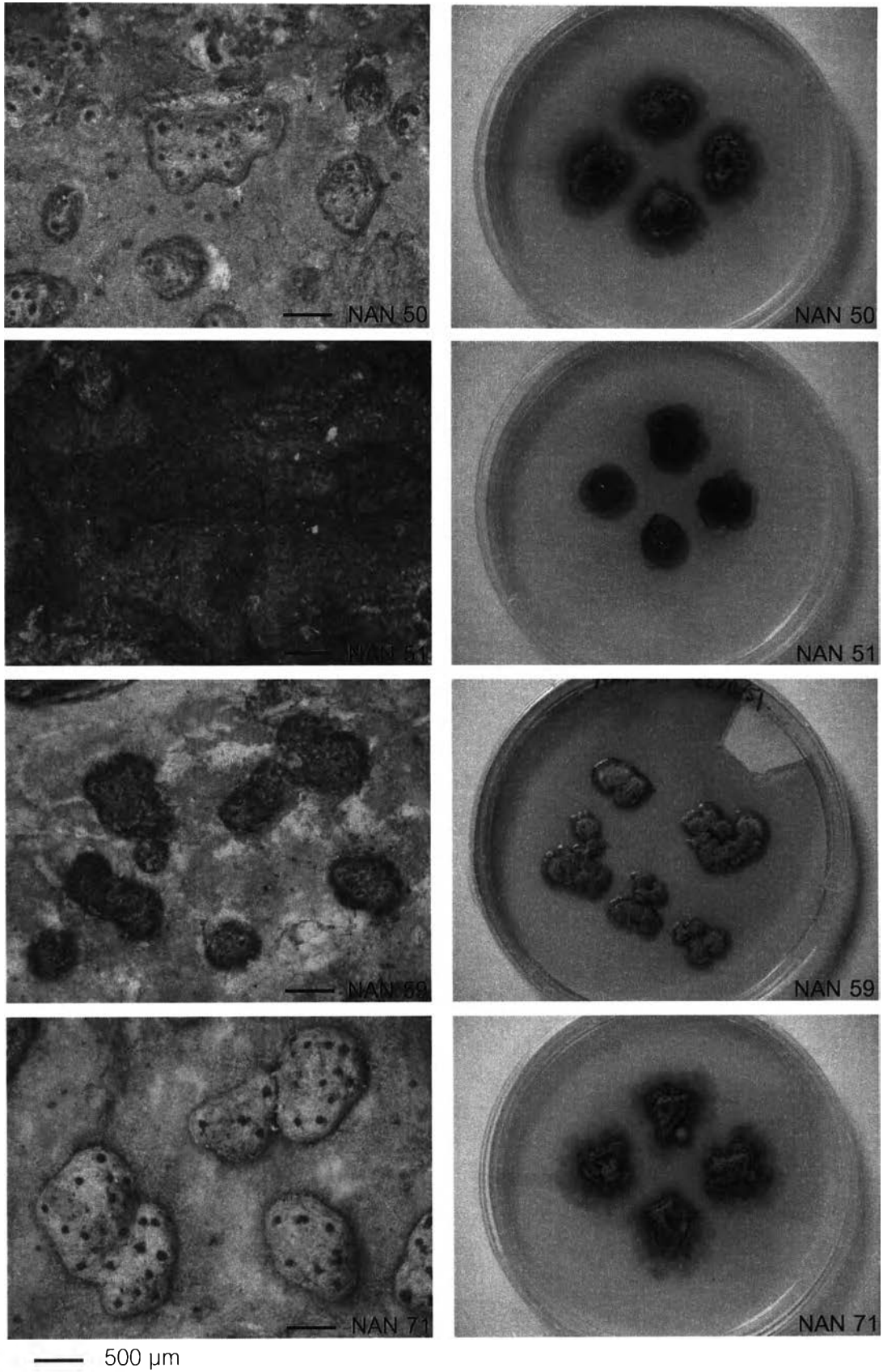
ภาพที่ 4.1 (ต่อ) แสดงลักษณะของแทลลัสที่สามารถแยกรากที่ก่อให้เกิดไลเคนได้ (ซ้าย) และลักษณะโคโลนีของรากที่แยกได้บนอาหาร MYA เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (ขวา)



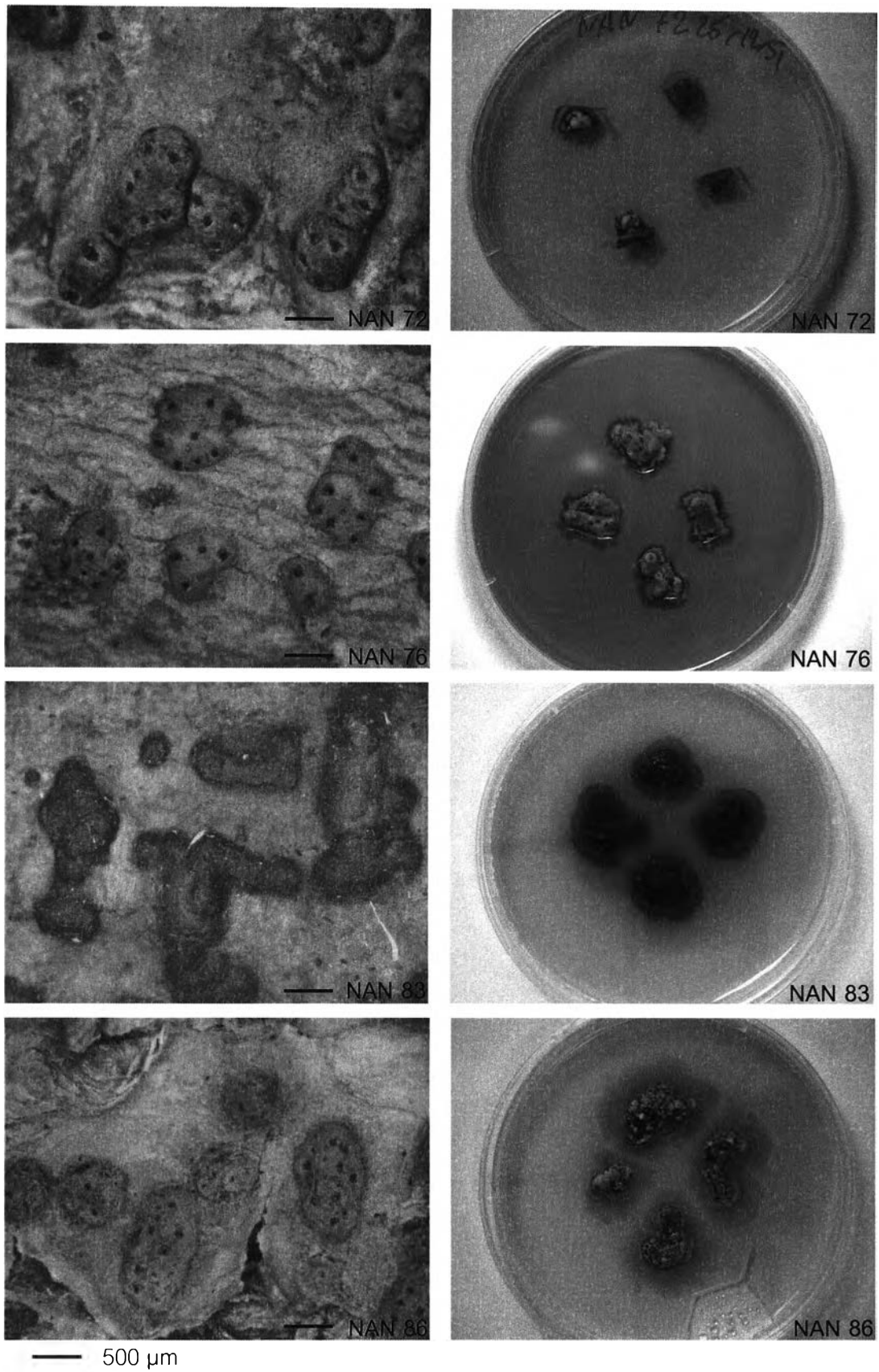
ภาพที่ 4.1 (ต่อ) แสดงลักษณะของเทลลีสที่สามารแยกราที่ก่อให้เกิดไลเคนได้ (ซ้าย) และ ลักษณะโคโลนีของราที่แยกได้บนอาหาร MYA เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (ขวา)



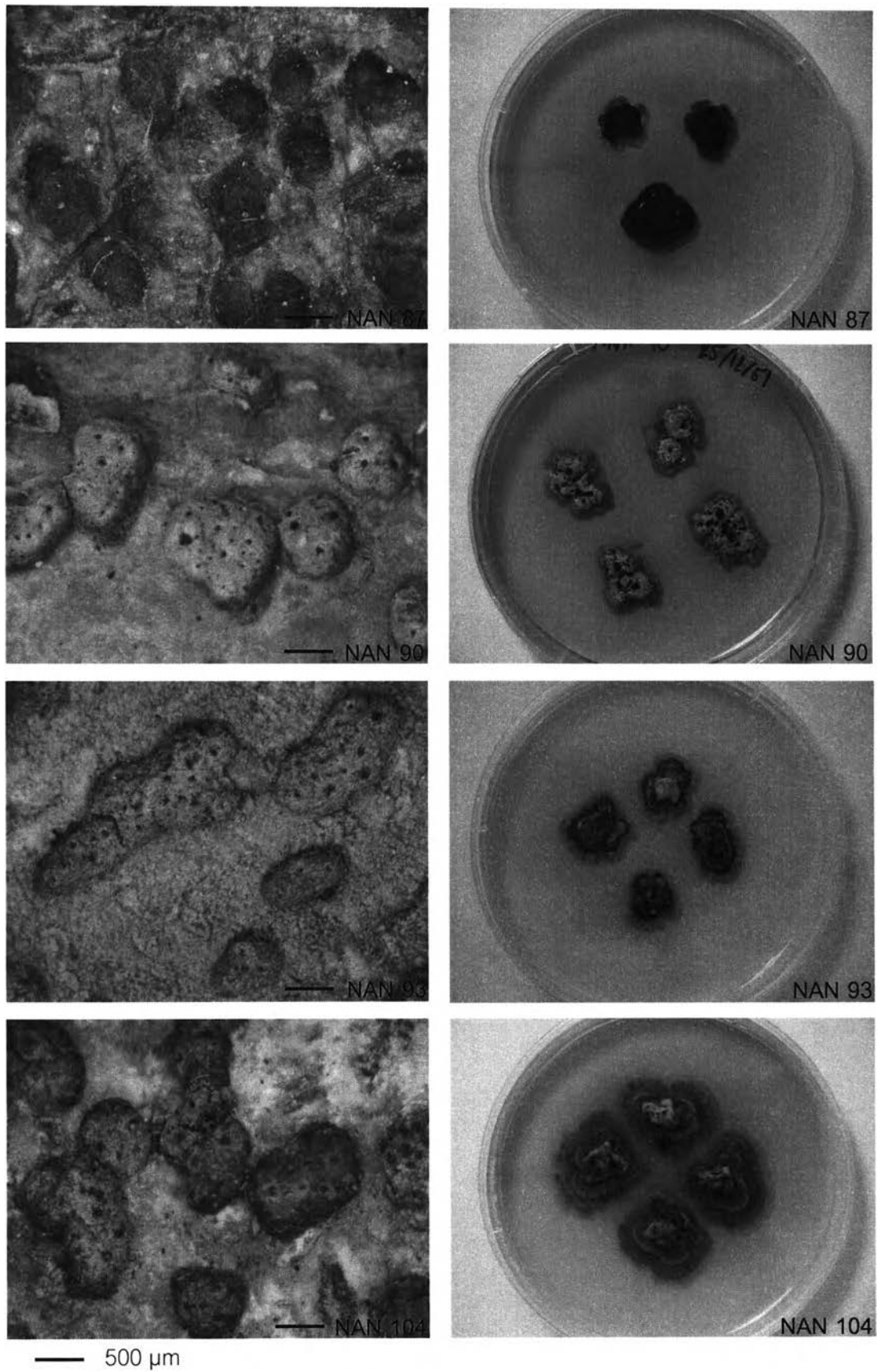
ภาพที่ 4.1 (ต่อ) แสดงลักษณะของเชื้อยีสต์ที่สามารถแยกได้ที่ก่อให้เกิดไลเคนได้ (ซ้าย) และ ลักษณะโคโลนีของราที่แยกได้บนอาหาร MYA เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (ขวา)



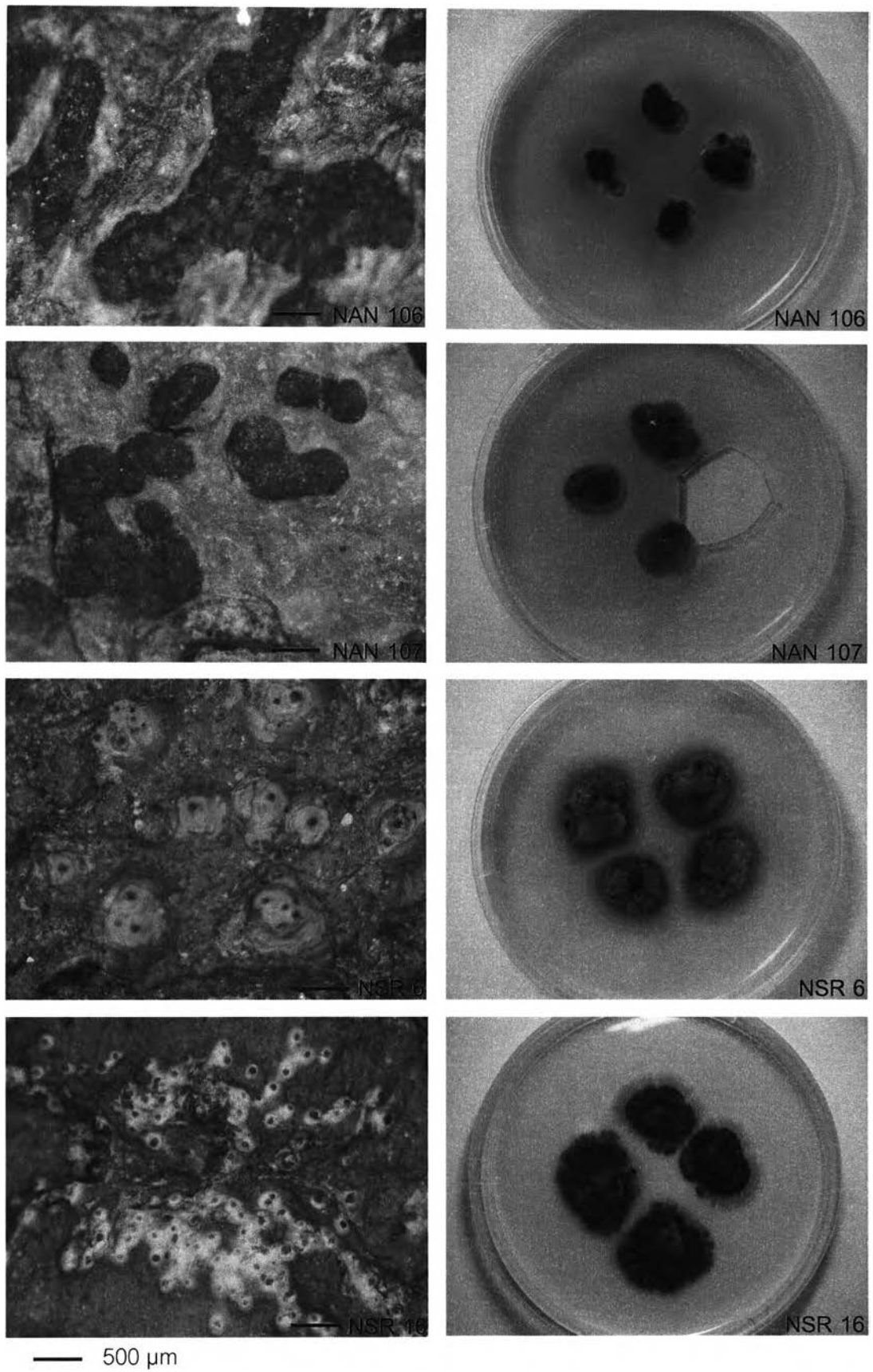
ภาพที่ 4.1 (ต่อ) แสดงลักษณะของเซลล์ที่สามารถแยกจากที่ก่อให้เกิดไลเคนได้ (ซ้าย) และ ลักษณะโคโลนีของราที่แยกได้บนอาหาร MYA เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (ขวา)



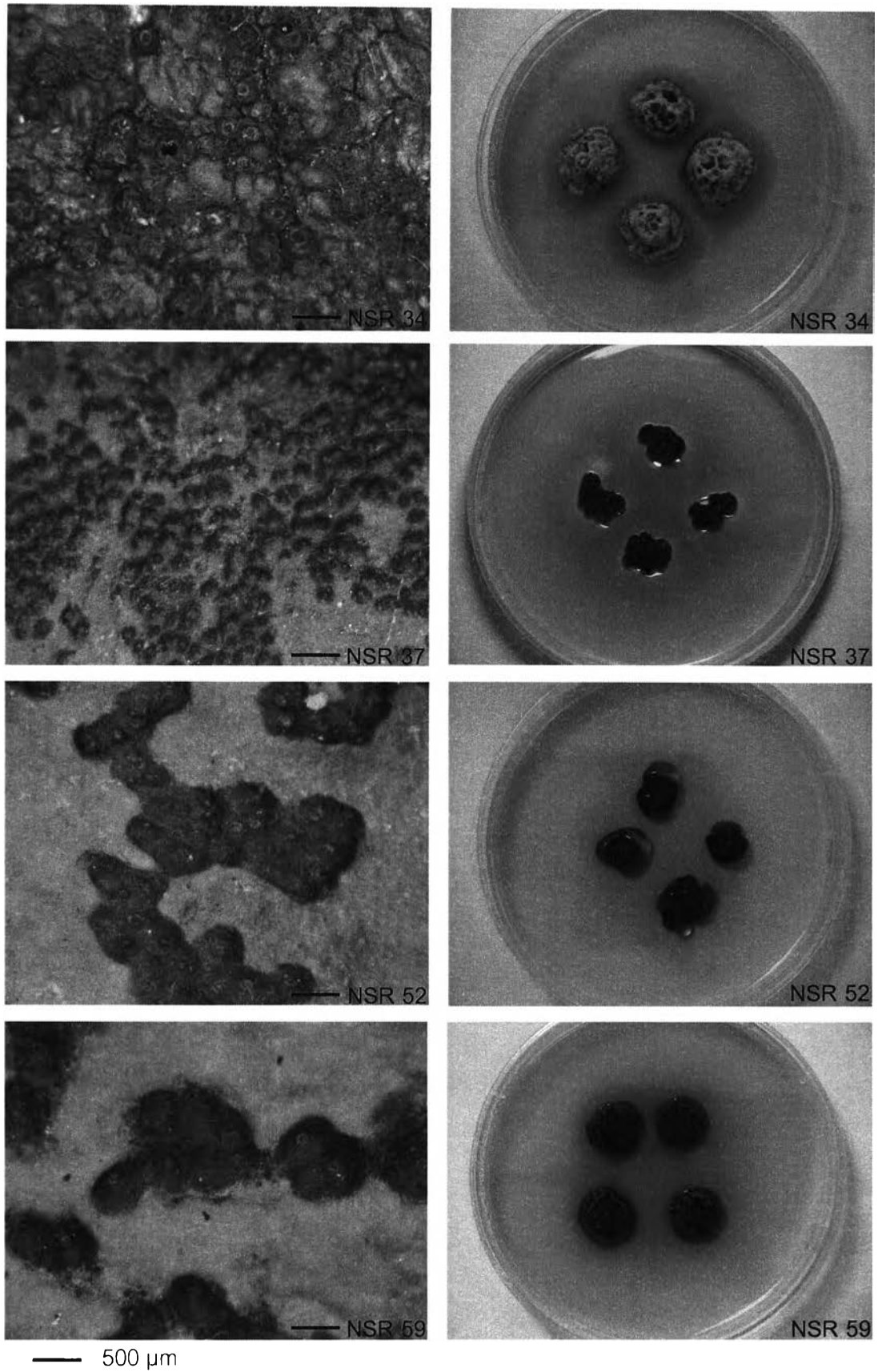
ภาพที่ 4.1 (ต่อ) แสดงลักษณะของแกลลัสที่สามารถแยกราที่ก่อให้เกิดไลเคนได้ (ซ้าย) และลักษณะโคโลนีของราที่แยกได้บนอาหาร MYA เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (ขวา)



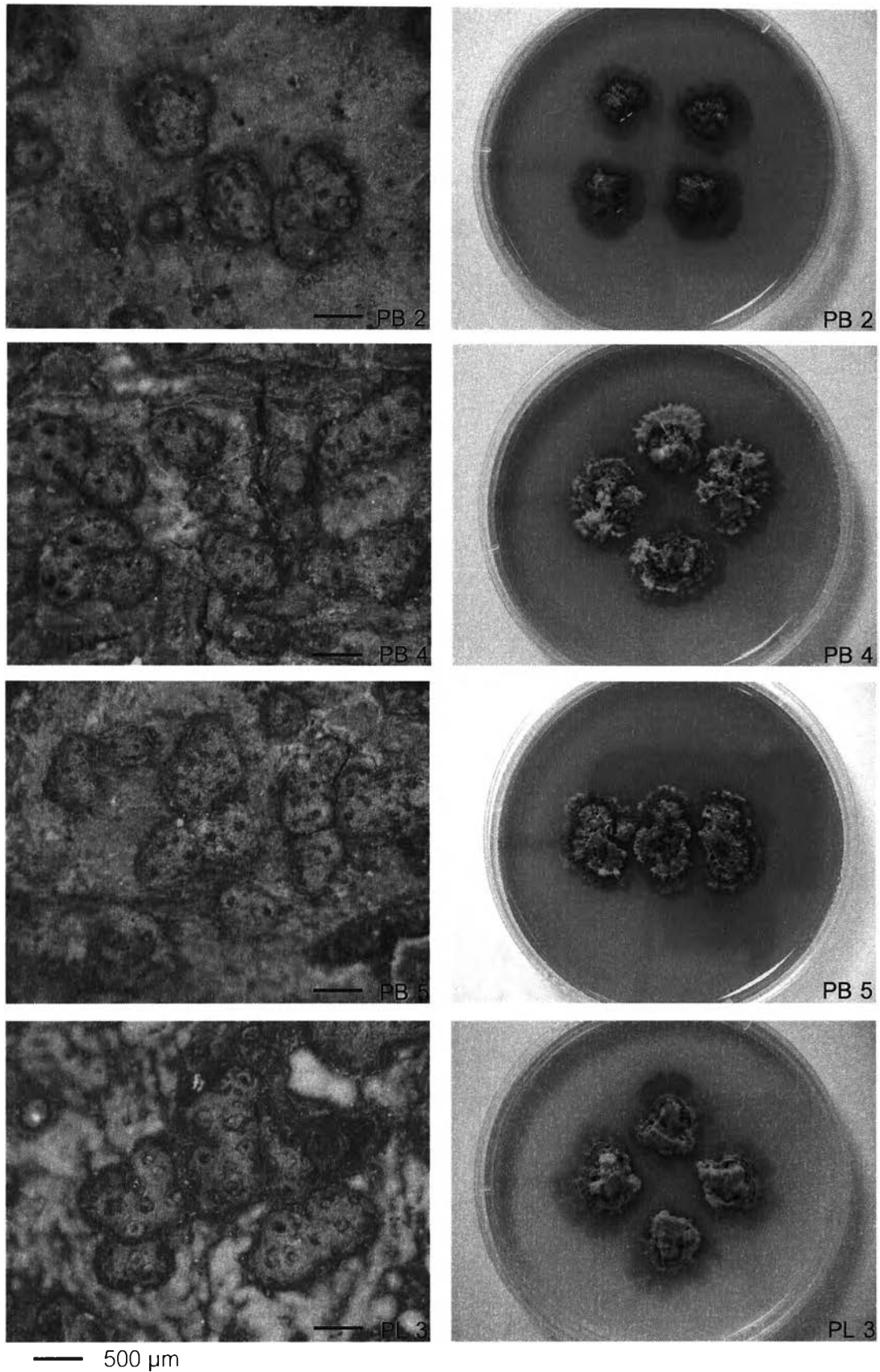
ภาพที่ 4.1 (ต่อ) แสดงลักษณะของเทลลีสที่สามารถแยกราที่ก่อให้เกิดไลเคนได้ (ซ้าย) และ ลักษณะโคโลนีของราที่แยกได้บนอาหาร MYA เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (ขวา)



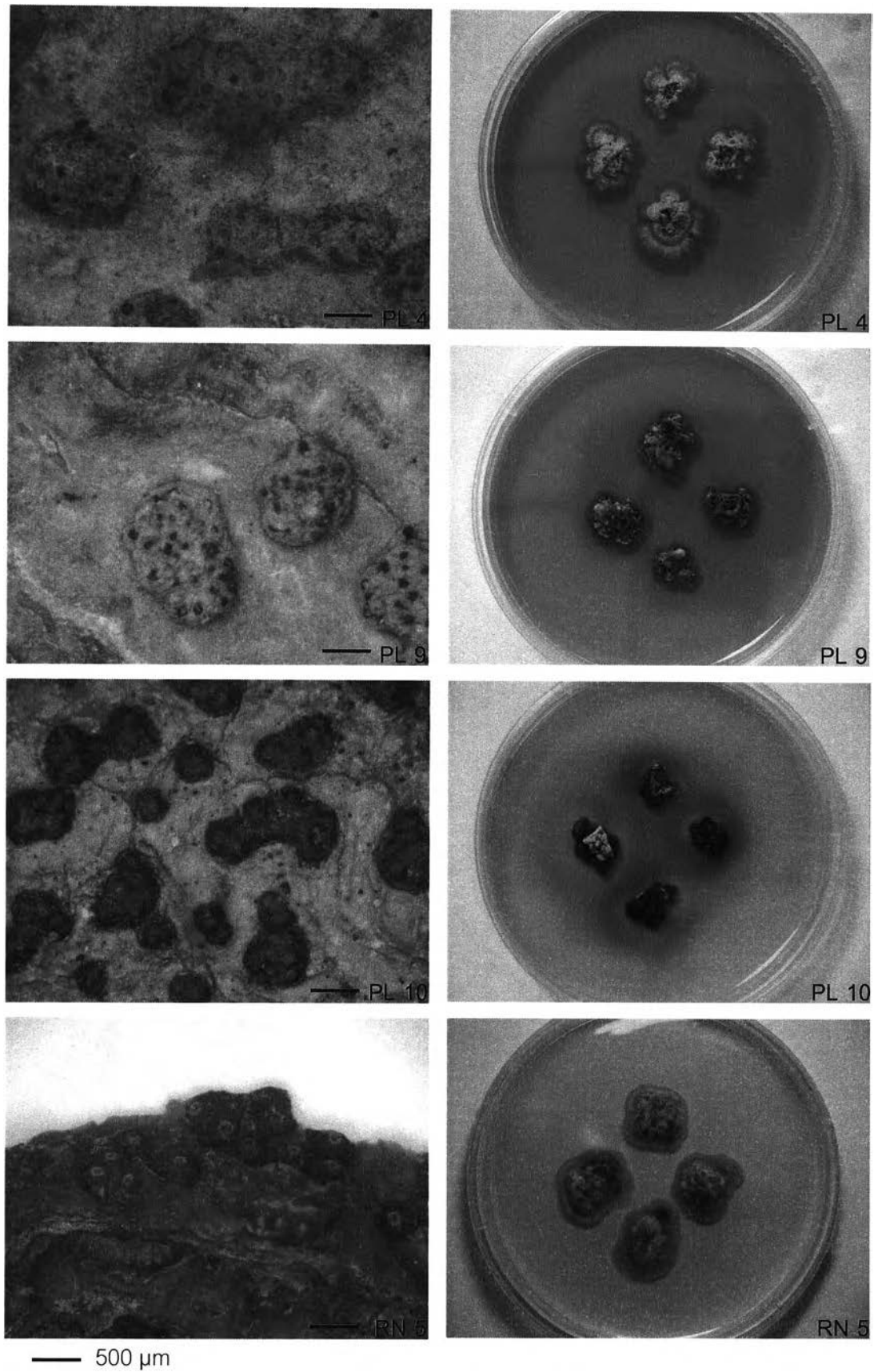
ภาพที่ 4.1 (ต่อ) แสดงลักษณะของยีสต์ที่สามารถแยกราคที่ก่อให้เกิดเอทานอลได้ (ซ้าย) และ
ลักษณะโคโลนีของยีสต์ที่แยกได้บนอาหาร MYA เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (ขวา)



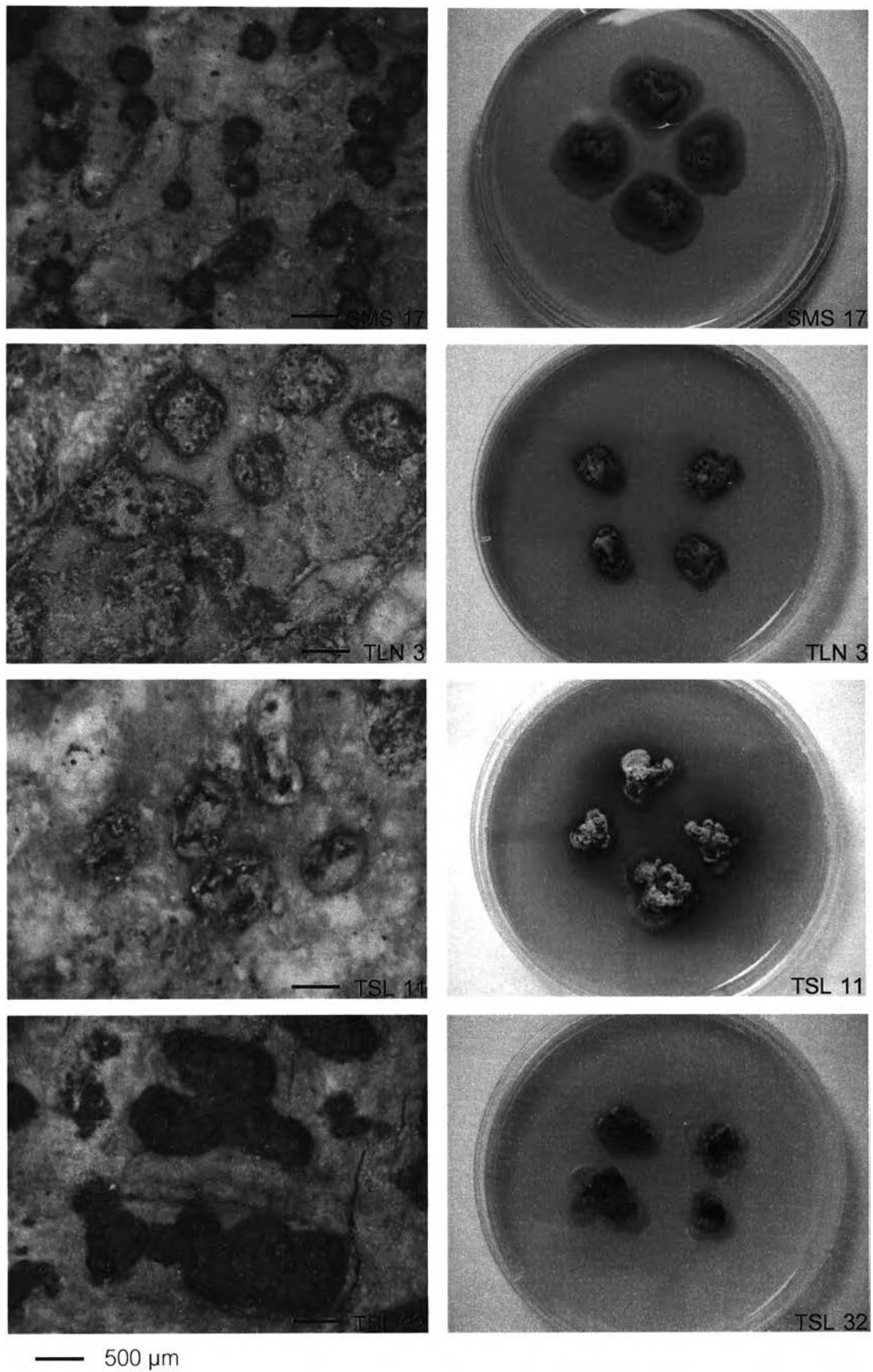
ภาพที่ 4.1 (ต่อ) แสดงลักษณะของแทลล์ที่สามารถแยกรากที่ก่อให้เกิดเอทานอลได้ (ซ้าย) และลักษณะโคโลนีของรากที่แยกได้บนอาหาร MYA เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (ขวา)



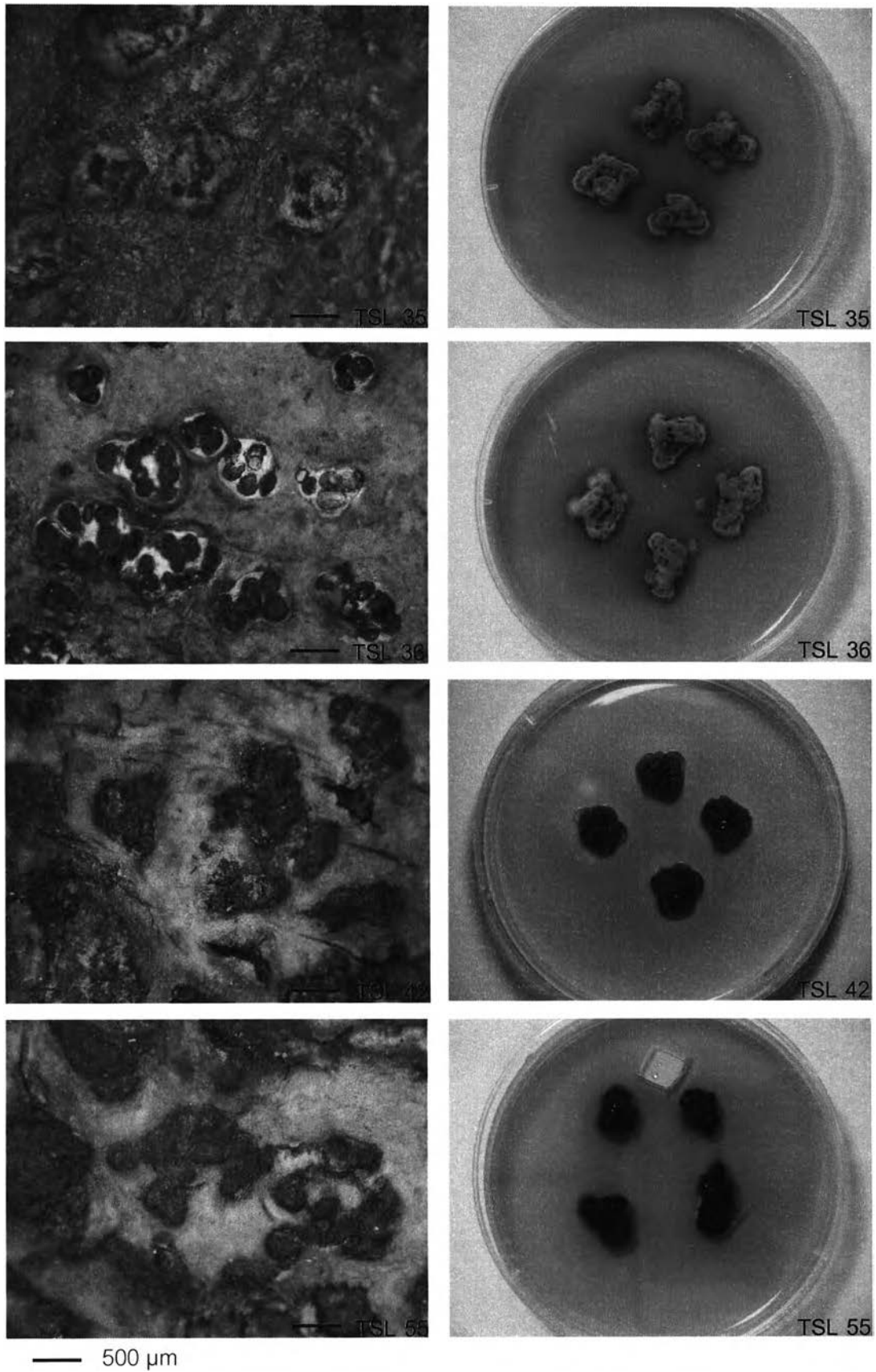
ภาพที่ 4.1 (ต่อ) แสดงลักษณะของยีสต์ที่สามารถแยกจากที่ก่อให้เกิดไลเคนได้ (ซ้าย) และลักษณะโคโลนีของราที่แยกได้บนอาหาร MYA เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (ขวา)



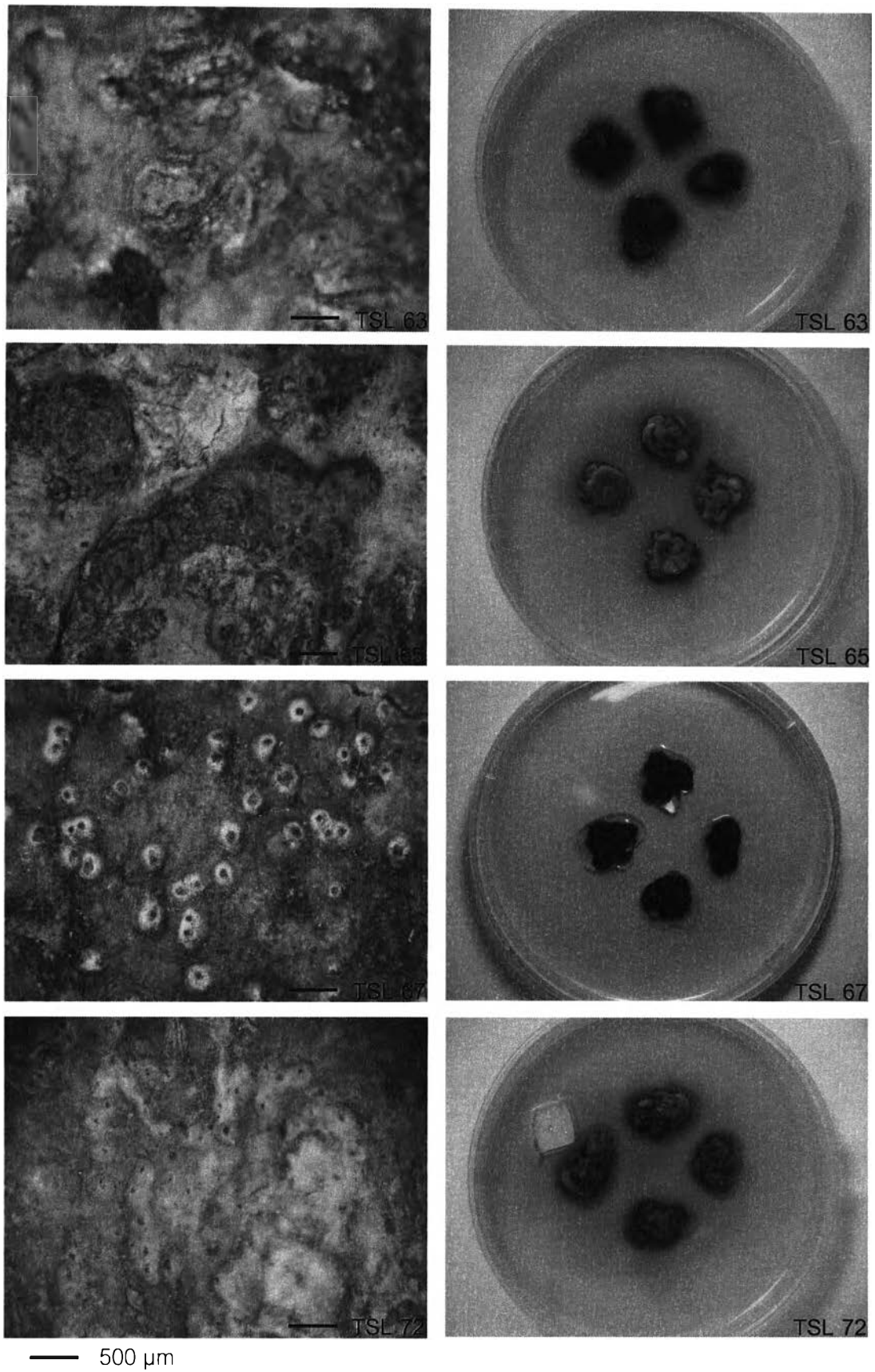
ภาพที่ 4.1 (ต่อ) แสดงลักษณะของแทลลัสที่สามารถแยกราที่ก่อให้เกิดไลเคนได้ (ซ้าย) และ ลักษณะโคโลนีของราที่แยกได้บนอาหาร MYA เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (ขวา)



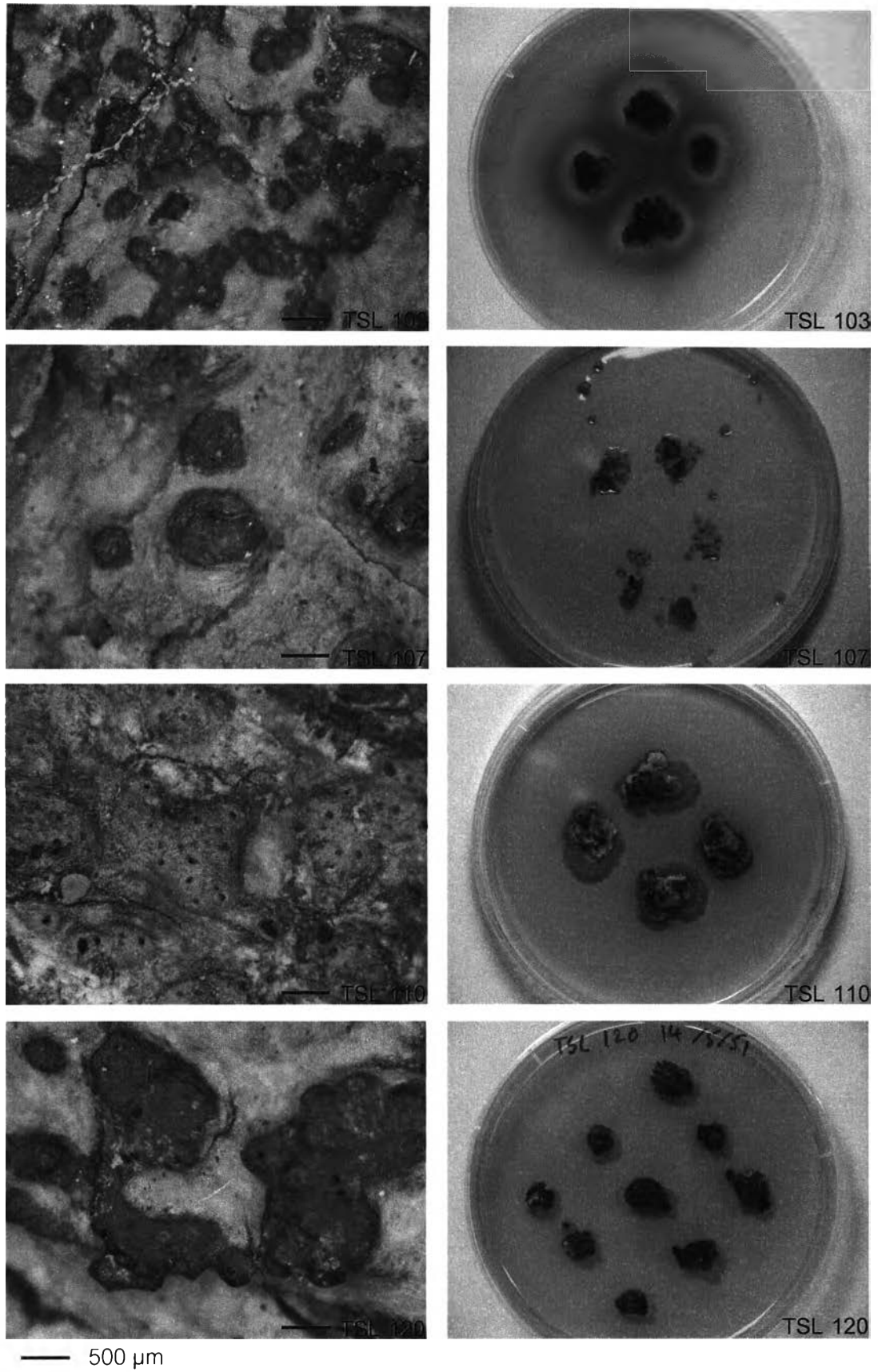
ภาพที่ 4.1 (ต่อ) แสดงลักษณะของแทลด์ที่สามารถแยกรากที่ก่อให้เกิดไลเคนได้ (ซ้าย) และลักษณะโคโลนีของรากที่แยกได้บนอาหาร MYA เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (ขวา)



ภาพที่ 4.1 (ต่อ) แสดงลักษณะของแทลลัสที่สามารถแยกراثีก่อให้เกิดไลเคนได้ (ซ้าย) และ ลักษณะโคโลนีของراثิที่แยกได้บนอาหาร MYA เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (ขวา)



ภาพที่ 4.1 (ต่อ) แสดงลักษณะของแทลลัสที่สามารถแยกราที่ก่อให้เกิดไลเคนได้ (ซ้าย) และ ลักษณะโคโลนีของราที่แยกได้บนอาหาร MYA เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (ขวา)



ภาพที่ 4.1 (ต่อ) แสดงลักษณะของเชื้อราที่สามารถแยกจากที่ก่อให้เกิดไลเคนได้ (ซ้าย) และ ลักษณะโคโลนีของราที่แยกได้บนอาหาร MYA เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (ขวา)

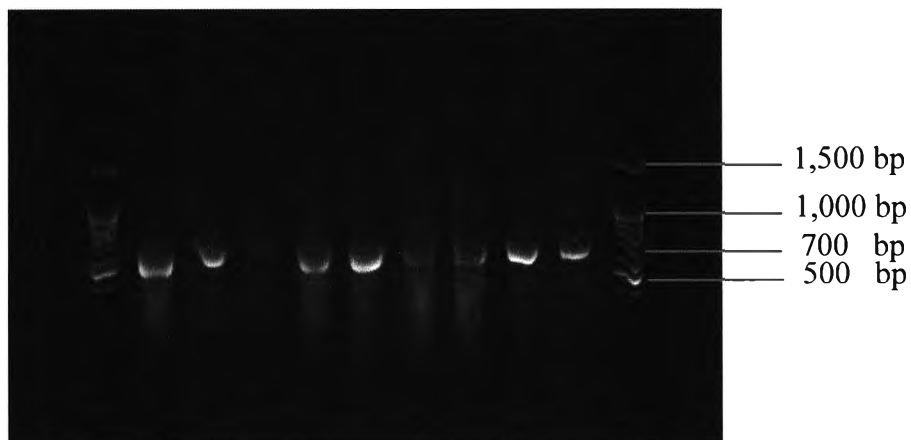
4.3 ผลการจัดจำแนกไลเคนด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไลเคนที่สปอร์งอกและพัฒนาเป็นโคโลนีได้จำนวน 64 ไอโซเลต พบว่า สามารถจัดกลุ่มตามลักษณะสีเพอริทีเซีย จำนวนผนังกั้นสปอร์ และการทดสอบการทำปฏิกิริยาเคมีของโครงสร้างสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (perithecia) กับสารละลาย 10% KOH พบว่า สามารถแบ่งออกได้เป็น 6 กลุ่ม ดังแสดงในตารางที่ 4.2 โดยมีลักษณะที่สำคัญในแต่ละกลุ่ม ได้แก่

- | | |
|--------------|---|
| กลุ่มที่ I | มีเพอริทีเซียสีเหลือง ผนังกั้นสปอร์จำนวน 3 ผนัง และเพอริทีเซียทำปฏิกิริยาเคมีกับสารละลาย 10% KOH |
| กลุ่มที่ II | มีเพอริทีเซียสีขาว ผนังกั้นสปอร์จำนวน 3 ผนัง และเพอริทีเซียทำปฏิกิริยาเคมีกับสารละลาย 10% KOH |
| กลุ่มที่ III | มีเพอริทีเซียสีดำ ผนังกั้นสปอร์จำนวน 3 ผนัง และเพอริทีเซียไม่ทำปฏิกิริยาเคมีกับสารละลาย 10% KOH |
| กลุ่มที่ IV | มีเพอริทีเซียสีขาว ผนังกั้นสปอร์จำนวนมากกว่า 3 ผนัง และเพอริทีเซียทำปฏิกิริยาเคมีกับสารละลาย 10% KOH |
| กลุ่มที่ V | มีเพอริทีเซียสีดำ ผนังกั้นสปอร์มากกว่า 3 ผนัง และเพอริทีเซียทำปฏิกิริยาเคมีกับสารละลาย 10% KOH |
| กลุ่มที่ VI | มีเพอริทีเซียสีเหลือง ผนังกั้นสปอร์จำนวนมากกว่า 3 ผนัง และเพอริทีเซียทำปฏิกิริยาเคมีกับสารละลาย 10% KOH |

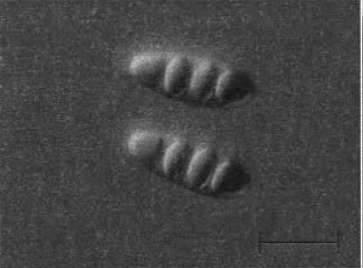
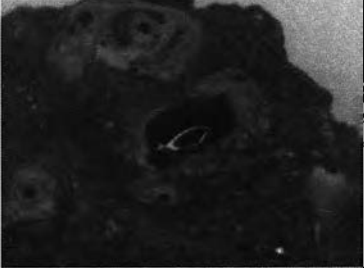



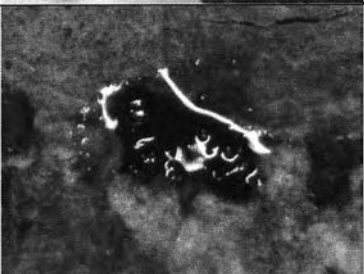
4.4 ผลการเพิ่มขึ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง ITS จากราที่ก่อให้เกิดไลเคนสกุล *ทริพิทิเลียม*

จากการทดลองพบว่าชิ้นส่วนดีเอ็นเอของราที่ก่อให้เกิดไลเคนที่ตำแหน่ง ITS มีขนาดของประมาณ 561 - 960 bp ดังแสดงในภาพที่ 4.2




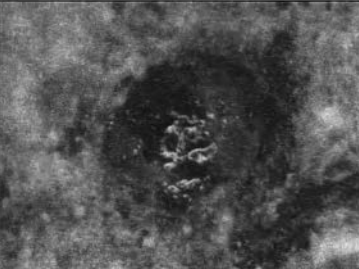

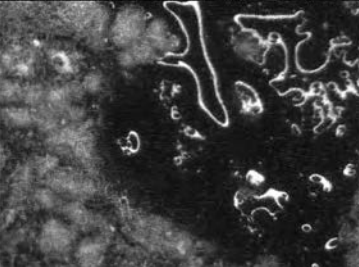
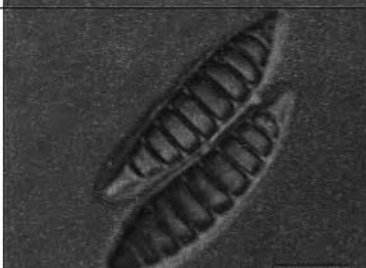
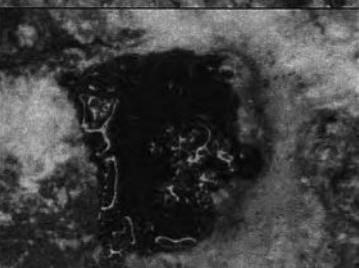
ภาพที่ 4.2 แสดงขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของราที่ก่อให้เกิดไลเคนที่ตำแหน่ง ITS

ตารางที่ 4.2 แสดงการจัดกลุ่มจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไลเคน

กลุ่ม	จำนวนผนังกันสปอร์	การทำปฏิกิริยาเคมีของเพอร์ริเทียเซียกับ 10% KOH	ไอโซเลตของราที่ก่อให้เกิดไลเคน
I			NSR 6, TSL 63, TSL72
II			NSR 16
III			KJB 4, KRB 5, NAN 14, NAN 20, NAN 29, NAN 34, NAN 36, NAN40, NAN 42, NAN 43, NAN 51, NAN 83, NAN 87, NAN 106, NAN 107, NSR 37, NSR 52, NSR 59, PL 10, RN 5, SMS 17, TSL 32, TSL 42, TSL 55, TSL 103, TSL 107, TSL 120

— 10 μm

ตารางที่ 4.2 (ต่อ) แสดงการจัดกลุ่มจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไลเคน

กลุ่ม	จำนวนผนังกันสปอร์	การทำปฏิกิริยาเคมีของเพอริทีเซียกับ 10% KOH	ไอโซเลตของราที่ก่อให้เกิดไลเคน
IV			TSL 67
V			NSR 34
VI			KJB 7, KJB 10, KY 418, L 5, L12, NAN 5, NAN 9, NAN 16, NAN 23, NAN 39, NAN 50, NAN 59, NAN 71, NAN 72, NAN 76, NAN 86, NAN 90, NAN 93, NAN 104, PB 2, PB 4, PB 5, PL 3, PL 4, PL 9, TLN 3, TSL 11, TSL 35, TSL 36, TSL 65, TSL 110

— 10 μ m

4.5 ผลการศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมของราที่ก่อให้เกิดไลเคนในสกุล ทริพิทิเลียมด้วยเทคนิค ITS-RFLP

จากการนำผลผลิตผลพีซีอาร์ของตัวอย่างราที่ก่อให้เกิดไลเคนที่ได้จากการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง ITS จำนวน 64 ไบโกลิตที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 3 ชนิด ได้แก่ *Mbol* *Hinf*I และ *Alu*I ตรวจสอบขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะด้วยเครื่อง Microchip Electrophoresis System (MCE-202 MultiNA) (ภาคผนวก จ) จากผลการตรวจสอบขนาดของแถบดีเอ็นเอมีความแตกต่างกัน พบว่า สามารถจัด จีโนไทป์ ราที่ก่อให้เกิดไลเคนในสกุลทริพิทิเลียมได้ เป็น 22 จีโนไทป์ โดยมีจำนวน 6 จีโนไทป์ ที่มีสมาชิกมากกว่า 1 ไบโกลิต ได้แก่ จีโนไทป์ ที่ 9 มีจำนวน 23 ไบโกลิต จีโนไทป์ ที่ 15 มีจำนวน 8 ไบโกลิต จีโนไทป์ ที่ 16 มีจำนวน 7 ไบโกลิต และจีโนไทป์ ที่ 6 10 และ 11 มีจีโนไทป์ละ 3 ไบโกลิต ในขณะที่ จีโนไทป์ที่เหลือจำนวน 16 จีโนไทป์ จะมีสมาชิกในแต่ละจีโนไทป์เพียง 1 ไบโกลิต เท่านั้น ดังแสดงในตารางที่ 4.3

จากตารางลักษณะจีโนไทป์ที่ได้จากการจัด ITS-RFLP เมื่อเปรียบเทียบกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้ง 6 กลุ่ม ทำให้สามารถแบ่งกลุ่มย่อยได้อย่างละเอียดมากขึ้น พบว่าตัวอย่างไบโกลิตราที่ก่อให้เกิดไลเคนมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่อยู่ในกลุ่มเดียวกันมักมีจีโนไทป์ต่างกัน และยังพบว่าไม่มีจีโนไทป์ใดที่เหมือนกันถูกจัดอยู่ในกลุ่มที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ต่างกัน

ตารางที่ 4.3 แสดงผลการวิเคราะห์ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค ITS-RFLP

จีโนไทป์	ไอโซเลตของราที่ก่อให้เกิดไลเคน	กลุ่มตาม พื้นฐาน วิทยา	ขนาด ของ ITS	รูปแบบของขนาดแถบดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (base pairs)		
				<i>Mbol</i>	<i>Hinfl</i>	<i>Alul</i>
1	TSL 107	III	960	349,213,175,111,53,48,10	487,265,200,8	-
2	NSR 37	III	920	330,178,164,100,89,48,11	345,252,202,95,26	506,414
3	NSR 6	I	838	363,172,127,120,48,8	555,202,73,8	611,143,84
4	TSL 103	III	790	331,178,89,72,60,49,11	352,318,94,26	474,316
5	NAN 106	III	716	198,181,148,144,45	274,216,176,50	584,132
6	NAN 20,36, 51	III	715	378,148,145,45	274,216,111,66,49	585,131
7	TSL 72	I	655	311,179,116,49	367,288	518,137
8	NAN 93	VI	655	304,180,122,49	282,273,92,8	319,191,145
9	PL 3,4,9; PB 2,4,5; KJB 7,10; L 5; TLN 3; NAN5,9,16,23,39,50,59,71,72,76,86,90,104	VI	652	301,178,124,49	270,197,92,85,8	317,188,147
10	TSL 35, 36; L 12	VI	646	301,173,123,49	368,278	408,93,92,53
11	KY 418; TSL 65, 110	VI	637	184,167,121,116,,49	276,177,121	298,195,143

ตารางที่ 4.3 (ต่อ) แสดงผลการวิเคราะห์ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค ITS-RFLP

จีโนไทป์	ไอโซเลตของราที่ก่อให้เกิดไลเคน	กลุ่มตาม พื้นฐาน วิทยา	ขนาด ของ ITS	รูปแบบของขนาดแถบดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (base pairs)		
				<i>Mbol</i>	<i>Hinfl</i>	<i>Alul</i>
12	PL 10	III	631	197,181,148,60,45	274,216,92,49	500,131
13	TSL 67	IV	630	172,167,115,64,63,49	354,276	493,137
14	SMS 17	III	628	174,155,136,85,49,29	341,279,8	-
15	NAN 29,40,43,87; TSL 32,42,55,120	III	621	188,187,122,60,54,10	313,227,81	407,98,76,23,17
16	KJB 4; NSR 59; NAN 14,34,42,83,107	III	620	188,183,179,60,10	320,292,8	494,126
17	NSR 52	III	619	240,187,182,10	312,307	411,98,48,39,23
18	KRB 5	III	609	302,214,49,44	338,185,86	556,53
19	RN 5	III	606	215,155,111,49,40,36	388,187,73,8	505,78,23
20	TSL 63	I	581	157,141,88,86,60,49	306,267,8	499,82
21	NSR 34	V	570	293,168,60,49	300,262,8	300,182,83,5
22	NSR 16	II	561	283,169,58,49	252,209,92,8	-

4.6 ผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของราที่ก่อให้เกิดไลเคนสกุลทริพิทีเลียมด้วยเทคนิคอณูวิทยาที่ตำแหน่ง ITS และ mtSSU

จากผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยนำตัวแทนกลุ่มของราที่ก่อให้เกิดไลเคนสกุลทริพิทีเลียมที่ได้จากการจัดรูปแบบของขนาดแถบดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะจำนวน 35 ไอโซเลต จาก 22 กลุ่ม พบว่า จีโนไทป์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง ITS ได้จำนวน 35 ไอโซเลต และ mtSSU จำนวน 32 ไอโซเลต โดยมีจำนวน 3 ไอโซเลต ได้แก่ KRB 5 PL 10 และ NAN 42 ไม่สามารถเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง mtSSU ได้ จากการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้เปรียบเทียบกับความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง ITS และ mtSSU ที่ได้มีรายงานไว้ในฐานข้อมูลของ GenBank โดยใช้โปรแกรม Blast version 2.2.18 ที่จัดทำโดย DDBJ (www.ddbj.nig.ac.jp) พบว่า ที่ตำแหน่ง ITS มีความเหมือนกับราในกลุ่ม Trypetheliales Pyrenulales Pleosporales Candelariales และ Chaetothyriales อยู่ในช่วง 82-95 เปอร์เซ็นต์ ส่วนตำแหน่ง mtSSU มีความเหมือนกับราในกลุ่ม Trypetheliales และ Pyrenulales อยู่ในช่วง 92-100 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 แสดงการเป็นเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง ITS และ mtSSU ของตัวอย่างราที่ก่อให้เกิดไลเคนในสกุลที่ศึกษากับตัวอย่างชนิดรา
จากฐานข้อมูล GeneBank

ไอโซเลต	ITS				mtSSU			
	ชนิดราที่มีความเหมือนที่สุด และ Accession number	อันดับ	เบสที่ ซ้อนทับ (bp)	ความ เหมือน (%)	ชนิดราที่มีความเหมือนที่สุด และ Accession number	อันดับ	เบสที่ ซ้อนทับ (bp)	ความ เหมือน (%)
KRB 5	<i>Pyrgillus javanicus</i> (DQ826741)	Pyrenulales	498/581	85%	-	-	-	-
KY 418	<i>Pseudorobillarda sojae</i> (FJ825371)	Pleosporales	184/198	92%	<i>Trypethelium subeluteriae</i> (DQ329009)	Trypetheliales	617/661	93%
L 12	<i>Candelaria concolor</i> (FJ959355)	Candelariales	177/187	94%	<i>Trypethelium eluteriae</i> (DQ328990)	Trypetheliales	664/684	97%
NAN 9	<i>Preussia isomera</i> (GQ203763)	Pleosporales	177/188	94%	<i>Trypethelium subeluteriae</i> (DQ329009)	Trypetheliales	637/658	96%
NAN14	<i>Pyrgillus javanicus</i> (DQ826741)	Pyrenulales	240/265	90%	<i>Pyrenula cruenta</i> (AY584719)	Pyrenulales	587/607	96%
NAN 20	<i>Chaetothyriales sp.</i> (FJ538964)	Chaetothyriales	159/180	88%	<i>Pyrenula subpraelucida</i> (DQ328986)	Pyrenulales	610/639	95%
NAN 36	<i>Chaetothyriales sp.</i> (FJ538964)	Chaetothyriales	159/180	88%	<i>Pyrenula subpraelucida</i> (DQ328986)	Pyrenulales	610/639	95%
NAN 40	<i>Pyrgillus javanicus</i> (DQ826741)	Pyrenulales	252/302	83%	<i>Pyrenula cruenta</i> (AY584719)	Pyrenulales	588/607	96%
NAN 42	<i>Pyrgillus javanicus</i> (DQ826741)	Pyrenulales	241/265	90%	-	-	-	-
NAN 43	<i>Pyrgillus javanicus</i> (DQ826741)	Pyrenulales	253/302	83%	<i>Pyrenula subpraelucida</i> (DQ328986)	Pyrenulales	611/639	95%
NAN 51	<i>Chaetothyriales sp.</i> (FJ538964)	Chaetothyriales	159/180	88%	<i>Pyrenula subpraelucida</i> (DQ328986)	Pyrenulales	610/639	95%
NAN 76	<i>Preussia isomera</i> (GQ203763)	Pleosporales	177/188	94%	<i>Trypethelium subeluteriae</i> (DQ329009)	Trypetheliales	636/660	96%
NAN 93	<i>Preussia isomera</i> (GQ203763)	Pleosporales	177/188	94%	<i>Trypethelium subeluteriae</i> (DQ329009)	Trypetheliales	637/658	96%

ตารางที่ 4.4 (ต่อ) แสดงการเป็นเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง ITS และ mtSSU ของตัวอย่างราที่ก่อให้เกิดไลเคนในสกุลที่ศึกษากับตัวอย่างชนิดรากฐานข้อมูล GeneBank

ไอโซเลต	ITS				mtSSU			
	ชนิดราที่มีความเหมือนที่สุด และ Accession number	อันดับ	เบสที่ ซ้อนทับ (bp)	ความ เหมือน (%)	ชนิดราที่มีความเหมือนที่สุด และ Accession number	อันดับ	เบสที่ ซ้อนทับ (bp)	ความ เหมือน (%)
NAN 106	<i>Rhinocladiella</i> sp. (FJ265768)	Chaetothyriales	223/271	82%	<i>Pyrenula subpraelucida</i> (DQ328986)	Pyrenulales	610/639	95%
NAN 107	<i>Pyrgillus javanicus</i> (DQ826741)	Pyrenulales	241/265	90%	<i>Pyrenula cruenta</i> (AY584719)	Pyrenulales	570/610	93%
NSR 6	<i>Trypethelium</i> sp. (DQ782839)	Trypetheliales	253/288	87%	<i>Bathelium degenerans</i> (DQ328988)	Trypetheliales	652/678	96%
NSR 16	<i>Trypethelium</i> sp. (DQ782839)	Trypetheliales	308/365	84%	<i>Trypethelium nitidiusculum</i> (GU327706)	Trypetheliales	635/635	100%
NSR 34	<i>Lophiostoma</i> sp. (FJ372389)	Pleosporales	177/188	94%	<i>Bathelium degenerans</i> (DQ328988)	Trypetheliales	640/675	94%
NSR 37	<i>Pyrgillus javanicus</i> (DQ826741)	Pyrenulales	231/271	85%	<i>Pyrenula cruenta</i> (AY584719)	Pyrenulales	586/632	92%
NSR 52	<i>Pyrgillus javanicus</i> (DQ826741)	Pyrenulales	254/302	84%	<i>Pyrenula subpraelucida</i> (DQ328986)	Pyrenulales	611/638	95%
PL 10	<i>Rhinocladiella</i> sp. (FJ265768)	Chaetothyriales	224/271	82%	-	-	-	-
RN 55	<i>Fungal endophyte</i> sp. (EU686067)	-	155/162	95%	<i>Trypethelium tropicum</i> (GU327708)	Trypetheliales	579/585	98%
SMS 17	<i>Trypethelium</i> sp. (DQ782839)	Trypetheliales	158/166	95%	<i>Trypethelium tropicum</i> (GU327708)	Trypetheliales	570/585	97%
TLN 3	<i>Preussia antarctica</i> (GQ203772)	Pleosporales	180/192	93%	<i>Trypethelium subeluteriae</i> (DQ329009)	Trypetheliales	637/658	96%
TSL 32	<i>Pyrgillus javanicus</i> (DQ826741)	Pyrenulales	254/302	84%	<i>Pyrenula subpraelucida</i> (DQ328986)	Pyrenulales	606/640	94%
TSL 35	<i>Candelaria concolor</i> (FJ959355)	Candelariales	177/187	94%	<i>Trypethelium eluteriae</i> (DQ328990)	Trypetheliales	664/684	97%

ตารางที่ 4.4 (ต่อ) แสดงการเป็นเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง ITS และ mtSSU ของตัวอย่างราที่ก่อให้เกิดไลเคนในสกุลที่ศึกษากับตัวอย่างชนิดรากฐานข้อมูล GeneBank

ไอโซเลต	ITS				mtSSU			
	ชนิดราที่มีความเหมือนที่สุด และ Accession number	อันดับ	เบสที่ ซ้อนทับ (bp)	ความ เหมือน (%)	ชนิดราที่มีความเหมือนที่สุด และ Accession number	อันดับ	เบสที่ ซ้อนทับ (bp)	ความ เหมือน (%)
TSL 36	<i>Candelaria concolor</i> (FJ959355)	Candelariales	177/187	94%	<i>Trypethelium eluteriae</i> (DQ328990)	Trypetheliales	664/684	97%
TSL 42	<i>Pyrgillus javanicus</i> (DQ826741)	Pyrenulales	249/302	82%	<i>Pyrenula subpraelucida</i> (DQ328986)	Pyrenulales	596/626	95%
TSL 63	<i>Trypethelium sp.</i> (DQ782839)	Trypetheliales	358/430	83%	<i>Bathelium degenerans</i> (DQ328988)	Trypetheliales	641/671	95%
TSL 65	<i>Pseudorobillarda sojae</i> (FJ825371)	Pleosporales	184/198	92%	<i>Trypethelium subeluteriae</i> (DQ329009)	Trypetheliales	653/658	99%
TSL 67	<i>Trypethelium sp.</i> (DQ782839)	Trypetheliales	359/430	83%	<i>Bathelium degenerans</i> (DQ328988)	Trypetheliales	637/676	94%
TSL 72	<i>Trypethelium sp.</i> (DQ782839)	Trypetheliales	253/285	88%	<i>Trypethelium papulosum</i> (GU327707)	Trypetheliales	621/637	97%
TSL 103	<i>Pyrgillus javanicus</i> (DQ826741)	Pyrenulales	232/270	85%	<i>Pyrenula cruenta</i> (AY584719)	Pyrenulales	587/631	93%
TSL 110	<i>Pseudorobillarda sojae</i> (FJ825371)	Pleosporales	183/198	92%	<i>Trypethelium subeluteriae</i> (DQ329009)	Trypetheliales	653/658	99%
TSL 107	<i>Pyrgillus javanicus</i> (DQ826741)	Pyrenulales	502/572	87%	<i>Pyrenula laevigata</i> (AY568029)	Pyrenulales	608/633	96%

4.7 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของราที่ก่อให้เกิดไลเคนสกุลทริพิทีเลียมโดยสร้างวงศวานวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree)

จากการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของราที่ก่อให้เกิดไลเคนที่ตำแหน่ง ITS mtSSU และ ITS ร่วมกับ mtSSU มาสร้างวงศวานวิวัฒนาการในแต่ละตำแหน่ง พบว่า วงศวานวิวัฒนาการที่ตำแหน่ง ITS แสดงดังภาพที่ 4.3 สามารถแบ่งความสัมพันธ์ออกเป็น 2 เคลดใหญ่ โดยมีค่า bootstrap สนับสนุน 100 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ clade I ประกอบไปด้วย lineage A และ B โดย lineage A แบ่งเป็น 4 กลุ่มย่อย ได้แก่ A1 A2 A3 และ A4 ซึ่งทุก lineage ใน clade I มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกัน โดยมีเพอริทีเซียสีดำ จำนวนผนังกันสปอร์ 3 ผนัง และเพอริทีเซียไม่ทำปฏิกิริยาเคมีกับสารละลาย 10% KOH ส่วน clade II ประกอบไปด้วย lineage C และ D โดย lineage C แบ่งเป็น 3 กลุ่มย่อย ได้แก่ C1 C2 และ C3 ในขณะที่ lineage D สามารถแบ่งได้เป็น 4 กลุ่มย่อย ได้แก่ D1 D2 D3 และ D4 โดยมีเฉพาะ lineage D2 D3 และ D4 เท่านั้น ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกัน โดยมีเพอริทีเซียสีเหลือง จำนวนผนังกันสปอร์มากกว่า 5 ผนัง และเพอริทีเซียทำปฏิกิริยาเคมีกับสารละลาย 10% KOH ส่วน lineage ที่เหลือ ได้แก่ D1 และ C ทั้งหมดมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่หลากหลายไม่สอดคล้องกับ lineage อื่นๆ โดยพบว่ามีเพอริทีเซียทั้งสีดำ ขาว และเหลือง จำนวนผนังกันสปอร์ตั้งแต่ 3 ผนังขึ้นไป มีเพอริทีเซียทั้งที่ทำและไม่ทำปฏิกิริยาเคมีกับสารละลาย 10% KOH ซึ่งลักษณะต่างๆ เหล่านี้กระจายตัวอยู่ใน lineage D1 และ C

จากผลการสร้างวงศวานวิวัฒนาการที่ตำแหน่ง mtSSU แสดงดังภาพที่ 4.4 พบว่า สามารถแบ่งความสัมพันธ์ออกเป็น 2 เคลดใหญ่ ได้แก่ clade I ประกอบไปด้วย lineage D และ E โดย lineage D แบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อย ได้แก่ D1 และ D2 ซึ่งทุก lineage ใน clade I มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกัน โดยมีเพอริทีเซียสีดำ จำนวนผนังกันสปอร์ 3 ผนัง และเพอริทีเซียไม่ทำปฏิกิริยาเคมีกับสารละลาย 10% KOH ส่วน clade II ประกอบไปด้วย lineage A B และ C โดย lineage C แบ่งเป็น 4 กลุ่มย่อย ได้แก่ C1 C2 C3 และ C4 โดยมีเฉพาะ lineage C เท่านั้น ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกัน โดยมีเพอริทีเซียสีเหลือง จำนวนผนังกันสปอร์มากกว่า 3 ผนัง และเพอริทีเซียทำปฏิกิริยาเคมีกับสารละลาย 10% KOH ส่วน lineage ที่เหลือ ได้แก่ lineage A และ B มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่หลากหลายไม่สอดคล้องกับ lineage อื่นๆ เช่นเดียวกับที่ปรากฏในวงศวานวิวัฒนาการที่สร้างจากตำแหน่ง ITS

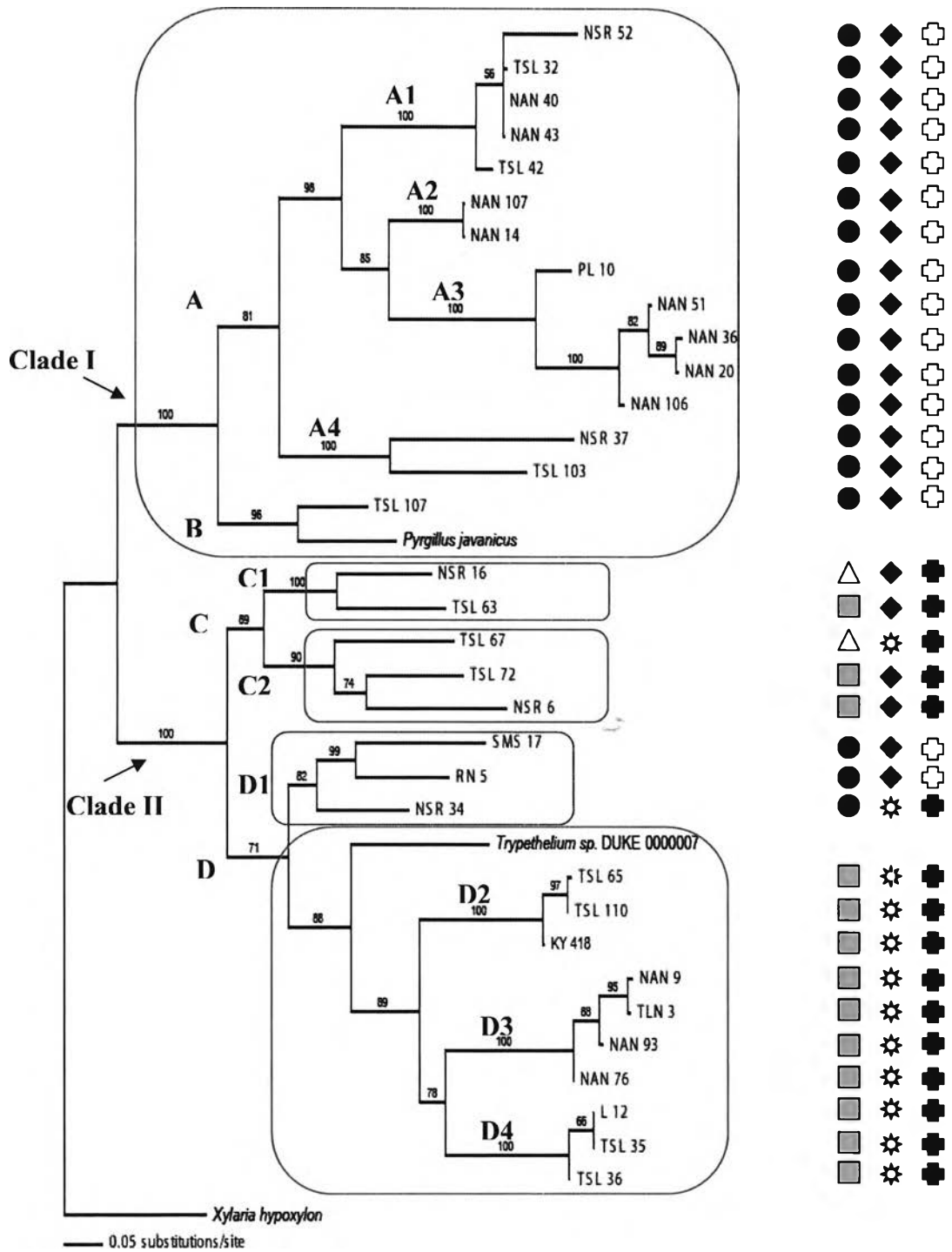
จากผลการสร้างวงศาวนวิวัฒนาการของราที่ก่อให้เกิดไลเคนสกุลทริพิทีเลียมของไทยที่ตำแหน่ง ITS ร่วมกับ mtSSU แสดงดังภาพที่ 4.5 พบว่า สามารถแบ่งความสัมพันธ์ออกเป็น 2 เคลดใหญ่ ได้แก่ clade I ประกอบไปด้วย lineage A และ B โดย lineage A แบ่งเป็น 3 กลุ่มย่อย ได้แก่ A1 A2 และ A3 ซึ่งใน lineage A มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่หลากหลาย โดยมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่หลากหลายไม่สอดคล้องกับ lineage อื่นๆ โดยพบว่ามีเพอริทีเซียทั้งสีขาว สีเหลือง และจำนวนผนังกันสปอร์ตั้งแต่ 3 ผนังขึ้นไป ซึ่งลักษณะต่างๆ เหล่านี้กระจายตัวอยู่ใน lineage A ส่วน clade II ประกอบไปด้วย lineage C และ D โดย lineage D แบ่งเป็น 4 กลุ่มย่อย ได้แก่ D1 D2 D3 และ D4 ซึ่งทุก lineage ใน clade I มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเหมือนกัน โดยมีเพอริทีเซียสีเหลือง จำนวนผนังกันสปอร์มากกว่า 3 ผนัง และเพอริทีเซียทำปฏิกิริยาเคมีกับสารละลาย 10% KOH ยกเว้น lineage D1 ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาอยู่ระหว่าง lineage C และ D โดยมีเพอริทีเซียสีขาว ผนังกันสปอร์ 3 ผนัง และเพอริทีเซียทำปฏิกิริยาเคมีกับสารละลาย 10% KOH ในขณะที่ lineage C มีเพอริทีเซียสีดำ ผนังกันสปอร์ 3 ผนัง และเพอริทีเซียไม่ทำปฏิกิริยาเคมีกับสารละลาย 10% KOH

จากผลการสร้างวงศาวนวิวัฒนาการทั้ง 2 ตำแหน่ง พบว่า มีความสอดคล้องกัน สามารถแบ่งได้เป็น 2 เคลดใหญ่ ประกอบได้ด้วย lineage ย่อย ซึ่งในแต่ละ lineage มีจำนวนและชนิดของไอโซเลตที่เป็นองค์ประกอบอยู่เหมือนกัน โดยพบว่า clade I เป็นเคลดของอันดับ Pyrenulales มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเหมือนกันจัดอยู่ในกลุ่มสัณฐานวิทยาที่ III โดยมีเพอริทีเซียสีดำ จำนวนผนังกันสปอร์ 3 ผนัง และเพอริทีเซียไม่ทำปฏิกิริยาเคมีกับสารละลาย 10% KOH และ clade II เป็นเคลดของอันดับ Trypetheliales มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่กระจายอยู่ในทุกกลุ่มสัณฐานวิทยา ส่วนใหญ่มักมีเพอริทีเซียที่ทำปฏิกิริยาเคมีกับสารละลาย 10% KOH ยกเว้น ไอโซเลต RN 5 และ SMS 17 ที่อยู่ในกลุ่ม III เพอริทีเซียไม่ทำปฏิกิริยาเคมีเช่นเดียวกับอันดับ Pyrenulales โดยพบว่ามี 3 lineage เท่านั้นที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเหมือนกัน จัดอยู่ในกลุ่มที่ VI โดยมีเพอริทีเซียสีเหลือง จำนวนผนังกันสปอร์มากกว่า 3 ผนัง และเพอริทีเซียทำปฏิกิริยาเคมีกับสารละลาย 10% KOH ในขณะที่ lineage ที่เหลือยังคงมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่มีความหลากหลาย โดยเป็นไอโซเลตชุดเดียวกันทั้งหมด ในทั้ง 2 วงศาวนวิวัฒนาการที่ตำแหน่ง ITS และ mtSSU

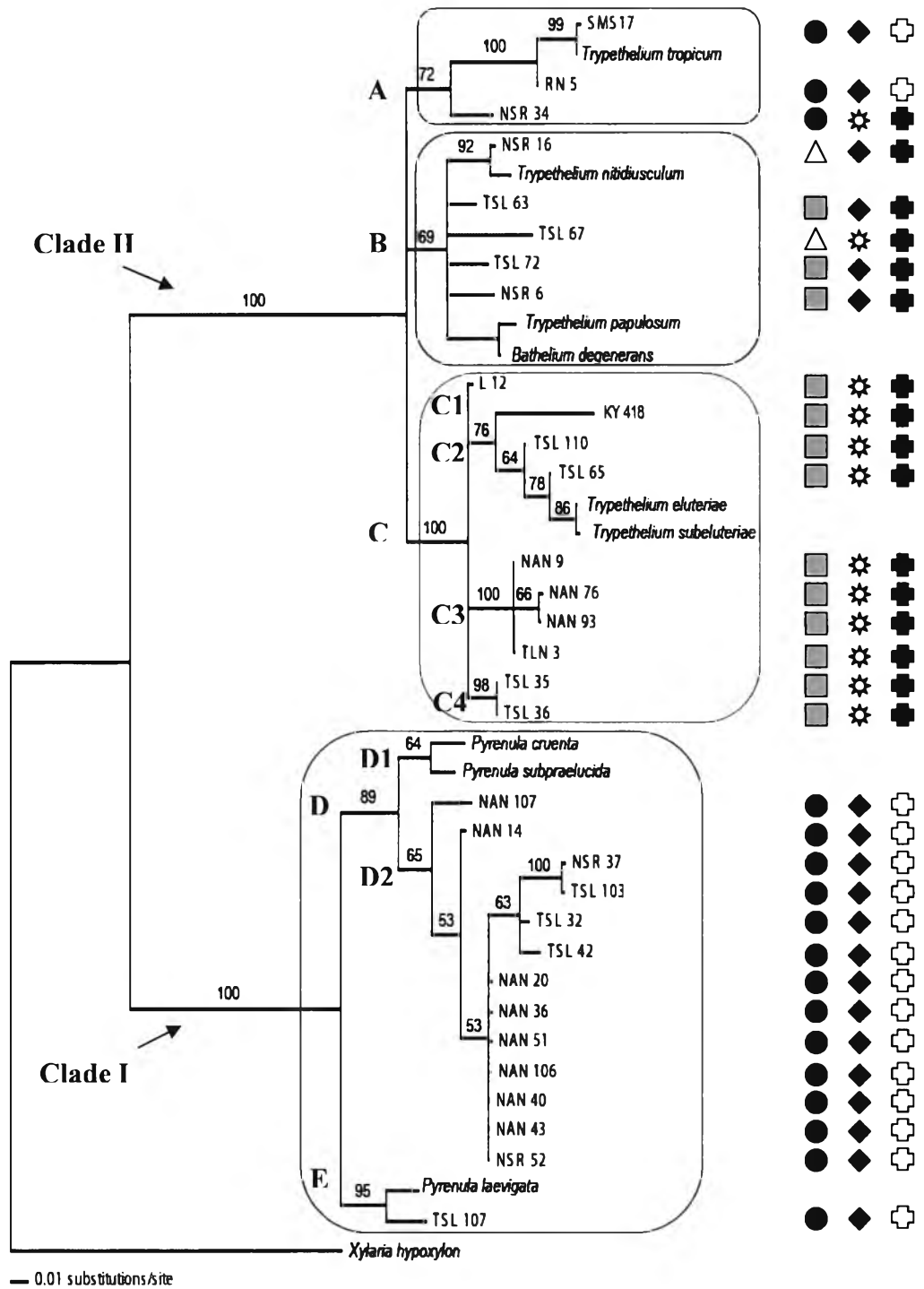
จากผลการสร้างวงศาวนวิวัฒนาการของราที่ก่อให้เกิดไลเคนเฉพาะสกุลทริพิทีเลียมจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง ITS ร่วมกับ mtSSU พบว่า สามารถแบ่งได้เป็น 2 เคลดใหญ่ ประกอบไปด้วย 9 ชนิด โดย lineage D2 D3 และ D4 มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกันจัดอยู่ในกลุ่มสัณฐานวิทยากลุ่มที่ VI ยกเว้น ไอโซเลต RN 5 และ SMS 17 ที่อยู่ใน lineage C มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาจัดอยู่ในกลุ่มที่ III ซึ่งมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเหมือนกันราที่ก่อให้เกิดไลเคน

ในอันดับ Pyrenulales ทั้งที่ลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างกันอย่างสิ้นเชิง โดยมีความสอดคล้องกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในอันดับ Trypetheliales มากกว่า ส่วนไอโซเลตที่เหลือมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ไม่สอดคล้องกัน โดยมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางลักษณะสลับกันกระจายอยู่ภายในวงศ์วานวิวัฒนาการ

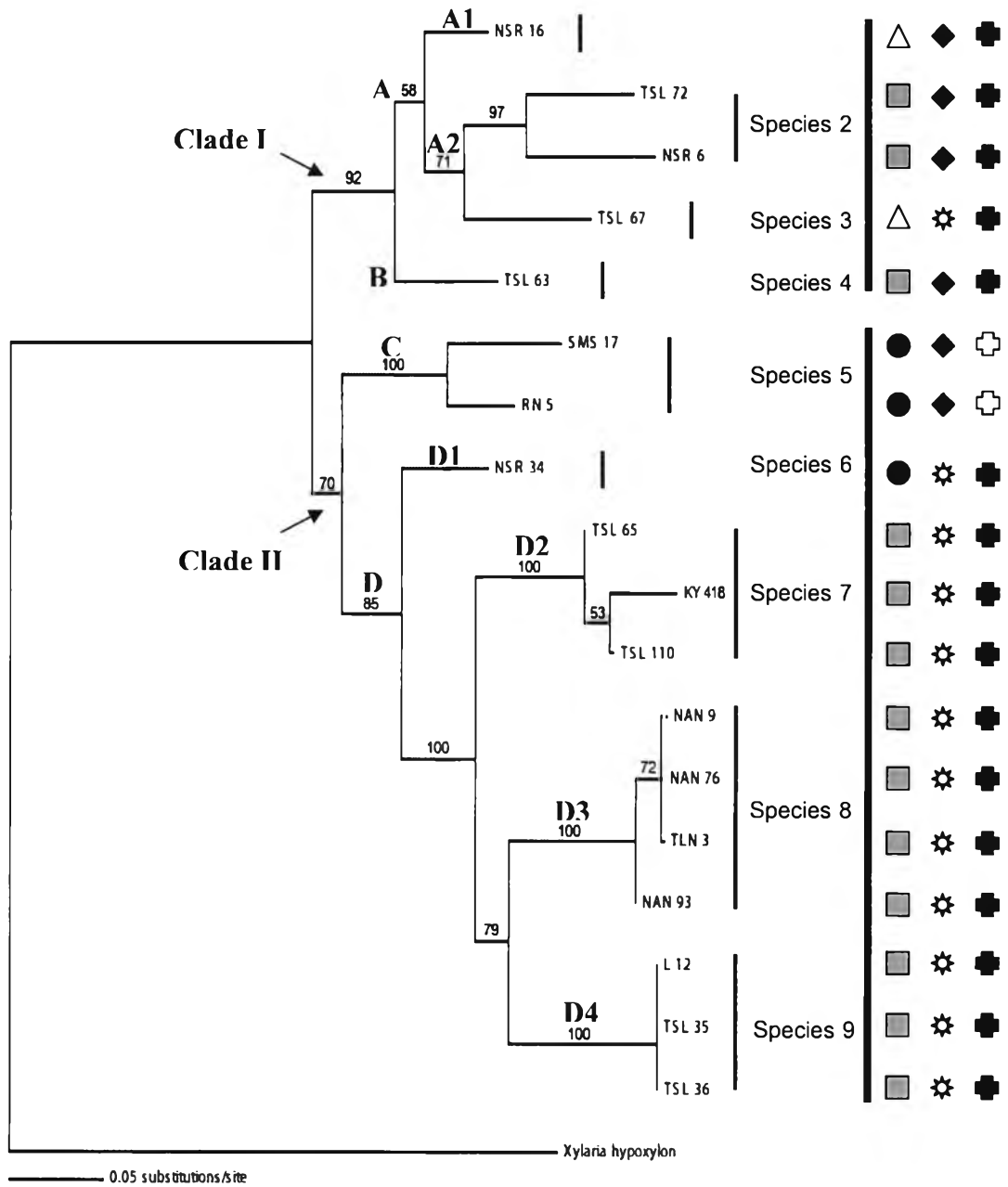
จากการนำข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง mtSSU ไปเปรียบเทียบความเหมือนกับฐานข้อมูลใน GeneBank ร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่ามี 3 ชนิดที่สามารถระบุชนิดที่แน่นอนได้ เนื่องจากมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สอดคล้องกัน ได้แก่ 1. *Trypethelium nitidiusculum* (NSR 16) 2. *Trypethelium tropicum* (RN 5 และ SMS 17) และ 3. *Trypethelium eluteriae* (ไอโซเลตที่อยู่ในกลุ่ม D2 D3 และ D4) (ภาคผนวก ง)



ภาพที่ 4.3 แสดงวงศานวิวัฒนาการของราที่ก่อให้เกิดไลเคนที่ตำแหน่ง ITS กับลักษณะทางสัณฐานวิทยาในแต่ละไฮโซเลต โดยกำหนดเครื่องหมาย ในแต่ละลักษณะดังต่อไปนี้ (●) เพอริทีเซียสีดำ (△) เพอริทีเซียสีขาว (■) เพอริทีเซียสีเหลือง (◆) ผนังกั้นสปอร์ 3 ผนัง (☆) ผนังกั้นสปอร์มากกว่า 3 ผนัง (⬛) เพอริทีเซียทำปฏิกิริยาเคมีกับสารละลาย 10% KOH และ (⬜) เพอริทีเซียไม่ทำปฏิกิริยาเคมีกับสารละลาย 10% KOH



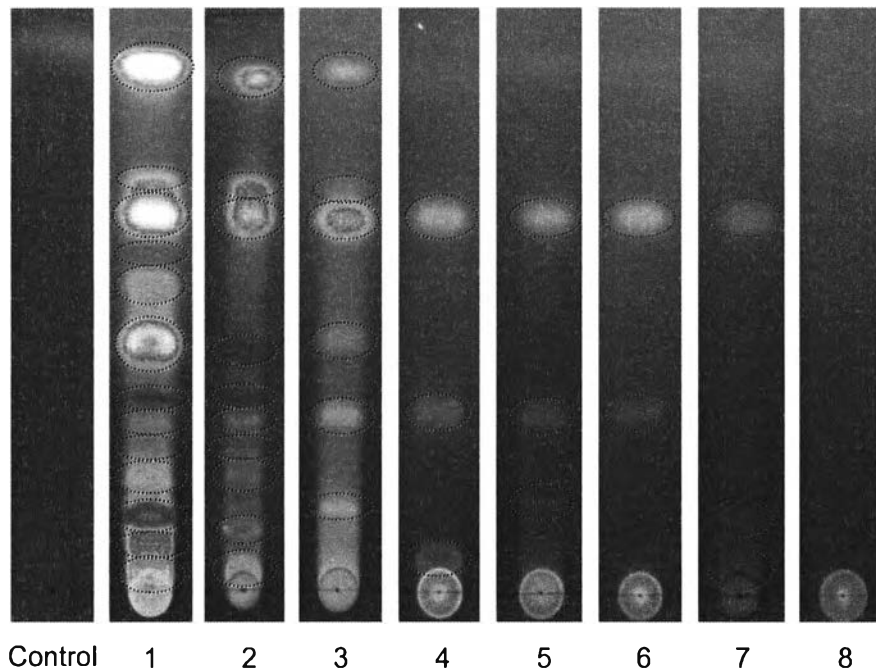
ภาพที่ 4.4 แสดงวงศาวรรณวิวัฒนาการของราที่ก่อให้เกิดไลเคนที่ตำแหน่ง mtSSU กับลักษณะทางสัณฐานวิทยาในแต่ละไอโซเลต โดยกำหนดเครื่องหมาย ในแต่ละลักษณะดังต่อไปนี้ (●) เพอริทีเซียสีดำ (△) เพอริทีเซียสีขาว (■) เพอริทีเซียสีเหลือง (◆) ผนังกั้นสปอร์ 3 ผนัง (⊛) ผนังกั้นสปอร์มากกว่า 3 ผนัง (⊞) เพอริทีเซียทำปฏิกิริยาเคมีกับสารละลาย 10% KOH และ (⊕) เพอริทีเซียไม่ทำปฏิกิริยาเคมีกับสารละลาย 10% KOH



ภาพที่ 4.5 แสดงวงศานวิวัฒนาการของราที่ก่อให้เกิดไลเคนสกุลทริพิทีเลียมของไทยที่ตำแหน่ง ITS ร่วมกับ mtSSU กับลักษณะทางสัณฐานวิทยาในแต่ละไอโซเลต โดยกำหนดเครื่องหมาย ในแต่ละลักษณะดังต่อไปนี้ (●) เพอริทีเซียสีดำ (△) เพอริทีเซียสีขาว (■) เพอริทีเซียสีเหลือง (◆) ผนังกั้นสปอร์ 3 ชั้น (☆) ผนังกั้นสปอร์มากกว่า 3 ชั้น (⊕) เพอริทีเซียทำปฏิกิริยาเคมีกับสารละลาย 10% KOH และ (⊖) เพอริทีเซียไม่ทำปฏิกิริยาเคมีกับสารละลาย 10% KOH

4.8 ผลการศึกษาการสร้างสารทุติยภูมิของราที่ก่อให้เกิดไลเคนสกุลทริพิทิลิเยียม

จากการนำสารสกัดจากตัวแทนกลุ่มของราที่ก่อให้เกิดไลเคนที่ได้จากการจัดกลุ่มโดยใช้แบบแผนของ ITS-RFLP กลุ่มละ 1 ไอโซเลต จำนวน 22 ตัวอย่าง มาตรวจสอบตำแหน่งสารที่แยกองค์ประกอบบนแผ่น TLC พบว่ารูปแบบของสารสกัดที่แยกองค์ประกอบได้มีตำแหน่งค่า Rf อยู่ในช่วงระหว่าง 0.00-0.87 โดยสามารถจัดกลุ่มรูปแบบค่า Rf ที่ปรากฏได้ทั้งหมด 8 กลุ่ม ส่วนใหญ่มีตำแหน่งค่า Rf เท่ากับ 0.06, 0.31, 0.63 จำนวน 11 ตัวอย่าง ซึ่งตำแหน่งค่า Rf เท่ากับ 0.63 เป็นตำแหน่งที่ปรากฏมากที่สุด ในขณะที่ 2 ตัวอย่าง ได้แก่ NSR 34 และ TSL 63 ไม่ปรากฏตำแหน่งการแยกองค์ประกอบของสาร โดยรูปแบบของแถบสารสกัดและตำแหน่งค่า Rf ที่แตกต่างกันของแต่ละกลุ่ม แสดงดังภาพที่ 4.6 และ ตารางที่ 4.5



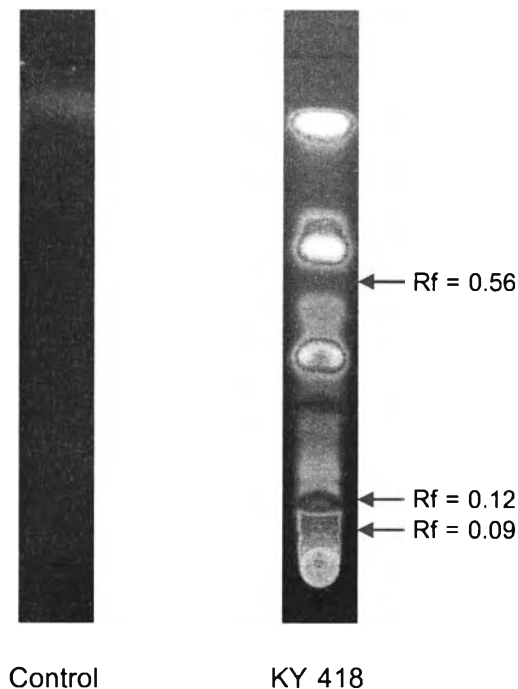
ภาพที่ 4.6 แสดงรูปแบบของแถบสารสกัดของราที่ก่อให้เกิดไลเคนบนแผ่น TLC โดยใช้ตัวละลายผสมระหว่างไดคลอโรมีเทนและเมทานอลในอัตราส่วน 10 : 0.2 จำนวน 8 กลุ่มรูปแบบ และ control คือ แผ่น TLC ที่หยดเฉพาะตัวทำละลายเมทานอล

ตารางที่ 4.5 แสดงรูปแบบตำแหน่งค่า Rf ของแถบสารสกัดจากตัวแทนกลุ่มของราที่ก่อให้เกิดไลเคนบนแผ่น TLC

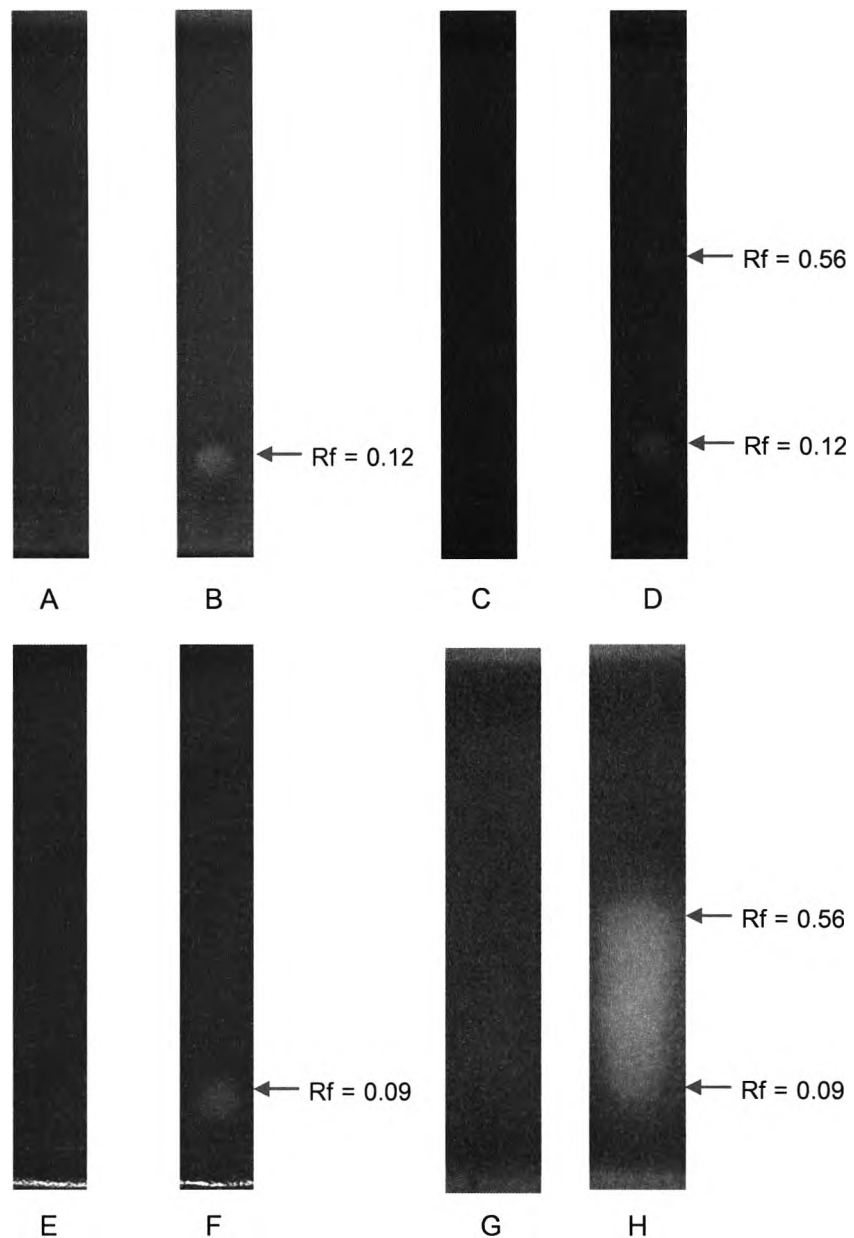
กลุ่ม	ตำแหน่งค่า Rf																		ไอโซเลต
1	0.03		0.09		0.12				0.19	0.25	0.31	0.32	0.42	0.51	0.56	0.63	0.66	0.87	KY 418
2	0.03			0.10					0.19	0.25	0.31	0.32	0.42			0.63	0.66	0.87	NAN 76
3							0.14				0.31		0.42			0.63	0.66	0.87	TSL 35
4		0.06									0.31					0.63			NAN 20, 106; NSR 52; PL 10; RN 5; SMS 17; TSL 32, 67, 72, 103, 107
5								0.15			0.31					0.63			NAN 93
6											0.31					0.63			NAN 107, NSR 6, NSR 16, NSR 37
7	0.03					0.13										0.63			KRB 5
8	ไม่สามารถแยกองค์ประกอบทางเคมี																		NSR 34, TSL 63

4.9 การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของสารสกัดที่แยกได้บนแผ่น TLC โดยวิธีไบโอออโตกราฟี (Bioautography)

จากการนำตัวอย่างราที่ก่อให้เกิดไลเคนที่เป็นตัวแทนในแต่ละจีโนไทป์ จำนวน 22 ตัวอย่าง มาทำการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบกับสารสกัดที่ได้ทำการแยกองค์ประกอบบนแผ่น TLC ด้วยระบบตัวทำละลายผสมระหว่างไดคลอโรมีเทนและเมทานอลในอัตราส่วน 10 : 0.2 นำไปส่องภายใต้รังสีอัลตราไวโอเล็ตที่มีความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร หลังจากนั้นนำแผ่น TLC ไปทดสอบหาดำแหน่งของสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ 4 ชนิด โดยวิธีไบโอออโตกราฟี พบว่า สารสกัดจากราที่ก่อให้เกิดไลเคนไอโซเลต KY 418 เท่านั้นที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 4 ชนิด ซึ่งปรากฏแถบของสารแยกออกมาจำนวน 13 ตำแหน่ง โดยมีค่า Rf เท่ากับ 0.04 0.09 0.12 0.19 0.25 0.29 0.31 0.42 0.51 0.56 0.63 0.66 และ 0.87 ซึ่งพบว่าแถบของสารที่ตำแหน่ง Rf เท่ากับ 0.09 ออกฤทธิ์ยับยั้งยีสต์ (*Candida albicans*) และแถบของสารที่ตำแหน่ง Rf เท่ากับ 0.12 ออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย (*Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli*) ในขณะที่แถบของสารที่ตำแหน่ง Rf เท่ากับ 0.56 ออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย (*E. coli*) เท่านั้น ส่วนในกรณีของราเส้นใย *Aspergillus niger* นั้น พบว่า ออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างสปอร์ในช่วงแถบของสารที่ตำแหน่ง Rf เท่ากับ 0.09 - 0.56 ดังแสดงในภาพที่ 4.7 และ 4.8



ภาพที่ 4.7 แสดงรูปแบบของแถบสารสกัดของราที่ก่อให้เกิดไลเคนไอโซเลต KY 418 บนแผ่น TLC



ภาพที่ 4.8 แสดงการแยกและทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากไอโซเลต KY 418

- (A) ผลควบคุมลบ *Staphylococcus aureus* (B) การยับยั้ง *Staphylococcus aureus* ณ Rf ที่ 0.12
- (C) ผลควบคุมลบ *Escherichia coli* (D) การยับยั้ง *Escherichia coli* ณ Rf ที่ 0.12 และ 0.56
- (E) ผลควบคุมลบ *Candida albicans* (F) การยับยั้ง *Candida albicans* ณ Rf ที่ 0.09
- (G) ผลควบคุมลบ *Aspergillus niger* (H) การยับยั้ง *Aspergillus niger* ณ Rf ระหว่าง 0.09 - 0.56

[เครื่องหมายลูกศรชี้ (←) คือ จุดที่เกิดบริเวณยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ]