



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “การวิจัยสารต้านมะเร็งจากแร่ธาตุอินทรีย์ในพืชสมุนไพรไทย”

โดย รองศาสตราจารย์ ดร. นงลักษณ์ ศรีอุบลมาศ และคณะ

มีนาคม 2550

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “การวิจัยสารต้านมะเร็งจากราเอ็นโคไฟท์ในพืชสมุนไพรไทย”

คณะผู้วิจัย

1. รองศาสตราจารย์ ดร. นงลักษณ์ ศรีอุบลมาศ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ไวยครุฑธา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
3. ดร. ประสาท กิตตะคุปต์ สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์
4. รองศาสตราจารย์ ดร. ชุติมา ลิ้มมัทวาทิธี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณฝ่ายวิชาการ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ที่ได้อนุมัติงบประมาณสนับสนุนการศึกษานี้ และขอขอบคุณสถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร และภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการศึกษาวิจัย

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวิจัยสารต้านมะเร็งจากราเอนโดไฟท์ในพืชสมุนไพรไทย ได้คัดเลือกราเอนโดไฟท์ทั้งหมด 7 isolates มาเพาะเลี้ยงในปริมาณมากเพื่อแยกสารบริสุทธิ์ การคัดเลือกพิจารณาจากข้อมูลฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งและจากการวิเคราะห์สารสกัดหยาบด้วย proton NMR ราเหล่านี้ได้แก่ Lrub 20 จากกะตังใบดอกแดง, *Phomopsis* sp. Usia 5 จากเสน, *Phomopsis* sp. Mfer 5 จากบุนนาค, *Bipolaris* sp. Ctom 12 จากเค็ด, *Phomopsis* sp. Hant 25 จากกระเบาใหญ่, Atag 5 จากกระเช้าฝีมด และ Gspe 11 จากพุทธรักษา พบว่าราเอนโดไฟท์ Lrub 20 เป็นราใน class Dothideomycetes et Chaetothyriomycetes incertae sedis, subphylum Pezizomycotina, phylum Ascomycota รานี้สร้างสาร asterric acid ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค (MIC 200 $\mu\text{g/ml}$) และสารที่เคยมีรายงานว่าได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี แต่ไม่เคยมีรายงานว่าเป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ 2 ชนิด คือ 2-hydroxymethyl-3-methyl-cyclopent-2-enone มีฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค (MIC 200 $\mu\text{g/ml}$) และ 2-hydroxymethyl-3-methyl-cyclopentanone พบว่าราเอนโดไฟท์หลายชนิดสร้างสาร 3-nitropropionic acid ซึ่งพบว่ามีฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรคดีมาก (MIC 0.39 $\mu\text{g/ml}$) และมีรายงานว่าเป็น neurotoxin ราเหล่านี้ได้แก่ *Phomopsis* sp. Usia 5, *Phomopsis* sp. Mfer 5, *Phomopsis* sp. Grsp 19 จาก *Grewia* sp., *Phomopsis* sp. Rlyi 1 จากกุหลาบขาว, *Fusarium* sp. Tasp 15 จากไซหิน, *Fusicoccum* sp. Gell 14 จากทองแมว และ *Diaporthe* sp. Grsp 11 จาก *Grewia* sp. พบว่า *Bipolaris* sp. Ctom 12 สร้างสาร radicinol และ radicinin ซึ่งมีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งหลายชนิด พบว่า *Phomopsis* sp. Hant 25 สร้างสาร mycoepoxydiene ซึ่งแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งหลายชนิด สาร 5-Hydroxy-6-(8-methyl-9-oxa-bicyclo[4.2.1]nona-2,4-dien-7-yl)-5,6-dihydro-pyran-2-one ซึ่งเป็นสารที่เคยมีรายงานว่าได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี แต่ไม่เคยมีรายงานว่าเป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ และสารที่เป็นอนุพันธ์ของ mycoepoxydiene ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน พบว่าราเอนโดไฟท์ Atag 5 เป็นราที่ไม่สร้างสปอร์ และจัดอยู่ในวงศ์ Xylariaceae, order Xylariales, class Sordariomycetes, subphylum Pezizomycotina ราชนิดนี้สร้างสารหลายชนิด เช่น สารในกลุ่ม quinones ซึ่งแสดงความเป็นพิษต่อ KB cell (IC_{50} 11.14 $\mu\text{g/ml}$) สารในกลุ่ม lactones สารในกลุ่ม cytochalasins ซึ่งแสดงความเป็นพิษต่อ KB cell (IC_{50} 0.13 $\mu\text{g/ml}$) สารที่เป็นอนุพันธ์ของ rhizoctonic acid และ สารบริสุทธิ์อีก 3 ชนิด ซึ่งจะต้องทำการศึกษาต่อเพื่อยืนยันสูตรโครงสร้างที่แน่นอน พบว่าราเอนโดไฟท์ Gspe 11 เป็นราที่ไม่สร้างสปอร์เช่นกัน และจัดอยู่ในวงศ์ Diatrypaceae, order Xylariales สารสกัดหยาบที่ได้จากน้ำหมักเชื้อแสดงความเป็นพิษต่อ KB cell (IC_{50} 1.8 $\mu\text{g/ml}$), BC cell (IC_{50} 1.4 $\mu\text{g/ml}$), NCI-H187 cell (IC_{50} 4.48 $\mu\text{g/ml}$) และ Vero cell (IC_{50} 3.7 $\mu\text{g/ml}$) เมื่อนำมาแยกให้บริสุทธิ์ ปรากฏว่าแยกได้สารบริสุทธิ์ 3 ชนิด ซึ่งอยู่ในระหว่างการศึกษาสถรโครงสร้าง

Abstract

This study aims to search for anticancer compounds from endophytic fungi isolated from Thai medicinal plants. A total of 7 endophytic fungus isolates were selected, based on anticancer activities and proton NMR analysis of crude extracts, for cultivation in large volume to isolate pure compounds. They were Lrub 20 (from *Leea rubra* Blume ex Spreng.), *Phomopsis* sp. Usia 5 (from *Urobotrya siamensis* Hiepko), *Phomopsis* sp. Mfer 5 (from *Mesua ferrea* Linn.), *Biporalis* sp. Ctom 12 [from *Catunaregam tomentosa* (Bl. Ex DC.) Tirveng], *Phomopsis* sp. Hant 25 (from *Hydnocarpus anthelminthicus* Pierre), Atag 5 (from *Aristolochia tagala* Cham.) and Gspe 11 (from *Gardenia* sp.). Isolate Lrub20 was classified in class Dothideomycetes et Chaetothyriomycetes incertae sedis, subphylum Pezizomycotina, phylum Ascomycota. It produced asterric acid which showed antimycobacterial activity with MIC of 200 $\mu\text{g/ml}$ and two chemically synthetic compounds, 2-hydroxymethyl-3-methyl-cyclopent-2-enone with antimycobacterial activity (MIC 200 $\mu\text{g/ml}$) and 2-hydroxymethyl-3-methyl-cyclopentanone, which were new natural products. Several endophytic fungus isolates were found to produce 3-nitropropionic acid, the neurotoxic compound, which exhibited strong antimycobacterial activity with MIC of 0.39 $\mu\text{g/ml}$. They were *Phomopsis* sp. Usia 5, *Phomopsis* sp. Mfer 5, *Phomopsis* sp. Grsp 19 from *Grewia* sp., *Phomopsis* sp. Rlyi 1 from *Rhododendron lyi* Levl., *Fusarium* sp. Tasp 15 from *Tadehagi* sp., *Fusicoccum* sp. Gell 14 from *Gmelina elliptica* Sm. and *Diaporthe* sp. Grsp 11 from *Grewia* sp.. Radicinol and radicinin, which showed cytotoxic activity against several cell lines, could be isolated from *Bipolaris* sp. Ctom12. Mycoepoxydiene, a new mycoepoxydiene derivative and a chemically synthetic compound but being new natural product, 5-hydroxy-6-(8-methyl-9-oxa-bicyclo[4.2.1]nona-2,4-dien-7-yl)-5,6-dihydro-pyran-2-one, could be isolated from *Phomopsis* sp. Hant 25. It was found that mycoepoxydiene showed cytotoxic activity against several cell lines. Endophytic fungus isolate Atag 5 could be classified as mycelia sterilia in family Xylariaceae, order Xylariales, class Sordariomycetes, subphylum Pezizomycotina. This isolate produced a quinine compound with activity against KB cell (IC_{50} 11.14 $\mu\text{g/ml}$), a lactone compound, cytochalasin with activity against KB cell (IC_{50} 0.13 $\mu\text{g/ml}$), rhizoctonic acid derivative and 3 pure compounds. These compounds have been under investigation to confirm the chemical structures. Gspe 11, another mycelia sterilia, was classified in family Diatrypaceae, order Xylariales. Crude extract from Gspe 11 culture broth showed activities against KB cell (IC_{50} 1.8 $\mu\text{g/ml}$), BC cell (IC_{50} 1.4 $\mu\text{g/ml}$), NCI-H187 cell (IC_{50} 4.48 $\mu\text{g/ml}$) and Vero cell (IC_{50}

3.7 $\mu\text{g/ml}$). The chemical structures of three pure compounds, isolated from the crude extract, have been under investigation.

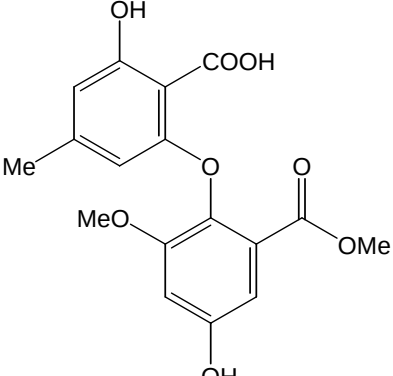
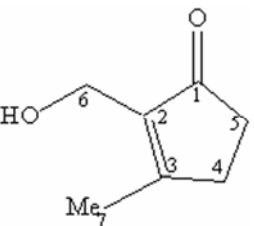
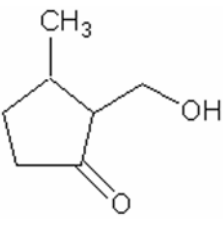
Executive Summary

ในปัจจุบัน โรคมะเร็งยังเป็นปัญหาสำคัญในวงการแพทย์ทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทยและเป็นสาเหตุการตายอันดับต้น ๆ ปัจจัยหนึ่งที่ทำให้โรคมะเร็งมีอัตราการตายสูงเช่นนี้เนื่องจากยาที่ใช้รักษาโรคมะเร็งมี therapeutic indices แคบ และมีความเป็นพิษสูง ในการรักษาโรคมะเร็งต้องให้ยาร่วมกันหลายชนิดเนื่องจาก heterogeneity ของเซลล์มะเร็งและการดื้อยาของเซลล์มะเร็ง ดังนั้นการค้นคว้าหาสารใหม่ที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งจึงเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับวงการแพทย์และสาธารณสุขไทย รวมทั้งประเทศต่าง ๆ ทั่วโลก

เป็นที่ทราบกันดีว่า ราเป็นจุลินทรีย์แหล่งสำคัญที่สร้างสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพซึ่งถูกนำมาใช้เป็นยารักษาโรค ราเอนโดไฟท์เป็นราประเภทหนึ่งซึ่งเจริญอยู่ในเนื้อเยื่อพืชที่มีชีวิตโดยไม่ก่อให้เกิดโรคและเป็นที่รู้จักกันมานาน แต่เพิ่งได้รับการศึกษาอย่างจริงจังในระยะ 30 ปีมานี้ พบว่าราเอนโดไฟท์ก็เป็นแหล่งสำคัญของสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพ รวมทั้งสารที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง เช่น ในปี พ.ศ. 2538 มีรายงานว่า ราเอนโดไฟท์ *Taxomyces andreanae* ซึ่งแยกจากเปลือกของต้น Pacific yew (*Taxus brevifolia*) ก็สร้างยาต้านมะเร็ง paclitaxel (Taxol®) เช่นเดียวกับที่แยกได้จาก inner bark ของต้น Pacific yew สำหรับประเทศไทยซึ่งมีความหลากหลายทางชีวภาพมาก ในปี พ.ศ. 2544 ศาสตราจารย์ ดร. วิทยา มีวุฒิสม และคณะ ได้แยกราเอนโดไฟท์จากพืชสมุนไพรไทยและนำมาตรวจสอบหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ พบราเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจำนวนมาก ในจำนวนนี้เป็นราเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์ยับยั้ง KB cell line ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งช่องปาก 70 isolates (16.87 %) โดย 35 isolates มีค่า IC_{50} น้อยกว่า 5 $\mu\text{g/ml}$ และ 57 isolates (13.73 %) มีฤทธิ์ยับยั้ง BC cell line ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งทรวงอก โดย 8 isolates มีค่า IC_{50} น้อยกว่า 5 $\mu\text{g/ml}$

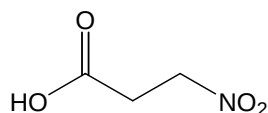
จากข้อมูลข้างต้นจะเห็นได้ว่าราเอนโดไฟท์จากพืชสมุนไพรเป็นแหล่งที่น่าสนใจต่อการศึกษาค้นคว้าหาสารที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง โครงการนี้จึงมีวัตถุประสงค์วิจัยสารต้านมะเร็งจากราเอนโดไฟท์ในพืชสมุนไพรไทย ได้คัดเลือกราเอนโดไฟท์จากข้อมูลฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งของราเอนโดไฟท์ที่ศึกษาในโครงการก่อนหน้านี้ รวมทั้งราเอนโดไฟท์ที่ได้แยกใหม่ มาเพาะเลี้ยง 23 isolates เพื่อเตรียมสารสกัดหยาบและนำมาศึกษา proton NMR พบว่ามีราเอนโดไฟท์ที่น่าสนใจนำมาเพาะเลี้ยงเพื่อแยกสารบริสุทธิ์ทั้งหมด 7 isolates ได้แก่

Lrub 20 เป็นราที่แยกได้จากกระดังงาใบดกแดง (*Leea rubra* Blume ex Spreng.) และจากการจัดจำแนกเชื้อโดยอาศัย microscopic morphology และข้อมูลลำดับเบสของ 18S RNA gene และส่วน ITS ของ rRNA gene พบว่าเป็น mitosporic fungus ใน class Dothideomycetes et Chaetothyriomycetes incertae sedis, subphylum Pezizomycotina, phylum Ascomycota ในการศึกษาสามารถแยกสารบริสุทธิ์จากน้ำหมักเชื้อได้ 3 ชนิด ดังนี้

		
asteric acid	2-hydroxymethyl-3-methyl-cyclopent-2-enone*	2-hydroxymethyl-3-methyl-cyclopentanone*
ฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค (MIC 200 $\mu\text{g/ml}$)	ฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค (MIC 200 $\mu\text{g/ml}$)	

* สารที่เคยมีรายงานว่าได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี แต่ไม่เคยมีรายงานว่าเป็ผลึกภัณฑ์ธรรมชาติ

Phomopsis sp. Usia 5 แยกได้จากเสน (*Urobotrya siamensis* Hiepko) และ *Phomopsis* sp. Mfer 5 แยกได้จากบุนนาค *Mesua ferrea* Linn. สร้างสาร 3-nitropropionic acid (3-NPA) ซึ่งเคยมีรายงานว่าเป็ neurotoxin พบว่า สารนี้มีฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรคดีมาก (MIC 0.39 $\mu\text{g/ml}$)

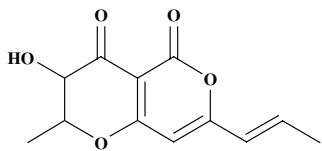
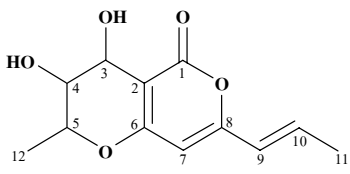


3-nitropropionic acid

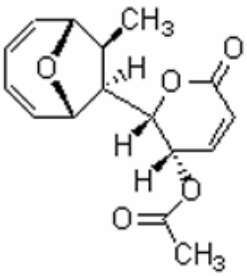
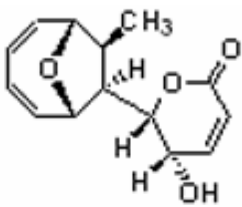
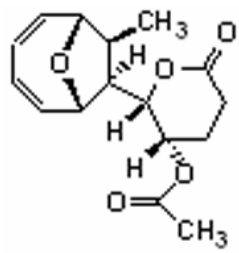
นอกจากนี้ ยังพบว่า *Phomopsis* sp. Grsp 19 จาก *Grewia* sp., *Phomopsis* sp. Rlyi 1 จากกุหลาบขาว, *Fusarium* sp. Tasp 15 จากไผ่หิน, *Fusicoccum* sp. Gell 14 จากทองแมว และ *Diaporthe* sp. Grsp 11 จาก *Grewia* sp. ก็สร้างสาร 3-nitropropionic acid เช่นกัน ผลที่ได้นี้แสดงให้เห็นว่า 3-NPA เป็สารพิษที่พบได้ทั่วไปในราหลายชนิด

Biporalis sp. Ctom 12 เป็ราที่แยกได้จากเห็ด [*Catunaregam tomentosa* (Bl. Ex DC.) Tirveng] ราชนิดนี้สร้างสาร radicinin และ radicinol พบว่า radicinin มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งหลายชนิดได้ดี ได้แก่ Hucca-1 (เซลล์มะเร็งท่อน้ำดี, IC_{50} 2.0 $\mu\text{g/ml}$), KB (เซลล์มะเร็งเยื่อช่องปาก, IC_{50} 0.5 $\mu\text{g/ml}$), HeLa (เซลล์มะเร็งปากมดลูก, IC_{50} 1.2 $\mu\text{g/ml}$), MDA-MB231 [เซลล์มะเร็งเต้านม (hormone-independent), IC_{50} 0.2 $\mu\text{g/ml}$], T47D [เซลล์มะเร็งเต้านม (hormone-dependent), IC_{50} 0.3 $\mu\text{g/ml}$], H69AR [เซลล์มะเร็งปอด (multidrug resistance), IC_{50} 2.8 $\mu\text{g/ml}$], HL-60

(Human promyelocytic leukemia cell, IC_{50} 1.3 $\mu\text{g/ml}$), และ P388 (Mouse lymphoid neoplasm, IC_{50} 0.97 $\mu\text{g/ml}$) และมีฤทธิ์ต้านต่อ *Plasmodium falciparum* (94) คือมี IC_{50} $10^{-6} - 10^{-5}$ M

	
radicinin	radicinol

Phomopsis sp. Hant 25 เป็นราที่แยกได้จากกระเบาใหญ่ (*Hydnocarpus anthelminthicus* Pierre) ราชนิดนี้สร้างสาร 3 ชนิด ดังนี้

		
mycoepoxydiene	5-Hydroxy-6-(8-methyl-9-oxa-bicyclo[4.2.1]nona-2,4-dien-7-yl)-5,6-dihydro-pyran-2-one*	Mycoepoxydiene derivative**

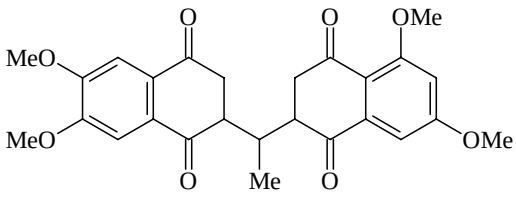
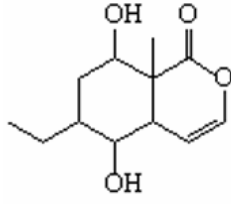
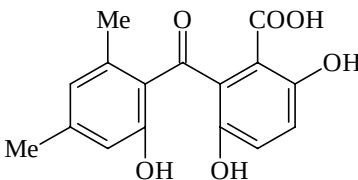
* เคยมีรายงานว่าได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี แต่ไม่เคยมีรายงานว่าเป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ

** ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน

พบว่า mycoepoxydiene ซึ่งแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งหลายชนิดได้ดี ได้แก่ Hucca-1 (เซลล์มะเร็งท่อน้ำดี, IC_{50} 0.3 $\mu\text{g/ml}$), KB (เซลล์มะเร็งเยื่อบุช่องปาก, IC_{50} 2.4 $\mu\text{g/ml}$), HeLa (เซลล์มะเร็งปากมดลูก, IC_{50} 2.1 $\mu\text{g/ml}$), MDA-MB231 [เซลล์มะเร็งเต้านม (hormone-independent), IC_{50} 1.3 $\mu\text{g/ml}$], T47D [เซลล์มะเร็งเต้านม (hormone-dependent), IC_{50} 2.0 $\mu\text{g/ml}$], H69AR [เซลล์มะเร็งปอด (multidrug resistance), IC_{50} 1.6 $\mu\text{g/ml}$] และแสดงความเป็นพิษต่อ Vero cell (IC_{50} 4.36 $\mu\text{g/ml}$) นอกจากนี้ ยังมีฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค (MIC 50 $\mu\text{g/ml}$)

Atag 5 เป็นราที่แยกได้จากกระเช้าฝีมด (*Aristolochia tagala* Cham..) ราชนิดนี้เป็น mycelia sterilia คือไม่สร้างสปอร์ และจากการจัดจำแนกเชื้อโดยอาศัยข้อมูลลำดับเบสของส่วน ITS ของ

rRNA gene พบว่าเป็นราในวงศ์ Xylariaceae, order Xylariales, class Sordariomycetes, subphylum Pezizomycotina ราชินีนี้สร้างสารหลายชนิด ได้แก่ ATAG5-008 ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม quinones และแสดงความเป็นพิษต่อ KB cell (IC_{50} 11.14 $\mu\text{g/ml}$), ATAG5-085 ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม lactones, ATAG5-018 ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม cytochalasins และแสดงความเป็นพิษต่อ KB cell (IC_{50} 0.13 $\mu\text{g/ml}$), ATAG5-083 ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ rhizoctonic acid, ATAG5-110, ATAG5-100 และ ATAG5-092 ซึ่งจะต้องทำการศึกษาคู่เพื่อยืนยันสูตร โครงสร้างที่แน่นอน

	
โครงสร้างทางเคมีที่คาดของ ATAG5-008	โครงสร้างทางเคมีที่คาดของ ATAG5-085
	
โครงสร้างทางเคมีที่คาดของ ATAG5-083	

Gspe 11 เป็นราที่แยกได้จากพุดรดนา (*Gardenia* sp.) ราชินีนี้เป็น mycelia sterilia คือไม่สร้างสปอร์ และจากการจัดจำแนกเชื้อโดยอาศัยข้อมูลลำดับเบสของส่วน ITS ของ rRNA gene พบว่าเป็นราในวงศ์ Diatrypaceae, order Xylariales สารสกัดหยาบที่ได้จากน้ำหมักเชื้อแสดงความเป็นพิษต่อ KB cell (IC_{50} 1.8 $\mu\text{g/ml}$), BC cell (IC_{50} 1.4 $\mu\text{g/ml}$), NCI-H187 cell (IC_{50} 4.48 $\mu\text{g/ml}$) และ Vero cell (IC_{50} 3.7 $\mu\text{g/ml}$) เมื่อนำมาแยกให้บริสุทธิ์ ปรากฏว่าแยกได้สารบริสุทธิ์ 3 ชนิด ซึ่งอยู่ในระหว่างการศึกษาคู่โครงสร้าง

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อ	ii
Abstract	iii
Executive summary	v
เนื้อหางานวิจัย	
สารบัญตาราง	xi
สารบัญรูป	xii
บทนำ	1
การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
วัสดุและวิธีดำเนินการวิจัย	7
วัสดุ	7
วิธีดำเนินการวิจัย	8
1. การแยกกราเอนโดไฟฟ้าจากพืชสมุนไพร	8
2. การเก็บรักษากราเอนโดไฟฟ้า	8
3. การเพาะเลี้ยงกราเอนโดไฟฟ้าเพื่อนำมาสกัดเพื่อตรวจสอบเบื้องต้นด้วย proton NMR	9
4. การเพาะเลี้ยงกราเอนโดไฟฟ้าที่คัดเลือกในปริมาณมากสำหรับการแยก สารบริสุทธิ์	9
5. การแยกให้ได้สารบริสุทธิ์	9
6. การพิสูจน์สูตร โครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์	9
7. การจัดจำแนกราเอนโดไฟฟ้า	9
ผลการศึกษาวิจัยและการอภิปรายผล	11
การคัดเลือกราเอนโดไฟฟ้าซึ่งสร้างสารที่น่าสนใจ	11
การแยกสารบริสุทธิ์จากราเอนโดไฟฟ้า Lrub 20 และ การจัดจำแนกรา	11
การแยกสารบริสุทธิ์จากราเอนโดไฟฟ้า Usia 5 และ การจัดจำแนกรา	17
การแยกสารบริสุทธิ์จากราเอนโดไฟฟ้า Mfer5 และ การจัดจำแนกรา	20
การแยกสารบริสุทธิ์จากราเอนโดไฟฟ้า Ctom 12 และ การจัดจำแนกรา	22
การแยกสารบริสุทธิ์จากราเอนโดไฟฟ้า Hant 25 และ การจัดจำแนกรา	24
การแยกสารบริสุทธิ์จากราเอนโดไฟฟ้า Atag 5 และ การจัดจำแนกรา	28

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
การแยกสารบริสุทธิ์จากราเอนโดไฟท์ Gspe 11 และ การจัดจำแนกรา	31
ข้อสรุปของการศึกษาวิจัย	32
เอกสารอ้างอิง	34
ภาคผนวก	38
อาหารเพาะเชื้อ	38
Output ที่ได้จากโครงการ	40
ภาคผนวก	41
Reprint ผลงานวิจัยเรื่อง 3-Nitropropionic acid (3-NPA), a potent antimycobacterial agent from endophytic fungi: Is 3-NPA in some plants produced by endophytes? J. Nat. Prod. 2005, 68 (7): 1103–1105.	42
Reprint ผลงานวิจัยเรื่อง Cyclopentenones, Scaffolds for Organic Syntheses Produced by the Endophytic Fungus Mitosporic Dothideomycete sp. LRUB20. J. Nat. Prod. 2006, 69 (9): 1351-1353.	45

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 รายชื่อราเอนโคไฟท์ที่นำมาเพาะเลี้ยง และศึกษาสารสกัดหยาบด้วย ^1H NMR เพื่อคัดเลือกราเอนโคไฟท์ที่น่าสนใจนำมาศึกษาต่อเพื่อแยกให้ได้สารบริสุทธิ์	12

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1 โครงสร้างทางเคมีของ paclitaxel	3
2 โครงสร้างทางเคมีของ oreganic acid	3
3 โครงสร้างทางเคมีของ Leucinostatin A	4
4 โครงสร้างทางเคมีของ sequiatone A	4
5 โครงสร้างทางเคมีของ sequiatone B	4
6 โครงสร้างทางเคมีของ sequoiamonascins A และ B	5
7 โครงสร้างทางเคมีของ camptothecin	5
8 โครงสร้างทางเคมีของ podophyllotoxin	6
9 โครงสร้างทางเคมีของ asteric acid	11
10 โครงสร้างทางเคมีของ 2-hydroxymethyl-3-methyl-cyclopent-2-enone	13
11 โครงสร้างทางเคมีของ {2-methyl-5-[(4-methyl-2-nitro-phenyl)-hydrazono]-cyclopent-1-enyl}-methanol	13
12 โครงสร้างทางเคมีของ {2-[2,4-dinitrophenyl)-hydrazono]-5-methyl-cyclopentyl}-methanol	14
13 โครงสร้างทางเคมีของ 2-hydroxymethyl-3-methyl-cyclopentanone	14
14 Microscopic morphology ของราเอนโดไฟท์ L rub 20 ที่เพาะเลี้ยงบน PDA	16
15 โครงสร้างทางเคมีของ 3-nitropropionic acid	17
16 Pycnidium (ลูกศรชี้) ของราเอนโดไฟท์ USIA 5 บน banana leaf agar	19
17 α และ β conidia (ลูกศรชี้) ของราเอนโดไฟท์ USIA 5	19
18 Maximum-parsimony tree (50% majority-rule consensus tree) ซึ่งสร้างจากลำดับเบสของ ITS1-5.8S-ITS2 ของรา 25 taxa [consistency index (CI) = 0.6098, retention index (RI) = 0.7270, rescaled consistency index (RC) = 0.4433, tree length = 205 steps) แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของ Usia 5 และ Mfer 5 กับ reference taxa	21
19 โครงสร้างทางเคมีของ radicinin	22
20 โครงสร้างทางเคมีของ radicinol	22
21 Microscopic morphology ของราเอนโดไฟท์ Ctom 12	23
22 โครงสร้างทางเคมีของ mycoepoxydiene	24
23 โครงสร้างทางเคมีของ 5-hydroxy-6-(8-methyl-9-oxa-bicyclo[4.2.1]nona-2,4-dien-7-yl)-5,6-dihydro-pyran-2-one	25

สารบัญรูป (ต่อ)

	หน้า
24 โครงสร้างทางเคมีของ epoxycyclooctadiene - δ -lactone derivative	25
25 Maximum-parsimony tree (50% majority-rule consensus tree) ซึ่งสร้างจากลำดับเบสของ ITS1-5.8S-ITS2 ของรา 26 taxa (CI=0.6304, RI=0.7267, RC=0.4581, tree length = 230 steps) แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของ Hant 25, Usia 5 และ Mfer 5 กับ reference taxa	27
26 โครงสร้างทางเคมีที่คาดของ ATAG5-008	28
27 โครงสร้างทางเคมีที่คาดของ ATAG5-085	29
28 โครงสร้างทางเคมีที่คาดของ ATAG5-083	29
29 โครงสร้างทางเคมีของ rhizoctonic acid	30

บทนำ

ในปัจจุบัน โรคมะเร็งยังเป็นปัญหาสำคัญในวงการแพทย์ทั่วโลกรวมทั้งประเทศไทย และเป็นโรคที่มีอัตราการตายสูง ในปี 1990 ผู้ป่วยทั่วโลกที่ตายด้วยโรคมะเร็งมีจำนวนประมาณ 5.2 ล้านคน และ 2.8 ล้านคน เกิดในประเทศกำลังพัฒนา (Pisani *et al.*, 1999) ในปี 1995 ได้มีการสำรวจในประเทศแถบยุโรป 38 ประเทศ พบว่ามีผู้ป่วยมะเร็งรายใหม่ประมาณ 2.6 ล้านคน และตายไปประมาณ 1.6 ล้านคน (Bray *et al.*, 2002) สำหรับในประเทศไทย จากสถิติในปี 2531-2534 พบอัตราการเกิดโรคมะเร็งในทุกภาคทั่วประเทศ 150.4 ต่อ 100,000 คน สำหรับผู้ชาย และ 123.0 ต่อ 100,000 คน สำหรับผู้หญิง สถิติการเกิดโรคมะเร็งนี้ไม่แตกต่างจากสถิติที่ได้เคยรายงานก่อนหน้านี้ และพบว่าโรคมะเร็งก็เป็นสาเหตุการตายอันดับต้น ๆ ผู้ป่วยมะเร็งซึ่งเข้ารับการรักษาที่หน่วยมะเร็ง โรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ในระหว่างปี พ.ศ. 2535-2538 มีอัตราการตาย 89.7 ต่อ 100,000 คน สำหรับผู้ชาย และ 67.2 ต่อ 100,000 คน สำหรับผู้หญิง จากรายงานสถิติในปี 2537 ของผู้ป่วยมะเร็งซึ่งเข้ารับการรักษาที่หน่วยมะเร็งวิทยา โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดเชียงใหม่ พบว่ามีอัตราการตายสูงถึง 133.3 สำหรับผู้ชาย และ 121.0 สำหรับผู้หญิง (Vatanasapt *et al.*, 2002) ปัจจัยหนึ่งที่ทำให้โรคมะเร็งมีอัตราการตายสูงเช่นนี้เนื่องจากยาที่ใช้รักษาโรคมะเร็งมี therapeutic indices แคบ และมีความเป็นพิษสูง ในการรักษาโรคมะเร็งต้องให้ยาาร่วมกันหลายชนิดเนื่องจาก heterogeneity ของเซลล์มะเร็งและการดื้อยาของเซลล์มะเร็ง (Valley and Balmer, 1999) จากรายงานข้างต้นจะเห็นได้ว่า การค้นคว้าหาสารใหม่ที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับวงการแพทย์และสาธารณสุขไทยรวมทั้งประเทศต่าง ๆ ทั่วโลก

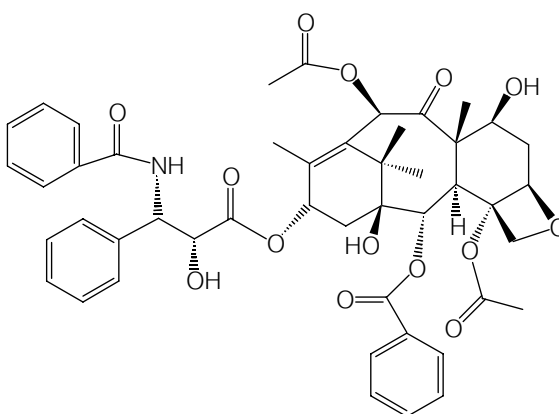
เป็นที่ทราบกันดีว่า ความเป็นจุลินทรีย์แหล่งสำคัญที่สร้างสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพซึ่งถูกนำมาใช้เป็นยารักษาโรค ราเอนโดไฟท์เป็นราประเภทหนึ่งซึ่งเจริญอยู่ในเนื้อเยื่อพืชที่มีชีวิตโดยไม่ก่อให้เกิดโรคและเป็นที่รู้จักกันมานาน (Petrini, 1991) แต่เพิ่งได้รับการศึกษาอย่างจริงจังในระยะ 30 ปีมานี้ พบว่าราเอนโดไฟท์ก็เป็นแหล่งสำคัญของสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพ (Tan and Zou, 2001) รวมทั้งสารที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง เช่น ในปี พ.ศ. 2538 มีรายงานว่า ราเอนโดไฟท์ *Taxomyces andreanae* ซึ่งแยกจากเปลือกของต้น Pacific yew (*Taxus brevifolia*) ก็สร้างยาต้านมะเร็ง paclitaxel (Taxol®) เช่นเดียวกับที่แยกได้จาก inner bark ของต้น Pacific yew (Stierle *et al.*, 1995) สำหรับประเทศไทยซึ่งมีความหลากหลายทางชีวภาพมาก ในโครงการวิจัยก่อนหน้านี้ ศาสตราจารย์ ดร. วิทยา มีวุฒิสม และคณะ ได้แยกราเอนโดไฟท์จากพืชสมุนไพรไทยและนำมาตรวจกรองหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ พบราเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจำนวนมาก ในจำนวนนี้เป็นราที่มีฤทธิ์ยับยั้ง KB cell line ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งช่องปาก 70 isolates (16.87 %) โดย 35 isolates มีค่า IC₅₀ น้อยกว่า 5 µg/ml และ 57 isolates (13.73 %) มีฤทธิ์ยับยั้ง BC cell line ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งทรวงอก โดย 8 isolates มีค่า IC₅₀ น้อยกว่า 5 µg/ml (Wiyakrutta *et al.*, 2003)

จากข้อมูลข้างต้นจะเห็นได้ว่าราเอนโคไฟท์ซึ่งมีฤทธิ์ด้านมะเร็งที่แยกได้จากพืชสมุนไพรเหล่านี้เป็นแหล่งที่น่าสนใจและเหมาะที่จะนำมาศึกษาเพื่อแยกสารออกฤทธิ์ คณะผู้วิจัยจึงต้องการที่จะนำราเอนโคไฟท์เหล่านี้มาเพาะเลี้ยงในปริมาณที่มากพอ เพื่อนำมาแยกและศึกษาโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ด้านเซลล์มะเร็ง รวมทั้งจัดจำแนกราเอนโคไฟท์ที่สร้างสารนั้น

การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง

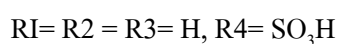
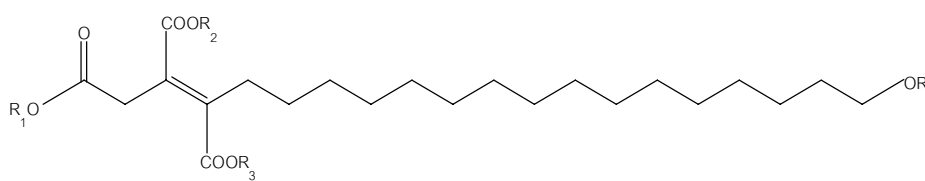
ราเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง

รายงานเกี่ยวกับราเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งมีไม่มากนัก ในปี 1995 Stierle และคณะได้พบว่าราเอนโดไฟท์ *Taxomyces andreanae* ซึ่งแยกจากเปลือกของต้น Pacific yew (*Taxus brevifolia*) สร้างยาต้านมะเร็ง paclitaxel (Taxol®) (รูปที่ 1) เช่นเดียวกับที่แยกได้จาก inner bark ของต้น Pacific yew



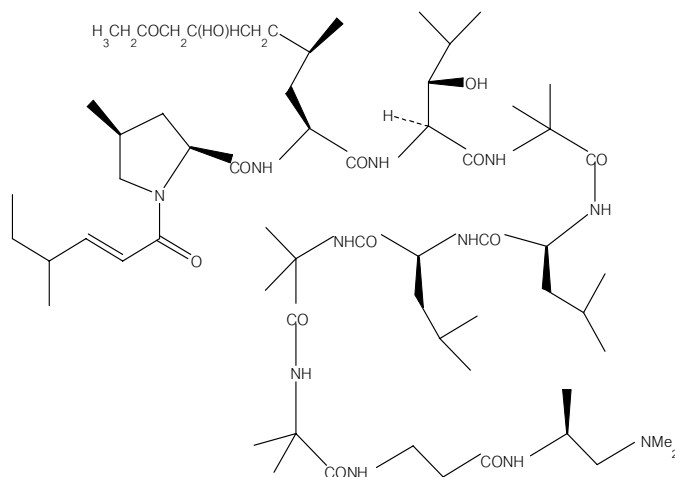
รูปที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของ paclitaxel

ในปี 1996 Jayasuriya และคณะ ได้พบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ RAS farnesyl-protein transferase คือ oreganic acid (รูปที่ 2) จากราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากใบของต้น *Berberis oregano* สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ farnesyl-protein transferase เป็นสารที่มีศักยภาพในการพัฒนาเป็นสารต้านมะเร็งสำหรับเซลล์มะเร็งที่เกิดจากการกลายพันธุ์ของ *ras*



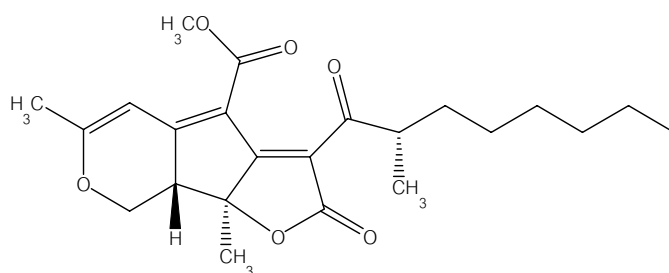
รูปที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของ oreganic acid

ในปี 1997 Strobel และคณะ ได้พบว่าราเอนโดไฟท์จาก European yew (*Taxus baccata*) คือ *Acremonium* sp. สร้าง leucinostatin A (รูปที่ 3) ซึ่งมีฤทธิ์ต้านเชื้อราและต้านมะเร็ง

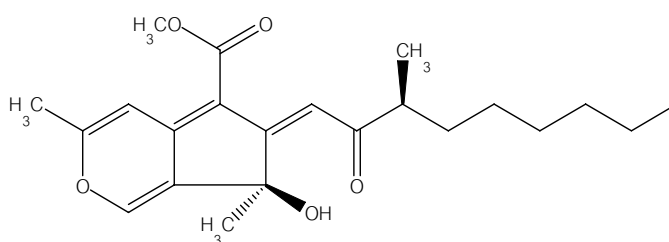


รูปที่ 3 โครงสร้างทางเคมีของ Leucinostatin A

ในปี 1999 Stierle และคณะ ได้พบ antitumor metabolites ชนิดใหม่ คือ sequiatone A (รูปที่ 4) และ sequiatone B (รูปที่ 5) จากราเอนโดไฟท์ *Aspergillus parasiticus* ซึ่งแยกจาก coast redwood, *Sequoia sempervirens*

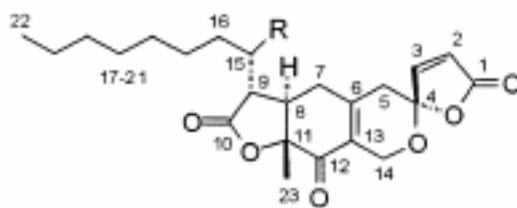


รูปที่ 4 โครงสร้างทางเคมีของ sequiatone A



รูปที่ 5 โครงสร้างทางเคมีของ sequiatone B

ต่อมาในปี 2003 นักวิจัยกลุ่มนี้ได้รายงานเพิ่มถึงสารใหม่ที่มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งจากราเอนโดไฟท์สายพันธุ์นี้ คือ sequoiamonascins A และ B (รูปที่ 6) (Stierle *et al.*, 2003)



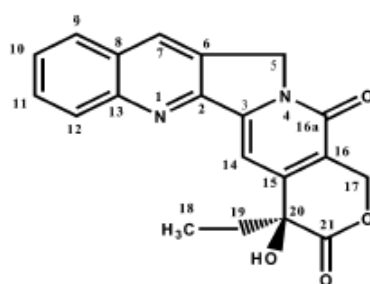
Sequoiamonascin A (R=OH)

Sequoiamonascin B (C4 epimer of A)

รูปที่ 6 โครงสร้างทางเคมีของ sequoiamonascins A และ B

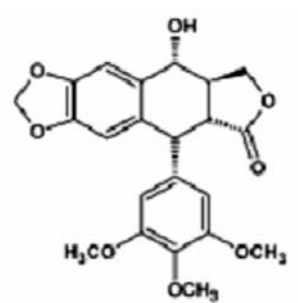
ในปี 2000 Wagenaar และคณะ ได้พบว่าราเอนโดไฟท์ *Rhinochladella* sp. ซึ่งแยกจากต้น *Tripterygium wilfordii* สร้าง cytochalasins ชนิดใหม่ที่มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งที่ทดสอบ คือ ovarian tumor cell line และ colon tumor cell lines ในปีเดียวกัน นักวิทยาศาสตร์ญี่ปุ่น Ishii และคณะ (2000) ได้รายงานถึงสารที่มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง ซึ่งได้จากราเอนโดไฟท์ *Phoma* sp. ในปี 2001 นักวิทยาศาสตร์จีน Huang และคณะ ได้พบฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งในราเอนโดไฟท์หลายชนิดที่แยกจากต้น *Taxus mairei* *Cephalotaxus fortunei* และ *Torreya grandis* ได้แก่ รา *Cephalosporium* sp. *Cladosporium* sp. *Mortierella* sp. *Mucor* sp. *Paecilomyces* sp. *Trichoderma* sp. และ unidentified strains 7 isolates

ในปี 2005 Puri และคณะ พบว่าราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จาก inner bark ของต้น *Nothapodytes foetida* สร้างสารที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง camptothecin (รูปที่ 7) เช่นเดียวกับที่แยกได้จากพืช *Camptotheca acuminata* Decne และพืชในสกุล *Nothapodytes* หลายชนิด



รูปที่ 7 โครงสร้างทางเคมีของ camptothecin

ในปี 2006 มีรายงานการสร้างสาร podophyllotoxin (รูปที่ 8) ของราเอนโดไฟท์ *Trametes hirsute* ซึ่งแยกจาก rhizome แห่งของต้น *Podophyllum hexandrum* (Puri et al, 2006) และราเอนโดไฟท์ *Phialocephala fortinii* ซึ่งแยกจาก rhizome ของต้น *Podophyllum peltatum* L. (Eyberger, 2006) Podophyllotoxin เป็นสารสำคัญที่แยกได้จากพืชในสกุล *Podophyllum* และเป็น precursor ของยาต้านมะเร็ง etoposide, teniposide และ etoposide phosphate



วัสดุและวิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุ

1. อาหารเพาะเชื้อ

Agar (Merck, Germany)

Malt extract (Merck, Germany)

Potato dextrose agar (Merck, Germany)

Potato dextrose broth (Difco, USA)

Yeast extract (Merck, Germany)

2. สารเคมี

Absolute ethanol (Merck, AR),

Acetone-d₆, 99.9 atom %D (Labscan),

Ammonium tartrate (Merck, GR)

Boric acid (Merck, GR),

Calcium dinitrate [Ca(NO₃)₂] (Merck, GR)

Chloroform-D, 99.9 atom %D (Labscan)

Copper sulphate pentahydrate (CuSO₄·5H₂O) (Merck, GR)

Deoxynucleotide triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, and dUTP) (FINNZYMES),

Dichloromethane (CH₂Cl₂) (Labscan, AR)

Dipotassium hydrogen phosphate (K₂HPO₄) (Merck, GR)

Disodium hydrogen phosphate (Na₂HPO₄) anhydrous (Merck, GR)

EDTA (Sigma, AR)

Ethyl acetate (EtOAc) (Labscan, AR)

Ferric chloride (FeCl₃) (Merck, GR)

Ferrous sulphate heptahydrate (FeSO₄·7H₂O) (Merck, GR)

LE agarose (Seakerm[®], FMC)

Manganese sulphate (MnSO₄) (Merck, GR)

Magnesium chloride (MgCl₂) (Merck, GR)

Magnesium sulphate heptahydrate (MgSO₄·7H₂O) (Merck, GR)

Potassium chloride (KCl) (Riedel de Haen, AR)

Potassium dihydrogen phosphate (KH₂PO₄) anhydrous (Merck, GR)

Potassium iodide (KI) (Merck, GR)

Potassium nitrate (KNO_3) (Merck, GR)

Sephadex LH-20 (Amersham)

Sodium acetate (NaOAc) (Sigma, AR)

Sodium chloride (NaCl) (Merck, GR)

Sodium hydrogen carbonate (NaHCO_3) (Merck, GR)

Sodium hypochlorite (Kao Industrial, Thailand)

Sodium nitrate (NaNO_3) (BHD, AR)

Sucrose (commercial grade)

Taq DNA polymerase (FINNZYMES)

Tris-HCl (Sigma)

Zinc sulphate heptahydrate ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (Merck, GR)

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การแยกราเอนโดไฟท์จากพืชสมุนไพร

- ก. เก็บตัวอย่างพืชสมุนไพร คือ กิ่งไม้และใบไม้ที่มีสภาพสมบูรณ์ ไม่ถูกแมลงกิน และไม่มี การติดเชื้อ
- ข. ล้างใบไม้และกิ่งไม้ให้สะอาด วางผึ่งให้แห้ง แล้วตัดกิ่งไม้เป็นท่อนยาวประมาณ 5 ซม. ทำให้พื้นผิวภายนอกของกิ่งไม้และใบไม้ปราศจากเชื้อโดยตัดแปลงจากวิธีของ Schulz และ คณะ (1995) คือแช่ในแอลกอฮอล์ 70% นาน 1 นาที แช่ในสารละลาย sodium hypochlorite (5 % available chlorine) นาน 5 นาที ล้างในน้ำกลั่นปราศจากเชื่อนาน 1 นาที 2 ครั้ง และ ซับให้แห้งบนกระดาษกรองปราศจากเชื้อ
- ค. แยกกิ่งไม้ (ใช้เฉพาะช่วงกลางของกิ่ง) ออกเป็น 3 ส่วน คือ เปลือก, cortex และส่วนในสุด แล้วตัดเป็นชิ้นย่อย สำหรับใบ ใช้ใบมีดปราศจากเชื้อตัดใบเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมเล็ก ๆ
- ง. วางชิ้นส่วนต่าง ๆ ของกิ่งไม้และใบไม้ ลงบน water agar แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 °ซ ดู การงอกของเชื้อราจากเนื้อเยื่อพืชทุกวัน
- จ. แยกปลายเส้นใยของเชื้อราที่เจริญออกมาจากเนื้อเยื่อพืชไปเพาะเลี้ยงต่อบน potato dextrose agar และบ่มที่อุณหภูมิ 25 °ซ จนกระทั่งราเอนโดไฟท์ที่แยกได้เจริญเต็มที่ ดูความบริสุทธิ์ของราเอนโดไฟท์โดยสังเกตจากลักษณะโคโลนี

2. การเก็บรักษาราเอนโดไฟท์

- ก. เพาะเลี้ยงราเอนโดไฟท์บน cornmeal malt extract agar slant จนราเจริญเต็มผิวหน้าอาหาร ราวที่บดด้วย sterile liquid paraffin

- ข. เพาะเลี้ยงราบนโดไฟท์บน potato dextrose agar แล้วตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมเล็ก ๆ เก็บในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ และเก็บใน 15 % glycerol

3. การเพาะเลี้ยงราบนโดไฟท์เพื่อนำมาสกัดเพื่อตรวจสอบเบื้องต้นด้วย proton NMR

- ก. เพาะเลี้ยงราบนโดไฟท์ isolate ละ 400 มล. ที่อุณหภูมิ 25 °C นาน 21 วัน
- ข. กรองเชื้อราที่เพาะเลี้ยงได้ เตรียมสารสกัดหยาบโดยการสกัดน้ำหมักราด้วย dichloromethane หรือ ethyl acetate และสกัดเส้นใยราด้วย dichloromethane:methanol (1:1)
- ค. ตรวจสอบสารสกัดหยาบบเบื้องต้นด้วย proton NMR เพื่อดูว่าประกอบด้วยสารที่น่าสนใจหรือไม่

4. การเพาะเลี้ยงราบนโดไฟท์ที่คัดเลือกในปริมาณมากสำหรับการแยกสารบริสุทธิ์

- ก. เพาะเลี้ยงราบนโดไฟท์ที่คัดเลือกในอาหารเพาะเชื้อที่เหมาะสม ปริมาตรทั้งหมด 5 - 10 ลิตร นาน 21 วัน ที่อุณหภูมิ 25 °C
- ข. กรองเชื้อราที่เพาะเลี้ยงได้ เตรียมสารสกัดหยาบโดยการสกัดน้ำหมักราด้วย dichloromethane หรือ ethyl acetate และสกัดเส้นใยราด้วย dichloromethane:methanol (1:1) แล้วนำไปประเหยแห้งภายใต้การลดความดัน จนได้เป็นสารสกัดหยาบ ส่งสารสกัดหยาบไปทดสอบฤทธิ์ด้านเซลล์มะเร็ง

5. การแยกให้ได้สารบริสุทธิ์

นำสารสกัดหยาบที่เตรียมได้ มาแยกให้ได้สารบริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคทาง chromatography โดยมีการตรวจสอบฤทธิ์ด้านเซลล์มะเร็งร่วมด้วย

6. การพิสูจน์สูตรโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์

- ก. พิสูจน์สูตรโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคทาง spectroscopy ได้แก่ nuclear magnetic resonance spectrometry, mass spectrometry, UV-visible spectrometry และ infrared spectrometry
- ข. ส่งสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ไปทดสอบฤทธิ์ด้านเซลล์มะเร็ง

7. การจัดจำแนกราบนโดไฟท์

- ก. การจัดจำแนกจากฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์
เพาะเลี้ยงราบนโดไฟท์บน potato dextrose agar และ banana leaf agar แล้วบ่มที่ 25 °C สังเกตการสร้างสปอร์

ข. การจัดจำแนกด้วยวิธีทางโมเลกุล

จำแนกกราแอนโดไฟท์จาก nucleotide sequence ของ ribosomal RNA gene โดยเฉพาะเลี้ยงรา ใน potato dextrose broth นาน 5-7 วัน แยก DNA ของเชื้อราโดยใช้ DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen) แล้วเพิ่มปริมาณของ ribosomal DNA ด้วย PCR ในส่วนของ ITS1-5.8S-ITS2 โดยใช้ primers ITS5 (forward primer) และ ITS4 (reverse primer) และในส่วนของ 18S RNA โดยใช้ primers NS1 (forward primer) และ NS8 (reverse primer) ตามวิธีของ White และคณะ (1990) ส่ง PCR products ที่ได้ไปหาลำดับ nucleotide ที่ Bioservice Unit, BIOTEC นำลำดับ nucleotide ที่ได้ไปสืบค้นหาลำดับ nucleotide ที่เหมือนกันในฐานข้อมูลของ GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTN 2.2.15 (Altschul *et al.*, 1997) วิเคราะห์ sequence similarity โดยใช้ ClustalW (1.82) multiple sequence alignment program (Thompson *et al.*, 1994) และสร้าง phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม PAUP® (v 4.0 b10) (Swofford, 2003) วิเคราะห์ผลที่ได้และจัดจำแนกรา

ผลการศึกษาวิจัยและการอภิปรายผล

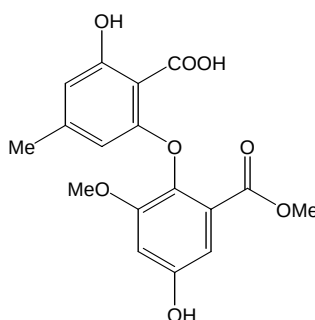
การคัดเลือกราเอนโดไฟท์ซึ่งสร้างสารที่น่าสนใจ

ราเอนโดไฟท์ที่คัดเลือกมาเพาะเลี้ยงในอาหารปริมาตร 400 มล. มีจำนวนทั้งหมด 23 isolates ดังแสดงในตารางที่ 1 หลังจากวิเคราะห์ proton NMR ของสารสกัดหยาบจากน้ำหมักเชื้อแล้ว มีราเอนโดไฟท์ที่น่าสนใจนำมาเพาะเลี้ยงในปริมาณมาก เพื่อแยกสารบริสุทธิ์ 7 isolates ได้แก่ Lrub 20, Usia 5, Mfer 5, Ctom 12, Hant 25, Atag 5 และ Gspe 11 สำหรับสารสกัดหยาบของเส้นใยรา จากการวิเคราะห์ proton NMR พบว่าส่วนใหญ่มี fatty acids เป็นองค์ประกอบ จึงไม่ได้นำมาศึกษาต่อ ยกเว้น สารสกัดหยาบของเส้นใยรา Usia 5 ที่เพาะเลี้ยงใน MID medium การพบเมแทบอไลต์ทุติยภูมิของราเอนโดไฟท์ที่ศึกษาในน้ำหมักเชื้อเป็นส่วนใหญ่เป็นข้อสนับสนุนว่าราเอนโดไฟท์อาจมีบทบาทสำคัญในการสร้างและหลั่งสารแก่พืชเพื่อป้องกันพืชจากเชื้อก่อโรคพืช และสิ่งมีชีวิตอื่นที่รบกวนหรือเป็นอันตรายต่อพืช

การแยกสารบริสุทธิ์จากราเอนโดไฟท์ Lrub 20 และ การจัดจำแนกรา

การเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟท์ Lrub 20 ใน malt Czapek broth ปริมาตร 5 ลิตร ให้สารสกัดหยาบ สีน้ำตาลที่มีลักษณะข้นเหนียวและมีน้ำหนักแห้งเท่ากับ 1.469 กรัม (สกัดจากน้ำหมักเชื้อด้วย ethyl acetate) สารสกัดหยาบมีฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค ด้วยค่า MIC เท่ากับ 100 $\mu\text{g/ml}$ แต่ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง เมื่อนำสารสกัดหยาบมาแยกด้วย Sephadex LH-20 column แยกได้สารบริสุทธิ์ที่ทราบสูตรโครงสร้าง 3 ชนิด ดังนี้

สารประกอบชนิดที่ 1 คือ L20.7 เมื่อพิสูจน์สูตรโครงสร้างด้วย NMR และเปรียบเทียบ NMR data พบว่า เป็น asteric acid (รูปที่ 9) จากการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพพบว่ามีฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค โดยมีค่า MIC เท่ากับ 200 $\mu\text{g/ml}$ เป็นที่ทราบกันมานานแล้วว่า asteric acid เป็นเมแทบอไลต์ทุติยภูมิชนิดหนึ่งของรา *Aspergillus terreus* (Curtis *et al.*, 1960) ต่อมา มีการศึกษาวิจัยพบว่า asteric acid เป็น non-peptide endothelin binding inhibitor ตัวแรกที่ค้นพบ (Ohashi *et al.*, 1992) ต่อมา Lee และ คณะ (2002) พบ อนุพันธ์ของ asteric acid จากราที่ยังไม่ได้จัดจำแนก และพบว่าสารเหล่านี้มีคุณสมบัติเป็น anti-angiogenic

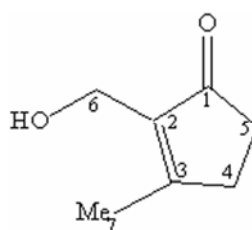


รูปที่ 9 โครงสร้างทางเคมีของ asteric acid

ตารางที่ 1 รายชื่อราเอนโดไฟท์ที่นำมาเพาะเลี้ยง และศึกษาสารสกัดหยาบด้วย ^1H NMR เพื่อคัดเลือกราเอนโดไฟท์ที่น่าสนใจนำมาศึกษาต่อเพื่อแยกให้ได้สารบริสุทธิ์

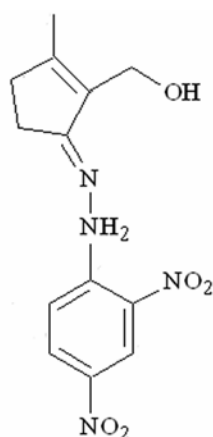
No	Endophytic fungal isolate	Culture medium	Host plant	Scientific name
1	Achi 4	YES	กระท่อม	<i>Anthocephalus chinensis</i> Rich. ex Walp.
2	Atag 5	MCz	กระเช้าฝีมด	<i>Aristolochia tagala</i> Cham.
3	Cobl 1	YES	เปล้าใหญ่	<i>Croton oblongifolius</i> Roxb
4	Ctom 1	MIB	เคด	<i>Catunaregam tomentosa</i> (Bl. Ex DC.)
5	Ctom 12	MCz, MIB		Tirveng
6	Doli 5	MCz	ชิงชัน	<i>Dalbergia oliveri</i> Gamble
7	Gell 12	MCz, MIB	ทองแมว	<i>Gmelina elliptica</i> Sm.
8	Gell 14	MCz		
9	Grsp 11	MIB		<i>Grewia</i> sp.
10	Grsp 19	MCz, MIB		
11	Gspe 11	MCz	พุดรัตนา	<i>Gardenia</i> sp.
12	Hant 25	MCz	กระเบาใหญ่	<i>Hydnocarpus anthelminthicus</i> Pierre
13	Haro 1	MCz	เต่าเกียด	<i>Homalomena aromatica</i> Schott
14	Lrub 20	MCz	กะตังใบดอกแดง	<i>Leea rubra</i> Blume ex Spreng.
15	Mfer 5	น้ำมะพร้าว	บุนนาค	<i>Mesua ferrea</i> Linn.
16	Msmi 11	YES	ฝนแสนห่า	<i>Myxopyrum smilacifolium</i> Bl.
17	Psca 1	MCz	ช้างงาเดียว	<i>Paramignya scandens</i> Craib
18	Rlyi 1	MIB	กุหลาบขาว	<i>Rhododendron lyi</i> Levl.
19	Spin 10	YES	มะกอกป่า	<i>Spondias pinnata</i> Kurz
20	Stub 3	MCz	หนอนตายหยาก	<i>Stemona tuberosa</i> Lour.
21	Tasp15	MIB	ไชหิน	<i>Tadehagi</i> sp.
22	Tcam 1	MCz	ถลกบาตร	<i>Tetrastigma campylocarpum</i> Planch.
23	Usia 5	MCz	เสน	<i>Urobotrya siamensis</i> Hiepko

สารประกอบชนิดที่ 2 คือ L20.5(34)5 มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาลใส จากการศึกษาสูตรโครงสร้างด้วย 2-D NMR และ Mass spectrometry และ ศึกษา UV spectrum และ IR absorption spectrum พบว่าเป็น 2-hydroxymethyl-3-methyl-cyclopent-2-enone (รูปที่ 10) ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานว่าสารนี้เป็นเมแทบอลิท์ทุติยภูมิของรา แต่มีรายงานว่าเป็นสารที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี (Cho *et al.*, 2004) การตรวจสอบฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง ฤทธิ์ต้าน HSV-1 ฤทธิ์ต้าน *Candida albicans* ฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค ฤทธิ์ต้านมาเลเรีย และความเป็นพิษต่อ Vero cell พบว่าสารนี้มีฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค (MIC 200 $\mu\text{g/ml}$)



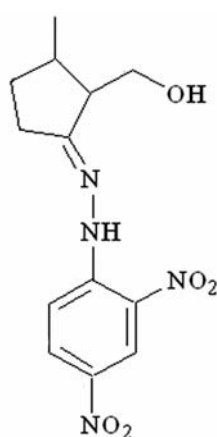
รูปที่ 10 โครงสร้างทางเคมีของ 2-hydroxymethyl-3-methyl-cyclopent-2-enone

ได้ทำการศึกษายืนยันสูตรโครงสร้างด้วยการทำปฏิกิริยากับ 2,4-dinitrophenylhydrazine ได้เป็น hydrazone derivative ซึ่งหลังจากทำให้บริสุทธิ์ ได้นำสารบริสุทธิ์ไปศึกษาสูตรโครงสร้าง พบว่ามีโครงสร้างเป็น {2-methyl-5-[(4-methyl-2-nitro-phenyl)-hydrazone]-cyclopent-1-enyl}-methanol ดังรูปที่ 11 นอกจากนี้ได้ทำการตกผลึก hydrazone derivative และศึกษาด้วย x-ray crystallography ผลที่ได้ก็ยืนยันว่าเป็น {2-methyl-5-[(4-methyl-2-nitro-phenyl)-hydrazone]-cyclopent-1-enyl}-methanol



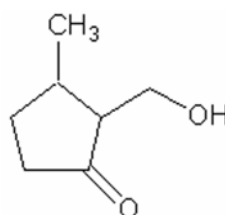
รูปที่ 11 โครงสร้างทางเคมีของ {2-methyl-5-[(4-methyl-2-nitro-phenyl)-hydrazone]-cyclopent-1-enyl}-methanol

สารประกอบชนิดที่สาม คือ Fraction L20B465 ซึ่งเมื่อนำมาศึกษาสูตรโครงสร้าง คาดว่า สารนี้เป็นสารผสมของ 2-hydroxymethyl-3-methyl-cyclopentanone และอนุพันธ์ พบว่าเมื่อใช้ silica gel, Sephadex LH-20, และ HPLC ไม่สามารถแยกสารผสมนี้ออกจากกัน จึงได้ทำการศึกษา ยืนยันสูตรโครงสร้างด้วยการทำปฏิกิริยากับ 2,4-dinitrophenylhydrazin ได้เป็น hydrazone derivative ซึ่งหลังจากทำให้บริสุทธิ์ได้นำสารบริสุทธิ์ไปศึกษาสูตรโครงสร้าง พบว่ามีโครงสร้าง เป็น {2-[2,4-dinitrophenyl]-hydrazono]-5-methyl-cyclopentyl}-methanol ดังรูปที่ 12 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารนี้ พบว่ามีฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค (MIC 200 $\mu\text{g/ml}$) และ แสดงความเป็นพิษ ต่อ Vero cell (IC_{50} 21.7 $\mu\text{g/ml}$)



รูปที่ 12 โครงสร้างทางเคมีของ {2-[2,4-dinitrophenyl]-hydrazono]-5-methyl-cyclopentyl}-methanol

ผลที่ได้แสดงว่าราเอนโดไฟท์ Lrub 20 สร้างสาร cyclopentanone อีกหนึ่งชนิด คือ 2-hydroxy methyl-3-methyl-cyclopentanone (รูปที่ 13)



รูปที่ 13 โครงสร้างทางเคมีของ 2-hydroxymethyl-3-methyl-cyclopentanone

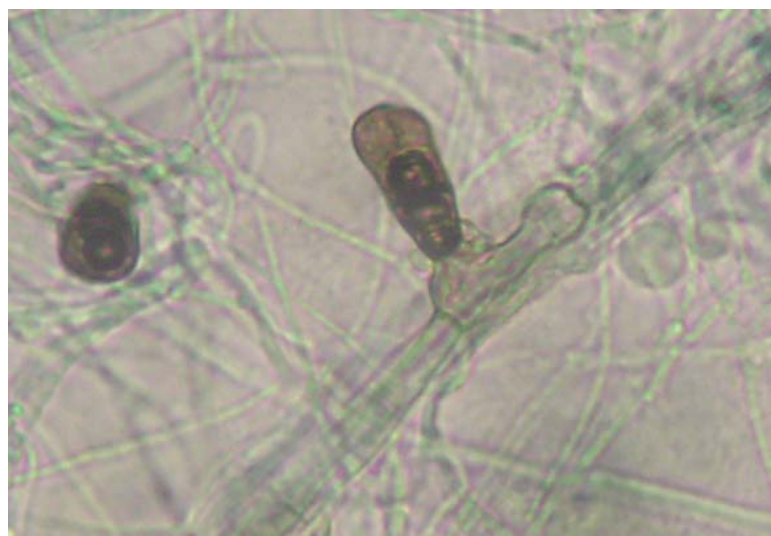
การจัดจำแนกราเอนโดไฟท์ Lrub 20

เมื่อเพาะเลี้ยงบน PDA นาน 1 เดือน พบว่าราเอนโดไฟท์ Lrub 20 สร้างสปอร์สีน้ำตาลที่มีลักษณะต่างจากราชนิดอื่น ดังแสดงในรูปที่ 14 การวิเคราะห์ลำดับเบสของ rRNA gene ของราเอนโดไฟท์ Lrub 20 และนำข้อมูลที่ได้ไปสืบค้นข้อมูลของราที่มีลำดับเบสเหมือนกันจาก

ฐานข้อมูลของ GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTN 2.2.15 (Altschul *et al.*, 1997) พบว่า Lrub 20 เป็นราในกลุ่ม Ascomycota จากการศึกษาลำดับเบส sequence similarity โดยใช้ ClustalW (1.82) multiple sequence alignment program (Thompson *et al.*, 1997) พบว่า Lrub 20 มีลำดับเบสในส่วน ITS1-5.8S-ITS2 ต่างจากลำดับเบสของราที่มีในฐานข้อมูลมาก (homology < 80%) และมีลำดับเบสในส่วน 18S RNA เหมือน (96% homology) รา *Acrospermum compressum* and *A. gramineum* ใน family Acrospermaceae, subphylum Pezizomycotina, phylum Ascomycota อย่างไรก็ตาม ลักษณะสปอร์ของ Lrub 20 แตกต่างจากลักษณะสปอร์ของ *Dactylaria* (ซึ่งเป็น anamorph ของ *Acrospermum compressum*) และ *Virgariella* (ซึ่งเป็น anamorph ของ *A. graminum*) จากข้อมูลวิเคราะห์ได้ทั้งหมดนี้ จึงจัดจำแนกราเอนโดไฟต์ isolate Lrub 20 เป็น mitosporic fungus ใน class Dothideomycetes et Chaetothyriomycetes incertae sedis, subphylum Pezizomycotina, phylum Ascomycota ลำดับเบสของ ITS1-5.8S-ITS2 และ 18S RNA gene ของราเอนโดไฟต์ Lrub 20 ได้ถูกส่งไปเก็บในฐานข้อมูลของ GenBank (accession numbers DQ384608 และ DQ381536 ตามลำดับ)

ผลงานเกี่ยวกับ cyclopentanones จากราเอนโดไฟต์ Lrub 20 ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารดังนี้

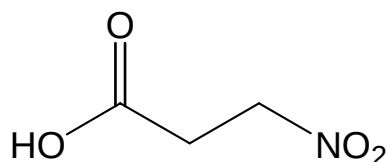
Chomcheon P., Sriubolmas N., Wiyakrutta S., Ngamrojanavanich N., Chaichit N., Mahidol C., Ruchirawat S., and Kittakoop P. 2006. Cyclopentenones, Scaffolds for Organic Syntheses Produced by the Endophytic Fungus Mitosporic Dothideomycete sp. LRUB20. J. Nat. Prod. 69 (9): 1351-1353.



รูปที่ 14 Microscopic morphology ของราเอนโดไฟท์ L rub 20 ที่เพาะเลี้ยงบน PDA

การแยกสารบริสุทธิ์จากราเอนโดไฟท์ Usia 5 และ การจัดจำแนก

การสกัดน้ำหมักเชื้อ 6 ลิตร (เพาะเลี้ยงเชื้อใน MCzB) ด้วย dichloromethane ได้สารสกัดหยาบมีน้ำหนักแห้งเท่ากับ 1.04 g สารสกัดหยาบมีฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค ด้วยค่า MIC เท่ากับ 100 $\mu\text{g/ml}$ และมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *Candida albicans* ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 15.66 $\mu\text{g/ml}$ แต่ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง เมื่อนำสารสกัดหยาบมาแยกให้บริสุทธิ์ด้วย Sephadex LH-20 column และ HPLC และพิสูจน์สูตรโครงสร้างด้วย NMR และเปรียบเทียบ NMR data พบว่า ราเอนโดไฟท์ Usia 5 สร้างสาร 3-nitropropionic acid (3-NPA) (รูปที่ 15) การตรวจฤทธิ์ทางชีวภาพของ 3-nitropropionic acid พบว่ามีฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรคดีมาก คือ มีค่า MIC เท่ากับ 0.39 $\mu\text{g/ml}$ อย่างไรก็ตาม ถึงแม้จะมีฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรคดีมาก 3-NPA ก็มีความเป็นพิษสูง คือมีคุณสมบัติเป็น neurotoxin (Esfandiari *et al.*, 1997)



รูปที่ 15 โครงสร้างทางเคมีของ 3-nitropropionic acid

จากการเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟท์ Usia 5 เพิ่มเติมในอาหาร MID medium และนำมาสกัดด้วย ethyl acetate ได้สารสกัดหยาบ ซึ่งนำมาแยกด้วย Sephadex LH-20 column เพื่อให้ได้สารบริสุทธิ์ พบว่า แยกได้สาร 3-nitropropionic acid เช่นเดียวกับที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใน MCzB ส่วนเส้นใยรา เมื่อนำมาสกัดด้วย methanol และ dichloromethane ได้สารสกัดหยาบซึ่งนำมาแยกด้วย Sephadex LH-20 column เพื่อให้ได้สารบริสุทธิ์ พบว่า fraction U5C-634 เป็นสารบริสุทธิ์ ซึ่งเมื่อพิจารณาลักษณะของ NMR spectrum พบว่าน่าสนใจ และการตรวจฤทธิ์ทางชีวภาพของสารบริสุทธิ์จาก fraction U5C-634 พบว่า

- มีฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค คือ มีค่า MIC เท่ากับ 3.125 $\mu\text{g/ml}$
- แสดงความเป็นพิษต่อ Vero cell ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 5.0 $\mu\text{g/ml}$
- แสดงความเป็นพิษต่อ BC cell ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 1.4 $\mu\text{g/ml}$
- แสดงความเป็นพิษต่อ KB cell ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 4.94 $\mu\text{g/ml}$
- แสดงความเป็นพิษต่อ NCI-H187 cell ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 1.26 $\mu\text{g/ml}$

การจัดจำแนกราเอนโดไฟต์ Usia 5

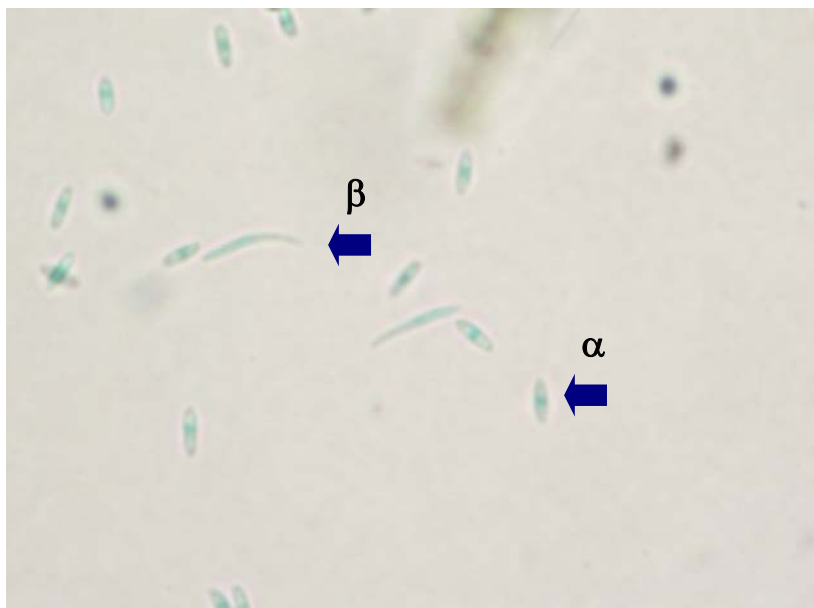
เมื่อเพาะเลี้ยงบน banana leaf agar นาน 2 เดือน พบว่าราเอนโดไฟต์ Usia 5 สร้าง pycnidia (รูปที่ 16), α -conidia และ β -conidia (พบน้อย) (รูปที่ 17) ซึ่งเป็นลักษณะของราในสกุล *Phomopsis* (Sutton, 1980) จากการวิเคราะห์ลำดับ base ของ rRNA gene ในส่วนของ ITS1-5.8S-ITS2 และ นำข้อมูลที่ได้ไปสืบค้นข้อมูลของราที่มีลำดับเบสเหมือนกันจากฐานข้อมูลของ GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTN 2.2.15 (Altschul *et al.*, 1997) พบว่า Usia 5 มีลำดับเบสเหมือนราในสกุล *Phomopsis* และ *Diaporthe* ซึ่งเป็น teleomorphs ของ *Phomopsis* วงศ์ Valsaceae, order Diaporthales, class Sordariomycetes, subphylum Pezizomycotina, phylum Ascomycota ผลที่ได้นี้สอดคล้องกับ microscopic morphology จากการศึกษาลำดับ sequence similarity โดยใช้ ClustalW (1.82) multiple sequence alignment program (Thompson *et al.*, 1994) พบว่า Usia 5 มี sequence identity สูงสุด (97%) ต่อเชื้อ *P. quercina*, *P. vaccinii*, *P. amygdali*, และ *P. juniperivora* ลำดับเบสของ ITS1-5.8S-ITS2 ของราเอนโดไฟต์ Usia5 ได้ถูกส่งไปเก็บในฐานข้อมูลของ GenBank (accession number AY907348)

ผลงานเกี่ยวกับ 3-NPA จากราเอนโดไฟต์ Usia 5 ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารดังนี้

Chomcheon P., Wiyakrutta S., Sriubolmas N., Ngamrojanavanich N., Isarangkul D., and Kittakoop P. 2005. 3-Nitropropionic acid (3-NPA), a potent antimycobacterial agent from endophytic fungi: Is 3-NPA in some plants produced by endophytes? J. Nat. Prod. 68 (7): 1103–1105.



รูปที่ 16 Pycnidium (ลูกศรชี้) ของราเอนโดไฟท์ USIA 5 บน banana leaf agar



รูปที่ 17 α และ β conidia (ลูกศรชี้) ของราเอนโดไฟท์ USIA 5

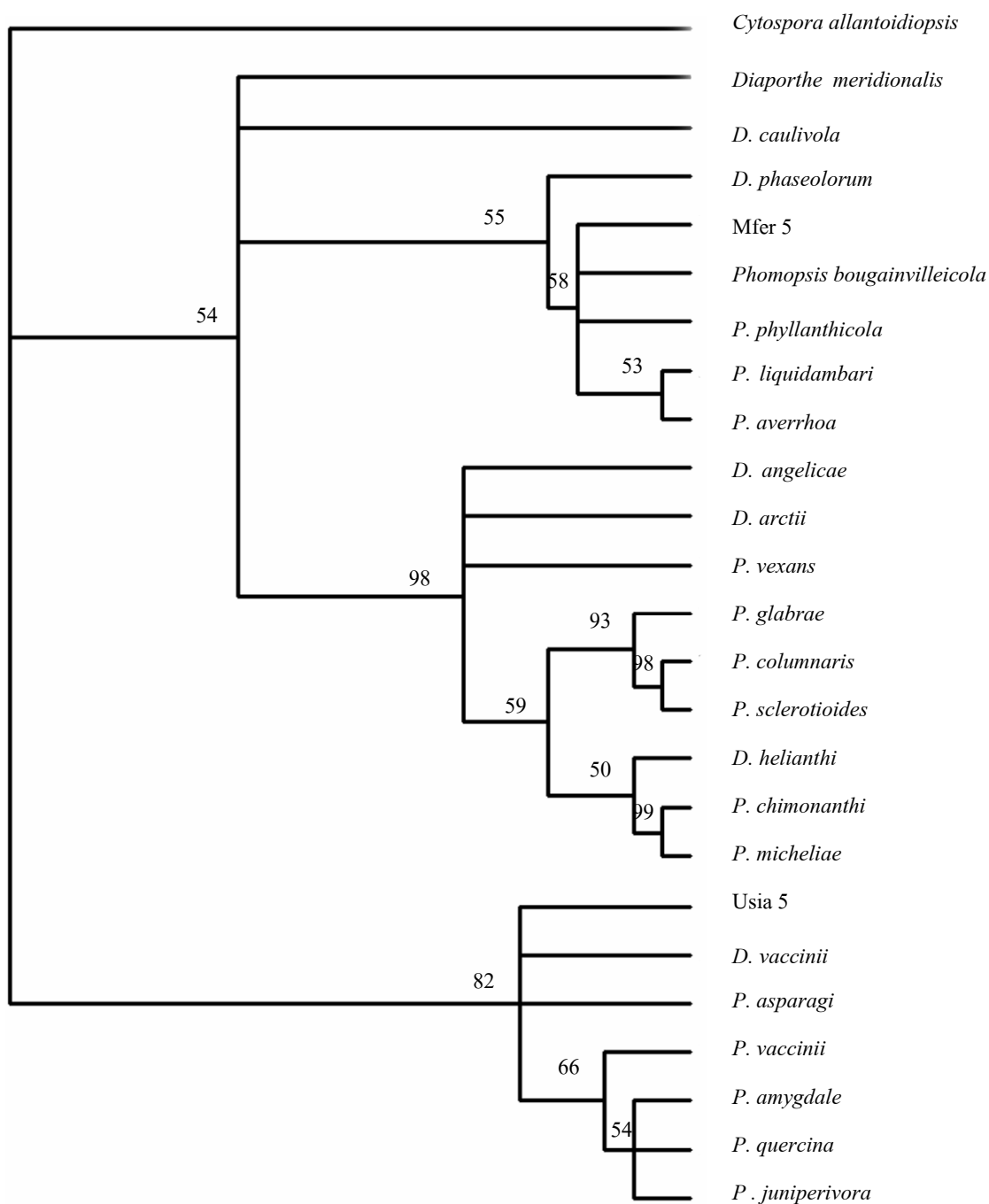
การแยกสารบริสุทธิ์จากราเอนโดไฟท์ Mfer5 และ การจัดจำแนกรา

การเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟท์ Mfer 5 ในน้ำมะพร้าว ปริมาตร 10 ลิตร ให้สารสกัดหยาบหนัก 567 mg (สกัดจากน้ำหมักเชื้อด้วย dichloromethane) และแสดงความเป็นพิษต่อ BC cell ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 0.93 $\mu\text{g/ml}$ เมื่อนำมาแยกด้วย Sephadex LH-20 column พบว่าแยกได้สารในกลุ่ม cytochalasins และ 3-nitropropionic acid เช่นเดียวกับราเอนโดไฟท์ Usia 5

นอกเหนือจากราเอนโดไฟท์ Usia 5 และ Mfer 5 แล้ว ยังพบว่า ราเอนโดไฟท์ Gell 14 (*Fusicoccum* sp.), Grsp 11 (*Diaporthe* sp.), Grsp 19 (*Phomopsis* sp.), Rlyi 1 (*Phomopsis* sp.) และ Tasp 15 (*Fusarium* sp.) ก็สร้างสาร 3-nitropropionic acid เช่นกัน ผลที่ได้นี้แสดงให้เห็นว่า 3-NPA เป็นสารพิษที่พบได้ทั่วไปในราหลายชนิด ดังเช่นที่มีรายงานว่าพบได้ทั่วไปในพืชและเชื้อรา (Esfandiari *et al.*, 1997)

การจัดจำแนกราเอนโดไฟท์ Mfer5

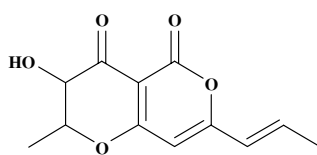
เมื่อเพาะเลี้ยงบน banana leaf agar นาน 2 เดือน พบว่าราเอนโดไฟท์ Mfer 5 สร้าง pycnidia, α -conidia และ β -conidia ซึ่งเป็นลักษณะของราในสกุล *Phomopsis* เช่นเดียวกับ Usia 5 จากการวิเคราะห์ลำดับ base ของ rRNA gene ในส่วนของ ITS1-5.8S-ITS2 และนำข้อมูลที่ได้ไปสืบค้นข้อมูลของราที่มีลำดับเบสเหมือนกันจากฐานข้อมูลของ GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTN 2.2.15 (Altschul *et al.*, 1997) พบว่า Mfer 5 มีลำดับเบสเหมือนราในสกุล *Phomopsis* และ *Diaporthe* ซึ่งเป็น teleomorphs ของ *Phomopsis* เช่นกัน ผลที่ได้นี้สอดคล้องกับ microscopic morphology จากการศึกษาลำดับ sequence similarity โดยใช้ ClustalW (1.82) multiple sequence alignment program (Thompson *et al.*, 1994) พบว่า Mfer 5 มี sequence identity สูงสุด (98%) ต่อเชื้อ *P. eucommii* และ *P. lagerstroemiae* และต่อราเอนโดไฟท์ Usia 5 เพียง 93 % นอกจากนี้ การศึกษา phylogenetic analysis โดยใช้โปรแกรม PAUP[®] (v 4.0 b10) (Swofford, 2003) และใช้ maximum parsimony algorithm พบว่า isolate Mfer 5 and Usia 5 อยู่ใน clade ที่ต่างกัน (รูปที่ 18) ผลการวิเคราะห์ที่ศึกษาได้เหล่านี้ ยืนยันว่าราเอนโดไฟท์ Mfer 5 และ ราเอนโดไฟท์ Usia 5 เป็นรา *Phomopsis* sp. ต่าง species กันและมีวิวัฒนาการใกล้เคียงกัน ลำดับเบสของ ITS1-5.8S-ITS2 ของราเอนโดไฟท์ Mfer 5 ได้ถูกส่งไปเก็บในฐานข้อมูลของ GenBank (accession number AY907347)



รูปที่ 18 Maximum-parsimony tree (50% majority-rule consensus tree) ซึ่งสร้างจากลำดับเบสของ ITS1-5.8S-ITS2 ของรา 25 taxa [consistency index (CI) = 0.6098, retention index (RI) = 0.7270, rescaled consistency index (RC) = 0.4433, tree length = 205 steps) แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของ Usia 5 และ Mfer 5 กับ reference taxa ตัวเลขที่ internal node คือ เปอร์เซ็นต์ของ tree จากการวิเคราะห์ข้อมูลที่เลือกซ้ำ 1000 ครั้ง (bootstrap replications) *Cytospora allantoidiopsis* เป็น outgroup taxa

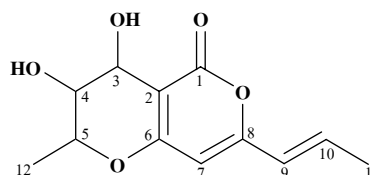
การแยกสารบริสุทธิ์จากราเอนโดไฟท์ Ctom 12 และ การจัดจำแนกรา

การเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟท์ Ctom 12 ใน MID broth (+ benzoic acid 0.01 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 500 มล. ให้สารสกัดหยาบหนัก 285 มก. (สกัดจากน้ำหมักเชื้อด้วย ethyl acetate) เมื่อนำมาละลายใน methanol พบว่ามีทั้งส่วนที่ละลายและไม่ละลายซึ่งมีลักษณะเป็นผงสีขาว ได้แยกส่วนที่เป็นผงสีขาวและนำไปศึกษาสูตรโครงสร้าง จากการวิเคราะห์ข้อมูลของ MS และ NMR ร่วมกับการเปรียบเทียบข้อมูลที่มีรายงานมาแล้ว พบว่าเป็นสาร radicinin (รูปที่ 19) เป็นที่ทราบกันดีว่า radicinin มีคุณสมบัติเป็น phytotoxin พบว่าสารนี้เป็นเมแทบอไลต์ทุติยภูมิของราที่ก่อโรคพืช เช่น *Bipolaris coicis* (Nakajima *et al.*, 1997) *Alternaria helianthi* (Tal *et al.*, 1985) และ *A. chrysanthemi* (Robeson *et al.*, 1982)



รูปที่ 19 โครงสร้างทางเคมีของ radicinin

ส่วนของสารสกัดหยาบที่ละลายใน methanol ได้ถูกนำมาแยกด้วย Sephadex LH-20 column ได้สารบริสุทธิ์ที่มีลักษณะขุ่นหนืดและมีสีแดง จากการวิเคราะห์ข้อมูลของ MS และ NMR ร่วมกับการเปรียบเทียบข้อมูลที่มีรายงานมาแล้ว พบว่าเป็นสาร radicinol (รูปที่ 20)



รูปที่ 20 โครงสร้างทางเคมีของ radicinol

การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของ radicinin และ radicinol ที่สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ พบว่า

ก. มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง โดยมีค่า IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) ดังนี้

Cell line	Hucca-1	KB	HeLa	MDA-MB231	T47D	H69AR	HL-60	P388
radicinin	2.0	0.5	1.2	0.2	0.3	2.8	1.30	0.97
radicinol	> 50	> 50	> 50	30.0	30.0	Inactive	> 50	40.73
Etoposide*	5.0	0.5	0.4	0.2	0.05	35.0	0.72	0.09

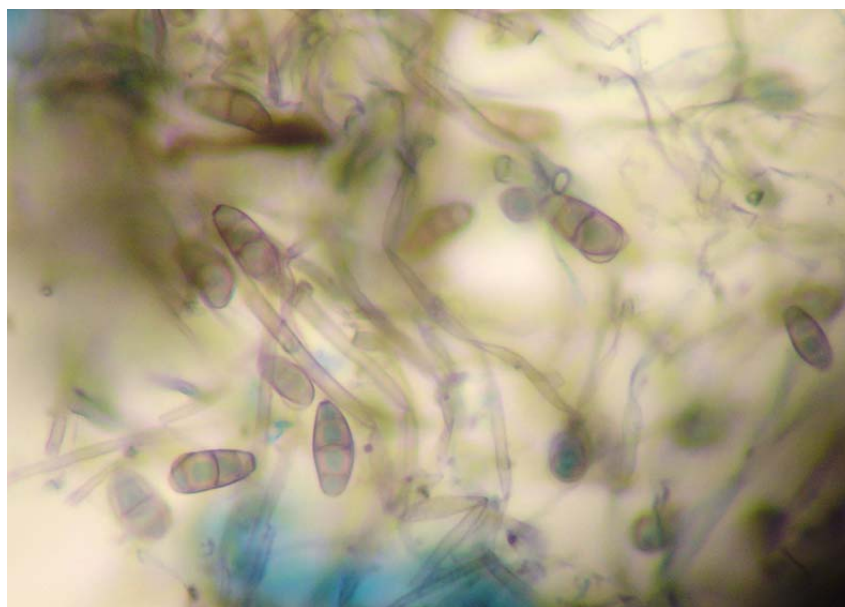
* positive control

Hucca-1	=	เซลล์มะเร็งท่อน้ำดี
KB	=	เซลล์มะเร็งเยื่อช่องปาก
HeLa	=	เซลล์มะเร็งปากมดลูก
MDA-MB231	=	เซลล์มะเร็งเต้านม (hormone-independent)
T47D	=	เซลล์มะเร็งเต้านม (hormone-dependent)
H69AR	=	เซลล์มะเร็งปอด (multidrug resistance)
P388	=	Mouse lymphoid neoplasm
HL-60	=	Human promyelocytic leukemia cell

ข. radicinin มีฤทธิ์ต้าน *Plasmodium falciparum* (94) ต่ำ คือ มี IC_{50} $10^{-6} - 10^{-5}$ M แต่ radicinol ไม่มีฤทธิ์ต้าน *Plasmodium falciparum* (94) คือ มี $IC_{50} > 10^{-5}$ M

การจัดจำแนกราเอนโดไฟท์ Ctom 12

เมื่อเพาะเลี้ยงบน PDA ราเอนโดไฟท์ Ctom 12 สร้างสปอร์ (รูปที่ 21) ที่มีลักษณะเหมือนราในสกุล *Bipolaris* จึงจัดจำแนกราเอนโดไฟท์ Ctom 12 เป็น *Bipolaris* sp.

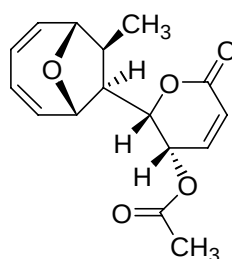


รูปที่ 21 Microscopic morphology ของราเอนโดไฟท์ Ctom 12

การแยกสารบริสุทธิ์จากราเอนโดไฟท์ Hant 25 และ การจัดจำแนกรา

การเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟท์ Hant 25 ใน malt Czapek broth ปริมาตร 5 ลิตร ให้สารสกัดหยาบหนัก 898.7 มก. (สกัดจากน้ำหมักเชื้อด้วย ethyl acetate) เมื่อนำมาแยกให้บริสุทธิ์ ปรากฏว่าแยกได้สารบริสุทธิ์ 3 ชนิด

สารประกอบชนิดที่ 1 เมื่อนำสารสกัดหยาบมาแยกด้วย Sephadex LH-20 column พบว่าแยกได้ผลึกสีขาว จึงแยกผลึกออกมาโดยการตกผลึกซ้ำด้วยตัวทำละลาย MeOH การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารโดยการวิเคราะห์ข้อมูลของ NMR spectrum และ mass spectrum ร่วมกับการเปรียบเทียบข้อมูลที่มีรายงานมาแล้ว พบว่าเป็นสาร epoxycyclooctadiene - δ -lactone หรือ mycoepoxydiene ดังรูปที่ 22 Mycoepoxydiene เป็นเมแทบอไลต์กลุ่มใหม่ของราที่ถูกพบครั้งแรกในปี 1999 (Cai *et al.*, 1999)



รูปที่ 22 โครงสร้างทางเคมีของ mycoepoxydiene

การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่า mycoepoxydiene มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งได้ดี เช่นเดียวกับที่ได้เคยมีรายงานมาก่อนหน้านี้ (Takao *et al.*, 2004)

ก. มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง โดยมีค่า IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) ดังนี้

Cell line	Hucca-1	KB	HeLa	MDA-MB231	T47D	H69AR
Mycoepoxydiene	0.3	2.4	2.1	1.3	2.0	1.6
Etoposide*	5.0	0.5	0.4	0.2	0.05	35.0

Hucca-1 = เซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

KB = เซลล์มะเร็งเยื่อช่องปาก

HeLa = เซลล์มะเร็งปากมดลูก

MDA-MB231 = เซลล์มะเร็งเต้านม (hormone-independent)

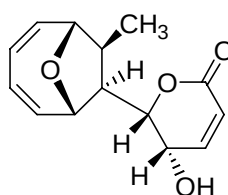
T47D = เซลล์มะเร็งเต้านม (hormone-dependent)

H69AR = เซลล์มะเร็งปอด (multidrug resistance)

ข. เป็นพิษต่อ Vero cell ที่ IC_{50} 4.36 $\mu\text{g/ml}$

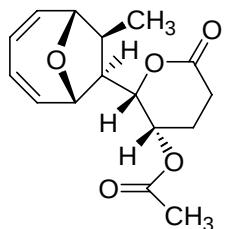
- ค. มีฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค MIC 50 $\mu\text{g/ml}$
- ง. ไม่มีฤทธิ์ต้าน *Candida albicans*, HSV-1, malaria
- จ. ไม่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ

สารประกอบชนิดที่ 2 เป็นของแข็งสีขาว ได้จากการนำส่วนที่เหลือจากการตกผลึกมาแยกด้วย Sephadex LH-20 column จากนั้นนำ Fractions TV₇₋₈ มาแยกด้วย Silica gel column ได้ของแข็งสีขาว จากการวิเคราะห์ข้อมูลของ NMR spectrum, IR spectrum และ mass spectrum พบว่าเป็นสาร 5-hydroxy-6-(8-methyl-9-oxa-bicyclo[4.2.1]nona-2,4-dien-7-yl)-5,6-dihydro-pyran-2-one มีโครงสร้างดังรูปที่ 23 สารนี้



รูปที่ 23 โครงสร้างทางเคมีของ 5-hydroxy-6-(8-methyl-9-oxa-bicyclo[4.2.1]nona-2,4-dien-7-yl)-5,6-dihydro-pyran-2-one

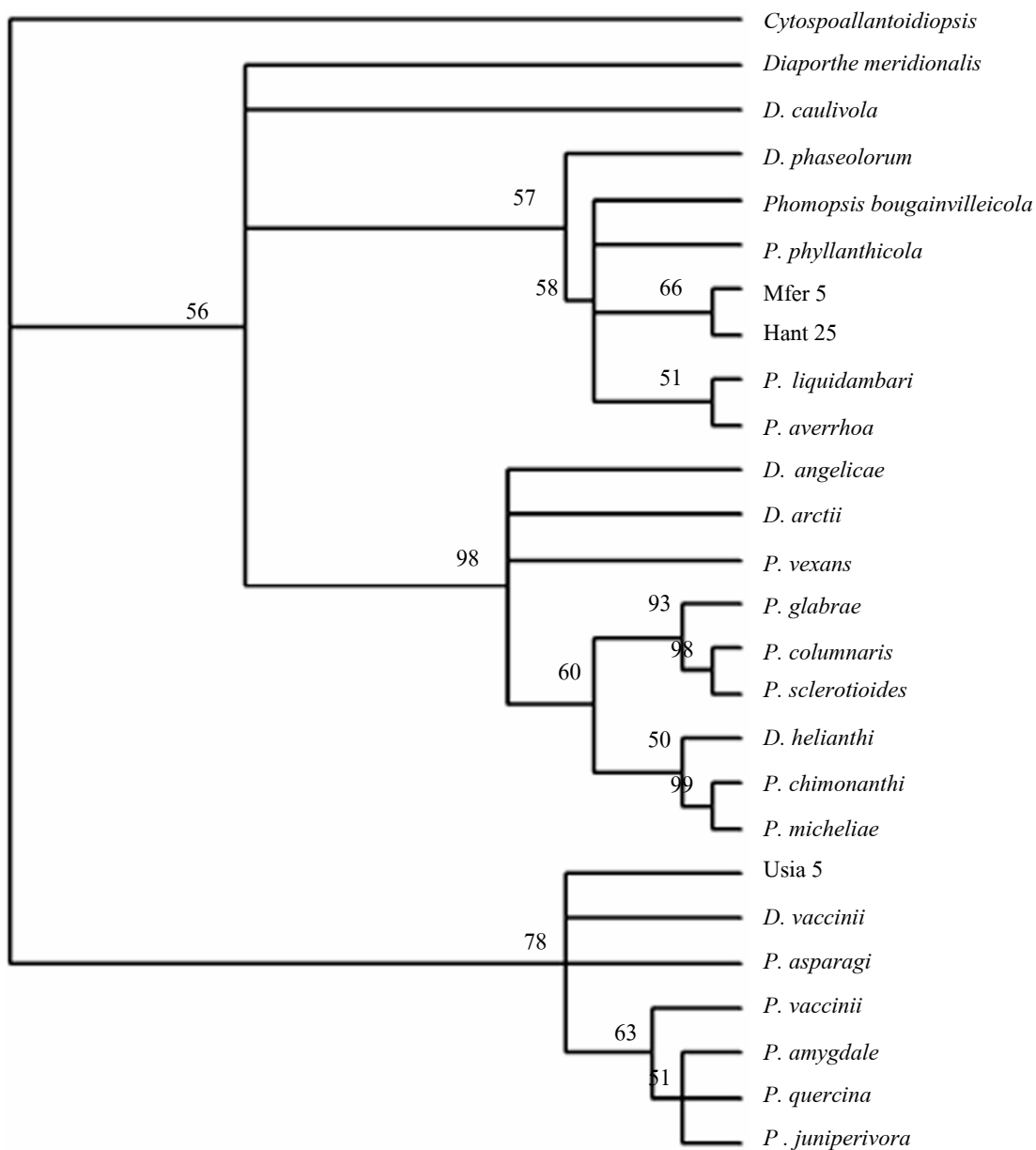
สารประกอบชนิดที่ 3 เมื่อนำส่วนที่เหลือจากการตกผลึกของสารประกอบชนิดที่ 1 มาแยกด้วย Sephadex LH-20 column จากนั้นนำ Fractions TV₇₋₈ มาแยกด้วย Silica gel column ได้ของแข็งสีขาวของสารประกอบชนิดที่ 2 และ fraction F4 ซึ่งนำมาแยกด้วย Silica gel column ได้ผลึกสีขาวของสารประกอบชนิดที่ 3 และเมื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยการวิเคราะห์ข้อมูลของ NMR spectrum และ mass spectrum พบว่าสารประกอบชนิดที่ 3 เป็นอนุพันธ์ของ epoxycyclooctadiene - δ -lactone และมีโครงสร้างดังรูปที่ 24



รูปที่ 24 โครงสร้างทางเคมีของ epoxycyclooctadiene - δ -lactone derivative

การจัดจำแนกราเอนโดไฟท์ Hant 25

เมื่อเพาะเลี้ยงบน banana leaf agar นาน 2 เดือน พบว่าราเอนโดไฟท์ Hant 25 สร้าง pycnidia และ α -conidia ซึ่งเป็นลักษณะของราในสกุล *Phomopsis* เช่นเดียวกับ Usia 5 และ Mfer 5 จากการวิเคราะห์ลำดับ base ของ rRNA gene ในส่วนของ ITS1-5.8S-ITS2 และนำข้อมูลที่ได้ไปสืบค้นข้อมูลของราที่มีลำดับเบสเหมือนกันจากฐานข้อมูลของ GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTN 2.2.15 (Altschul *et al.*, 1997) พบว่า Hant 25 มีลำดับเบสเหมือนราในสกุล *Phomopsis* และ *Diaporthe* ซึ่งเป็น teleomorphs ของ *Phomopsis* เช่นเดียวกับ Usia 5 และ Mfer 5 การศึกษา sequence similarity โดยใช้ ClustalW (1.82) multiple sequence alignment program (Thompson *et al.*, 1994) พบว่าราเอนโดไฟท์ Hant 25 มีลำดับเบสเหมือน Usia 5 และ Mfer 5 เท่ากับ 93 % homology และ 94 % homology ตามลำดับ การศึกษา phylogenetic analysis โดยใช้โปรแกรม PAUP[®] (v 4.0 b10) (Swofford, 2003) และใช้ maximum parsimony algorithm พบว่า Hant 25 อยู่ใน clade เดียวกับ Mfer 5 และมีวิวัฒนาการใกล้เคียงกัน (รูปที่ 25)

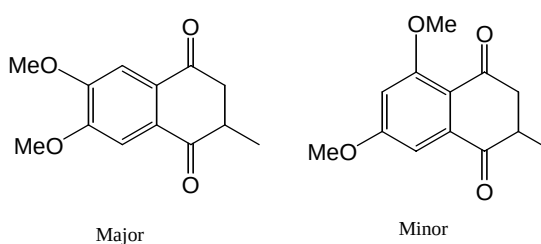


รูปที่ 25 Maximum-parsimony tree (50% majority-rule consensus tree) ซึ่งสร้างจากลำดับเบสของ ITS1-5.8S-ITS2 ของรา 26 taxa (CI=0.6304, RI=0.7267, RC=0.4581, tree length = 230 steps) แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของ Hant 25, Usia 5 และ Mfer 5 กับ reference taxa ตัวเลขที่ internal node คือ เปอร์เซ็นต์ของ tree จากการวิเคราะห์ข้อมูลที่เลือกซ้ำ 1000 ครั้ง (bootstrap replications) *Cytospora allantoidiopsis* เป็น outgroup taxa

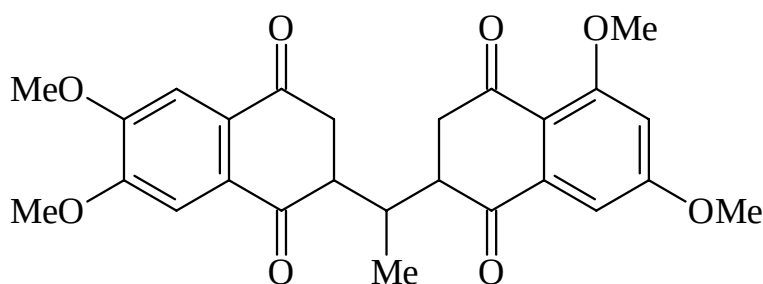
การแยกสารบริสุทธิ์จากราเอนโดไฟท์ Atag 5 และการจัดจำแนก

การเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟท์ Atag 5 ใน malt Czapek broth ปริมาตร 10 ลิตร ให้สารสกัดหยาบ สีนํ้าตาล (สกัดจากนํ้าหมักเชื่อมด้วย dichloromethane) และมีนํ้าหนักแห้งเท่ากับ 1.209 กรัม พบว่าสารสกัดหยาบมีฤทธิ์เป็นพิษต่อ Vero cell และ KB cell แต่ไม่มีฤทธิ์เป็นพิษต่อ BC cell เมื่อนํามาแยกด้วย Sephadex LH-20 column, silica gel column และ RPC-18 HPLC พบว่ามีบาง fraction ที่น่าสนใจ เพราะใน ^1H NMR spectrum แสดงถึงสารจำพวก aromatic compounds หรือ สารที่มี conjugation ซึ่งในขณะนี้แยกได้สารบริสุทธิ์ 7 ชนิด คือ ATAG5-008, ATAG5-018, ATAG5-083, ATAG5-085, ATAG5-110, ATAG5-100 และ ATAG5-092 ขณะนี้กำลังศึกษาสูตรโครงสร้างทางเคมี

สารประกอบชนิดที่ 1 คือ ATAG5-008 จากการศึกษาสูตรโครงสร้างทางเคมี ด้วย 2D NMR พบว่า ใน HMBC spectrum ของ ATAG5-008 บอกลถึงการเชื่อมต่อกันของสาร 2 กลุ่ม ที่เดิมคาดว่าเป็นสารผสม ที่ประกอบด้วยสารที่มีโครงสร้างทางเคมีคล้ายกัน 2 ชนิด ที่มีโครงสร้างทางเคมี ดังนี้



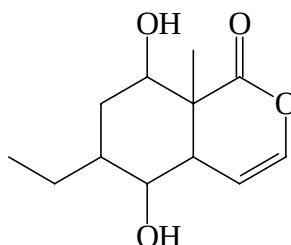
แต่จาก HMBC spectrum และการตรวจสอบด้วย TLC พบว่า ATAG5-008 เป็นสารบริสุทธิ์ จึงคาดว่าจะเป็สารในกลุ่ม quinone ที่มีโครงสร้างทางเคมี ดังรูปที่ 26



รูปที่ 26 โครงสร้างทางเคมีที่คาดของ ATAG5-008

จึงควรศึกษาโครงสร้างทางเคมีของ ATAG5-008 ต่อไปด้วย mass spectrum และพบว่าสารนี้แสดงความเป็นพิษต่อ KB cell โดยมีค่า IC_{50} 11.14 $\mu\text{g/ml}$

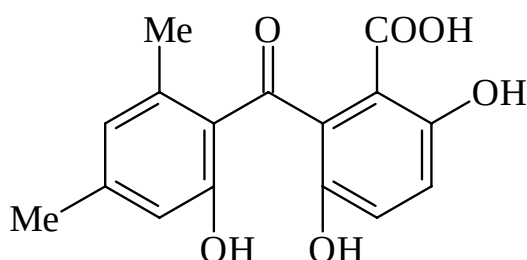
สารประกอบชนิดที่ 2 คือ ATAG5-085 จากการศึกษาสถูตรโครงสร้างทางเคมีของ ATAG5-085 ด้วย NMR พบว่า ATAG5-085 น่าจะเป็นสารในกลุ่ม lactone ที่มีโครงสร้างทางเคมีดังรูปที่ 27 แต่เนื่องจาก ATAG5-085 ที่แยกได้มีปริมาณน้อยมาก จึงต้องแยกให้ได้สารมากขึ้น ซึ่งจะให้สัญญาณที่ปรากฏบน NMR spectra ชัดเจน เพื่อยืนยันถึงความถูกต้องของโครงสร้างดังกล่าว



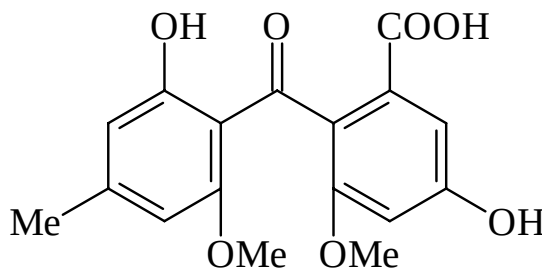
รูปที่ 27 โครงสร้างทางเคมีที่คาดของ ATAG5-085

สารประกอบชนิดที่ 3 คือ ATAG5-018 จากการศึกษาสถูตรโครงสร้างทางเคมีของ ATAG5-018 ด้วย NMR พบว่า ATAG5-018 ซึ่งเป็นผลึกสีขาว น่าจะมีโครงสร้างทางเคมีเป็นสารจำพวก cytochalasin ซึ่งต้องศึกษาต่อไปด้วย 2D NMR และพบว่าสารนี้แสดงความเป็นพิษต่อ KB cell โดยมีค่า IC_{50} 0.13 $\mu\text{g/ml}$

สารประกอบชนิดที่ 4 คือ ATAG5-083 ผลจากการศึกษาสถูตรโครงสร้างทางเคมีของ ATAG5-083 ด้วย NMR คาดว่า ATAG5-083 เป็นสารที่มีโครงสร้างทางเคมีดังรูปที่ 28 ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ rhizoctonic acid (รูปที่ 29) หรือ asperfumin จึงควรศึกษาโครงสร้างทางเคมีต่อไปด้วย mass spectrum Rhizoctonic acid เป็นสารที่แยกได้จากราแอนโดไฟท์เช่นกัน คือ *Rhizoctonia* sp. ซึ่งแยกได้จากใบของ *Cynodon dactylon* (Ma et al., 2004)



รูปที่ 28 โครงสร้างทางเคมีที่คาดของ ATAG5-083



รูปที่ 29 โครงสร้างทางเคมีของ rhizoctonic acid

สารประกอบชนิดที่ 5 คือ ATAG5-110 มีลักษณะเป็นผลึกรูปเข็ม สีไม่มีสี แต่ละลายได้ยากใน dichloromethane และ methanol ขณะนี้กำลังศึกษาสูตรโครงสร้างทางเคมีด้วย NMR

สารประกอบชนิดที่ 6 คือ ATAG5-100 เป็นสารบริสุทธิ์ มีผลึกสีขาว ละลายได้ดีใน dichloromethane ขณะนี้กำลังศึกษาสูตรโครงสร้างทางเคมีด้วย NMR

สารประกอบชนิดที่ 7 คือ ATAG5-092 เป็นสารบริสุทธิ์ มีผลึกสีไม่มีสี ละลายได้ดีใน dichloromethane ขณะนี้กำลังศึกษาสูตรโครงสร้างทางเคมีด้วย 2 D NMR เป็นสารที่มีโครงสร้างทางเคมีน่าสนใจ ขณะนี้ทราบว่ามีการ์บอนในโมเลกุลมากกว่า 15 คาร์บอน สามารถดูดกลืนรังสีอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตรได้

นอกจากสารบริสุทธิ์ทั้ง 7 ชนิดแล้ว ขณะนี้กำลังแยก ATAG5-116 และ ATAG5-117 ให้บริสุทธิ์มากยิ่งขึ้น เนื่องจากสารทั้งสองเป็นอนุพันธ์กัน และมี ^1H NMR spectra ที่น่าสนใจ และแตกต่างไปจาก ^1H NMR spectra ของสารประกอบทั้ง 7 ชนิดที่กล่าวมาข้างต้น ซึ่ง ATAG5-116 และ ATAG5-117 เกือบจะบริสุทธิ์แล้ว สำหรับ ATAG5-112 ขณะนี้กำลังแยกให้บริสุทธิ์มากยิ่งขึ้น เพราะส่วนสกัดนี้มี ^1H NMR spectrum ที่น่าสนใจ และใกล้จะบริสุทธิ์แล้ว

การจัดจำแนกราเอนโดไฟท์ Atag 5

เมื่อเพาะเลี้ยงบน PDA และ banana leaf agar นาน 3 เดือน ปรากฏว่าราเอนโดไฟท์ Atag 5 ไม่สร้างโคนิเดียหรือสปอร์ การวิเคราะห์ลำดับ base ของ rRNA gene ในส่วนของ ITS1-5.8S-ITS2 และนำข้อมูลที่ได้ไปสืบค้นข้อมูลของราที่มีลำดับเบสเหมือนกันจากฐานข้อมูลของ GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTN 2.2.15 (Altschul *et al.*, 1997) พบว่า Atag 5 มีลำดับเบสเหมือนราในวงศ์ Xylariaceae, order Xylariales, class Sordariomycetes, subphylum Pezizomycotina, phylum Ascomycota การศึกษา sequence similarity โดยใช้ ClustalW (1.82)

multiple sequence alignment program (Thompson *et al.*, 1994) พบว่าราเอนโดไฟท์ Atag 5 มีลำดับเบสเหมือน *Xylaria longipes* มากที่สุด คือ 93 % homology

การแยกสารบริสุทธิ์จากราเอนโดไฟท์ Gspe 11 และ การจัดจำแนกรา

การเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟท์ Gspe 11 ใน malt Czapek broth ปริมาตร 10 ลิตร ให้สารสกัดหยาบสีน้ำตาลและมีน้ำหนักแห้งเท่ากับ 2.1944 กรัม (สกัดจากน้ำหมักเชื่อมด้วย dichloromethane) พบว่าสารสกัดหยาบมีฤทธิ์เป็นพิษต่อ KB cell (IC_{50} 1.8 $\mu\text{g/ml}$), BC cell (IC_{50} 1.4 $\mu\text{g/ml}$), NCI-H187 cell (IC_{50} 4.48 $\mu\text{g/ml}$) และ Vero cell (IC_{50} 3.7 $\mu\text{g/ml}$) เมื่อนำมาแยกด้วย Sephadex LH-20 column, silica gel column และ RPC-18 HPLC พบว่ามีบาง fraction ที่น่าสนใจ เพราะใน ^1H NMR spectrum แสดงถึงสารจำพวก aromatic compounds หรือสารที่มี conjugation จึงได้นำมาศึกษาสูตรโครงสร้างทางเคมีด้วย NMR ซึ่งแยกได้สารบริสุทธิ์ 3 ชนิด คือ GSPE11-112, GSPE11-113 และ GSPE11-092 ขณะนี้กำลังทำ ^{13}C NMR spectra

นอกจากสารบริสุทธิ์ 3 ชนิดที่แยกได้แล้ว ขณะนี้กำลังแยก GSPE11-110 ให้บริสุทธิ์มากยิ่งขึ้น เพราะส่วนสกัดนี้มี ^1H NMR spectrum ที่น่าสนใจ และใกล้จะบริสุทธิ์แล้ว

การจัดจำแนกราเอนโดไฟท์ Gspe 11

เมื่อเพาะเลี้ยงบน PDA และ banana leaf agar นาน 3 เดือน ปรากฏว่าราเอนโดไฟท์ Gspe 11 ไม่สร้างโคนิเดียหรือสปอร์ การวิเคราะห์ลำดับ base ของ rRNA gene ในส่วนของ ITS1-5.8S-ITS2 และนำข้อมูลที่ได้ไปสืบค้นข้อมูลของราที่มีลำดับเบสเหมือนกันจากฐานข้อมูลของ GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTN 2.2.15 (Altschul *et al.*, 1997) พบว่า Gspe 11 มีลำดับเบสเหมือนราในสกุล *Eutypella* วงศ์ Diatrypaceae, order Xylariales, class Sordariomycetes, subphylum Pezizomycotina, phylum Ascomycota การศึกษา sequence similarity โดยใช้ ClustalW (1.82) multiple sequence alignment program (Thompson *et al.*, 1994) พบว่าราเอนโดไฟท์ Gspe11 มีลำดับเบสเหมือน *Eutypella scoparia* และ *Eutypella alsophila* มากที่สุด คือ 94 % homology

จะเห็นได้ว่าราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากพืชสมุนไพรไทยมีทั้งราในกลุ่ม Ascomycetes และ Deuteromycetes เช่นเดียวกับที่ได้เคยมีรายงานว่าราเอนโดไฟท์ส่วนใหญ่เป็นราในกลุ่ม Ascomycetes และ Fungi imperfecti (Petrini, 1991) ราเอนโดไฟท์หลายชนิดที่ศึกษาในโครงการนี้เป็นราในสกุลเดียวกับราก่อโรคพืช ได้แก่ *Phomopsis* sp. (Janse van Rensburg *et al.*, 2006), *Bipolaris* sp. (Nakajima *et al.*, 1997), *Fusarium* sp. (Ohara and Tsuge, 2004), *Fusicoccum* sp. (Bunney *et al.*, 2003) ผลที่ได้นี้แสดงว่าราก่อโรคพืชหลายชนิดที่อาศัยอยู่ในพืชเป็นเวลานาน อาจมีวิวัฒนาการเพื่อความอยู่รอด กลายเป็นราเอนโดไฟท์ซึ่งอาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อโดยไม่ก่อโรค

ข้อสรุปของการศึกษาวิจัย

ได้คัดเลือกราเอนโดไฟท์จากข้อมูลฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งของราเอนโดไฟท์ที่ศึกษาในโครงการก่อนหน้านี้ รวมทั้งราเอนโดไฟท์ที่ได้แยกใหม่ มาเพาะเลี้ยง 23 isolates เพื่อเตรียมสารสกัดหยาบ และนำมาศึกษา proton NMR พบว่ามีราเอนโดไฟท์ที่น่าสนใจนำมาเพาะเลี้ยงเพื่อแยกสารบริสุทธิ์ทั้งหมด 7 isolates ดังนี้

Lrub 20 เป็นราที่แยกได้จากกระดังงาใบดอกแดง (*Leea rubra* Blume ex Spreng.) และจากการจัดจำแนกเชื้อ โดยอาศัย microscopic morphology และข้อมูลลำดับเบสของ 18S RNA gene และส่วน ITS ของ rRNA gene พบว่าเป็น mitosporic fungus ใน class Dothideomycetes et Chaetothyriomycetes incertae sedis, subphylum Pezizomycotina, phylum Ascomycota ในการศึกษาสามารถแยกสารบริสุทธิ์จากน้ำหมักเชื้อได้ 3 ชนิด คือ asteric acid มีฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค (MIC 200 $\mu\text{g/ml}$) และสารที่เคยมีรายงานว่าได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี แต่ไม่เคยมีรายงานว่าเป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ 2 ชนิด คือ 2-hydroxymethyl-3-methyl-cyclopent-2-enone มีฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค (MIC 200 $\mu\text{g/ml}$) และ 2-hydroxymethyl-3-methyl-cyclopentanone ผลงานวิจัยที่ได้นี้ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่ใน Journal of Natural Products 2006, 69 (9): 1351-1353

Phomopsis sp. Usia 5 เป็นราที่แยกได้จากเสน (*Urobotrya siamensis* Hiepko) ราชนิดนี้สร้างสาร 3-nitropropionic acid มีฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค (MIC 0.39 $\mu\text{g/ml}$) ผลงานวิจัยที่ได้นี้ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่ใน Journal of Natural Products 2005, 68 (7): 1103–1105 และสร้างสารบริสุทธิ์ U5C-634 ซึ่งจะต้องศึกษาหาสูตรโครงสร้างต่อไป สารนี้มีฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค (MIC 3.125 $\mu\text{g/ml}$) และแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งหลายชนิด

Phomopsis sp. Mfer 5 เป็นราที่แยกได้จากบุนนาค (*Mesua ferrea* Linn. ราชนิดนี้สร้างสาร 3-nitropropionic acid เช่นกัน นอกจากนี้ ยังพบ 3-nitropropionic acid จากรา *Fusicoccum* sp. Gell 14, *Diaporthe* sp. Grsp 11, *Phomopsis* sp. Grsp 19, *Phomopsis* sp. Rlyi 1 และ *Fusarium* sp. Tasp 15

Biporalis sp. Ctom 12 เป็นราที่แยกได้จากเคด [*Catunaregam tomentosa* (Bl. Ex DC.) Tirveng] ราชนิดนี้สร้างสาร radicinin ซึ่งมีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งหลายชนิด และ radicinol

Phomopsis sp. Hant 25 เป็นราที่แยกได้จากกระเบาใหญ่ (*Hydnocarpus anthelminthicus* Pierre) ราชนิดนี้สร้างสาร mycoepoxydiene ซึ่งแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งหลายชนิด สาร 5-hydroxy-6-(8-methyl-9-oxa-bicyclo[4.2.1]nona-2,4-dien-7-yl)-5,6-dihydro-pyran-2-one ซึ่งเป็นสารที่เคยมีรายงานว่าได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี แต่ไม่เคยมีรายงานว่าเป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ และสารที่เป็นอนุพันธ์ของ mycoepoxydiene ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน

Atag 5 เป็นราที่แยกได้จากกระเช้าฝีมด (*Aristolochia tagala* Cham.) ราชนิดนี้เป็น mycelia sterilia คือไม่สร้างสปอร์ และจากการจัดจำแนกเชื้อ โดยอาศัยข้อมูลลำดับเบสของส่วน ITS ของ

rRNA gene พบว่าเป็นราในวงศ์ Xylariaceae, order Xylariales, class Sordariomycetes, subphylum Pezizomycotina, phylum Ascomycota ราชนิดนี้สร้างสารหลายชนิด ได้แก่ ATAG5-008 ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม quinones และแสดงความเป็นพิษต่อ KB cell (IC_{50} 11.14 $\mu\text{g/ml}$), ATAG5-085 ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม lactones, ATAG5-018 ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม cytochalasins และแสดงความเป็นพิษต่อ KB cell (IC_{50} 0.13 $\mu\text{g/ml}$), ATAG5-083 ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ rhizoctonic acid, ATAG5-110, ATAG5-100 และ ATAG5-092 ซึ่งจะต้องทำการศึกษาคือเพื่อยืนยันสูตรโครงสร้างที่แน่นอนของสารเหล่านี้

Gspe 11 เป็นราที่แยกได้จากพุทธรักษา (*Gardenia* sp.) ราชนิดนี้เป็น mycelia sterilia คือไม่สร้างสปอร์ และจากการจัดจำแนกเชื้อโดยอาศัยข้อมูลลำดับเบสของส่วน ITS ของ rRNA gene พบว่าเป็นราในวงศ์ Diatrypaceae, order Xylariales, class Sordariomycetes, subphylum Pezizomycotina, phylum Ascomycota สารสกัดหยาบที่ได้จากน้ำหมักเชื้อแสดงความเป็นพิษต่อ KB cell (IC_{50} 1.8 $\mu\text{g/ml}$), BC cell (IC_{50} 1.4 $\mu\text{g/ml}$), NCI-H187 cell (IC_{50} 4.48 $\mu\text{g/ml}$) และ Vero cell (IC_{50} 3.7 $\mu\text{g/ml}$) เมื่อนำมาแยกให้บริสุทธิ์ ปรากฏว่าแยกได้สารบริสุทธิ์ 3 ชนิด ซึ่งอยู่ในระหว่างการศึกษาคือโครงสร้าง

โดยสรุป ราเอนโดไฟท์จากพืชสมุนไพรที่คัดเลือกมาศึกษาในโครงการนี้เป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย สารที่แยกได้มีทั้งสารที่เคยรายงานมาก่อนแล้วว่าเป็นเมแทบอไลต์ทุติยภูมิของรา สารที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี แต่ไม่เคยรายงานว่าเป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ และเป็นสารที่คาดว่าเป็นสารใหม่

เอกสารอ้างอิง

- Altschul S. F., Madden T.L., Schaffer A. A., Zhang J., Miller W., and Lipman D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402.
- Bray F., Sankila R., Ferlay J., and Parkin D. M. 2002. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 1995. *Eur. J. Cancer* **38**: 99-166.
- Bunney T. D., De Boer A. H., and Levin M. 2003. Fusicoccin signaling reveals 14-3-3 protein function as a novel step in left-right patterning during amphibian embryogenesis. *Development* **130**: 4847-4857.
- Cai P., McPhail A. T., Krainer E., Katz B., Pearce C., Boros C., Caceres B., Smith D., and Houck D. R. 1999. Mycoepoxydiene represents a novel class of fungal metabolites. *Tetrahedron Lett.* **40**: 1479-1482.
- Cho E. S., Won Y. C., Lee S. Y., Lee B. Y., Shin D. M., and Chung Y. K. 2004. Syntheses, characterization, and olefin polymerizations of methylene-bridged 1,3-dimethylcyclopentadienyl/indenyl and 1,3-dimethylcyclopentadienyl/tetrahydroindenyl zirconium complexes. *Inorganica Chimica Acta.* **357**: 2301-2308.
- Curtis R. F., Hassall C. H., Jones D. W., and Williams T. W. 1960. The biosynthesis of phenols. II. Asteric acid, a metabolic product of *Aspergillus terreus*. *Thom. J. Chem. Soc.* :4836–4842.
- Esfandiari A., Soifyoudine D., and Paturneau-Jouas M. 1997. Inhibition of fatty acid beta-oxidation in rat brain cultured astrocytes exposed to the neurotoxin 3-nitropropionic acid. *Dev. Neurosci.* **19**: 312-320.
- Eyberger A. L., Dondapati R., and Porter J. R. 2006. Endophyte fungal isolates from *Podophyllum peltatum* produce podophyllotoxin. *J. Nat. Prod.* **69**: 1121-1124.
- Huang Y., Wang J., Zheng Z., and Su W. 2001. Antitumor and antifungal activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical plants. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **31**: 163-167.
- Ishii T., Hayashi K., Hida T., Yamamoto Y., and Nozaki Y. 2000. TAN-1813, a novel Ras-farnesyltransferase inhibitor produced by *Phoma* sp. taxonomy, fermentation, isolation and biological activities in vitro and in vivo. *J. Antibiot. (Tokyo)* **53**: 765-778.
- Janse van Rensburg J. C., Lamprecht S. C., Groenewald J. Z., Castlebury L. A., and Crous P. W. 2006. Characterisation of *Phomopsis* spp. associated with die-back of rooibos (*Aspalathus*

- linearis*) in South Africa. *Studies Mycol.* **55**: 65-74.
- Jayasuriya H., Bills G.F., Cascales C., Zink D.L., Goetz M.A., Jenkins R.G., Silverman K.C., Lingham R.B., and Singh, S.B. 1996. Oreganic acid: a potent novel inhibitor of ras farnesyl-protein transferase from an endophytic fungus. *Bioorg. Med. Chem. Letters* **6**: 2081-2084.
- Lee H. J., Lee J. H., Hwang B. Y., Kim H. S., and Lee J. J. 2002. Fungal metabolites, asterriic acid derivatives inhibit vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced tube formation of HUVECs. *J Antibiot. (Tokyo)* **55**: 552-6.
- Ma Y. M., Li Y., Liu J. Y., Song Y. C., and Tan R. X. 2004. Anti-*Helicobacter pylori* metabolites from *Rhizoctonia* sp. Cy064, an endophytic fungus in *Cynodon dactylon*. *Fitoterapia*. **75**: 451-456.
- Nakajima H., Ishida T., Otsuka Y., Hamasaki T., and Ichinoe M. 1997. Phytotoxins and related metabolites produced by *Bipolaris coicis*, the pathogen of Job's tears. *Phytochemistry* **45**: 41-45.
- Ohara T., and Tsuge T. 2004. *FoSTUA*, encoding a basic helix-loop-helix protein, differentially regulates development of three kinds of asexual spores, macroconidia, microconidia, and chlamydospores, in the fungal plant pathogen *Fusarium oxysporum*. *Eukaryot Cell* **3**: 1412-1422.
- Ohashi H., Akiyama H., Nishikori K., and Mochizuki J. 1992. Asterriic acid, a new endothelin binding inhibitor. *J. Antibiotics*. **45**: 1684-1685.
- Petrini O. 1991. Fungal endophytes of tree leaves. In *Microbial ecology of leaves. Edited by J. H. Andrews and S. S. Hirano*. Springer-Verlag, New York. pp. 179-197.
- Pinkerton R. and Strobel G. 1976. Serinol as an activator of toxin production in attenuated cultures of *H. sacchari*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **73**: 4007-4011.
- Pisani P., Parkin D. M., Bray F., and Ferlay J. 1999. Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. *Int. J. Cancer* **83**: 870-873.
- Puri S. C., Verma V., Amna T., Qazi G. N., and Spiteller M. 2005. An endophytic fungus from *Nothapodytes foetida* that produces camptothecin. *J. Nat. Prod.* **68**: 1717-1719.
- Puri S. C., Nazir A., Chawla R., Arora R., Riyaz-ul-Hasan S., Amna T., et al. 2006. The endophytic fungus *Trametes hirsuta* as a novel alternative source of podophyllotoxin and related aryl tetralin lignans. *J. Biotech.* **122**: 494-510.

- Robeson D. J., Gray G. R., and Strobel G. A. 1982. Production of the phytotoxins radicinin and radicinol by *Alternaria chrysanthemi*. *Phytochemistry*. **21**: 2359-2362.
- Schulz B., Sucker J., Aust H. J., Krohn K., Ludewig K., Jones P.G., and Doring D. 1995. Biologically active secondary metabolites of endophytic *Pezizula* species. *Mycol. Res.* **99**: 1007-1015.
- Stierle A.A., Stierle D.B., and Bugni T. 1999. Sequoiatones A and B: novel antitumor metabolites isolated from a redwood endophyte. *J. Org. Chem.* **64**: 5479-5484.
- Stierle D. B., Stierle A. A., and Bugni T. 2003. Sequoiamonascins a-d: novel anticancer metabolites isolated from a redwood endophyte. *J. Org. Chem* **68**: 4966-4969.
- Stierle A., Strobel G., Stierle D., Grothaus P., and Bignami G. 1995. The search for a taxol-producing microorganism among the endophytic fungi of the pacific yew, *Taxus brevifolia*. *J. Nat. Prod.* **58**: 1315-1324.
- Strobel G., Torczynski R., and Bollon A. 1997. *Acremonium* sp. a leucinostatin A producing endophyte of European yew (*Taxus baccata*). *Plant Science* **128**:97-108.
- Sutton, B.C. 1980. *The Coelomycetes: Fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stroma*. Surrey: Commonwealth Mycological Institute.
- Swofford D. L. 2003. *Phylogenetic Analysis Using Parsimony (PAUP)*. Version 4. Sinauer Associates. Sunderland. MA.
- Takao K., Yasui H., Yamamoto S., Sasaki D., Kawasaki S., Watanabe G., and Tadano K. 2004. Asymmetric total syntheses of (+)-mycoepoxydiene and related natural product (-)-1893A: application of one-pot ring-opening/cross/ring-closing metathesis to construct their 9 oxabicyclo[4.2.1]nona-2,4-diene skeleton. *J. Org. Chem.* **69**: 8789-8795.
- Tan R.X. and Zou W.X. 2001. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Nat. Prod. Rep.* **18**: 448-459.
- Tal B., Robeson D. J., Burke B. A., and Aasen A. J. 1985. Phytotoxins from *Alternaria helianthi*. I: radicinin and the structures of deoxyradicinol and radianthin. *Phytochemistry* **24**: 729-731.
- Thompson J. D., Gibson T. J., Plewniak F., Jeanmougin F., and Higgins D.G. 1994. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **24**: 4876-4882.
- Valley A. W., and Balmer, C. M. 1999. Cancer treatment and chemotherapy. *In Pharmacotherapy, a pathophysiologic approach*, 4th ed. Edited by J. T. DiPiro, R. L. Talbert, G. C. Yee, G. R.

- Matzke, B. G. Wells, and L. M. Posey. Appleton&Lange, Stamford, Connecticut. pp. 1957-2012.
- Vatanasapt V., Sriamporn S., and Vatasapt P. 2002. Cancer control in Thailand. *Jpn. J. Clin. Oncol.* **32(Suppl. 1)**: S82-S91.
- Wagenaar M. M., Corwin J., Strobel G., and Clardy J. 2000. Three new cytochalasins produced by an endophytic fungus in the Genus *Rhinocladiella* J. Nat. Product. **63**: 1692-1695.
- White T. J., Bruns T., Lee S., and Taylor, J.W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA gene for phylogenetics. *In* PCR Protocols: a guide to method and applications. *Edited by* M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, and T.J. White. Academic Press, London. pp. 315-322.
- Wiyakrutta S., Sriubolmas N., Panphut W., Thongon N., Danwisetkanjana K., Reungrungsi N., and Meevootisom V. 2004 Bioactive endophytic fungi isolated from Thai medicinal plants. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 265-272.

ภาคผนวก

อาหารเพาะเชื้อ

1. Yeast Extract Sucrose (YES)

Yeast extract	20 g
Sucrose	150 g
Distilled water up to	1 L

2. Malt Czapek Broth (MCz)

Czapek stock solution A	50 ml
Czapek stock solution B	50 ml
Sucrose	30 g
Malt Extract	40 g
Distilled water up to	1 L

Czapek stock solution A

NaNO_3	4.0 g
KCL	1.0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.0 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.02 g
Dissolved in distilled water up to	100 ml

Czapek stock solution B

K_2HPO_4	2.0 g
A solution	1.0 ml
B solution	1.0 ml
Dissolved in distilled water up to	100 ml

A solution

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.0 g
Dissolved in distilled water up to	100 ml

B solution

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.0 g
Dissolved in distilled water up to	100 ml

3. MID Medium (Pinkerton and Strobel, 1976)

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	1.2 mM
KNO_3	0.79 mM
KCl	0.87 mM
MgSO_4	3.0 mM
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.007 mM
FeCl_3	0.0074 mM
MnSO_4	0.03 mM
$\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.0087 mM
H_3BO_3	0.0022 mM
KI	0.0045 mM
Sucrose	87.6 mM
Ammonium Tartrate	27.1 mM
Yeast Extract	0.5 g
Soytone	1.0 g
Distilled water up to	1 L
pH = 5.5 with 1 N HCl	

Output ที่ได้จากโครงการ

1. ผลงานที่ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่

1.1 Chomcheon P., Wiyakrutta S., Sriubolmas N., Ngamrojanavanich N., Isarangkul D., and Kittakoop P. 2005. 3-Nitropropionic acid (3-NPA), a potent antimycobacterial agent from endophytic fungi: Is 3-NPA in some plants produced by endophytes? J. Nat. Prod. 68 (7): 1103–1105.

1.2 Chomcheon P., Sriubolmas N., Wiyakrutta S., Ngamrojanavanich N., Chaichit N., Mahidol C., Ruchirawat S., and Kittakoop P. 2006. Cyclopentenones, Scaffolds for Organic Syntheses Produced by the Endophytic Fungus *Mitosporic Dothideomycete* sp. LRUB20. J. Nat. Prod. 69 (9): 1351-1353.

2. การผลิตบัณฑิต

ทุนวิจัยนี้ได้มีส่วนช่วยในการทำวิจัยในส่วนของวิทยานิพนธ์ของนิสิตปริญญาโท 2 คน

ภาคผนวก

3-Nitropropionic Acid (3-NPA), a Potent Antimycobacterial Agent from Endophytic Fungi: Is 3-NPA in Some Plants Produced by Endophytes?

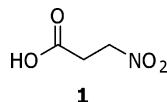
Porntep Chomcheon,[†] Suthep Wiyakrutta,[‡] Nongluksna Sriubolmas,[§] Nattaya Ngamrojanavanich,[†] Duangnate Isarangkul,[⊥] and Prasat Kittakoop^{*,||}

Program of Biotechnology and Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Thailand, Department of Microbiology, Faculty of Science, Mahidol University, Thailand, Department of Microbiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Thailand, Center for Biotechnology, Institute of Science and Technology for Research and Development, Mahidol University, Thailand, and National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), Thailand Science Park, 113 Paholyothin Road, Klong 1, Klong Luang, Pathumthani, 12120, Thailand

Received January 31, 2005

3-Nitropropionic acid (3-NPA, **1**) was found in extracts of several strains of endophytic fungi. 3-NPA (**1**) exhibited potent antimycobacterial activity with the minimum inhibition concentration of 3.3 μ M, but was inactive against NCI-H187, BC, KB, and Vero cell lines. Endophytes were found to produce high levels of 3-NPA (**1**), and therefore 3-NPA (**1**) accumulated in certain plants may be produced by the associated endophytes. 3-NPA (**1**) may be used as a chemotaxonomic marker for endophytic fungi. The structure of 3-hydroxypropionic acid, a nematicidal agent, should be revised to 3-NPA (**1**).

Endophytic fungi are rich sources of bioactive compounds,^{1–3} and recently several novel bioactive substances have been isolated from these microorganisms.^{4–8} We have isolated a number of endophytic fungi from Thai medicinal plants and evaluated biological activities of fungal crude extracts. Consistently, crude extracts of many strains of endophytic fungi exhibited antimycobacterial activity. Chemical exploration of those active crude extracts led to the identification of 3-nitropropionic acid (3-NPA, **1**) as a potent antimycobacterial agent.



3-NPA (**1**) was obtained from a broth extract of *Phomopsis* sp. strain usia5 after purification with Sephadex LH-20, with a yield of 178 mg/L culture medium. 3-NPA (**1**) was characterized by analyses of its spectroscopic data, as well as by comparison of data with those of an authentic sample (Sigma). ¹H NMR analysis of fungal crude extracts revealed that there were seven strains of the isolated endophytes capable of producing 3-NPA (**1**) (Table 1). 3-NPA (**1**) has been widely found in plants^{9–14} and some fungi.^{15,16} However, in the present work, since endophytic fungi excreted high levels (up to 178 mg/L) of 3-NPA (**1**) to their culture media, the question has been raised on the origin of 3-NPA (**1**) accumulated in plants. Interestingly, a previous report showed that only one from six and eight species of the respective plant genus *Astragalus* (*A. falcatus*) and *Coronilla* (*C. viminalis*) contained 3-NPA (**1**), while three from six species of the genus *Lotus* (*L. angustissimus*, *L. pedunculatus*, and *L. uliginosus*) possessed 3-NPA (**1**), as shown in Table 2.¹¹ Normally, if a particular secondary

metabolite is found in a plant species, it should be found in most or all of those plant genus, e.g., the presence of 3-NPA (**1**) in the genus *Hippocrepis*, *Scorpiurus*, and *Securigera* (Table 2). Further, it is well recognized that certain secondary metabolites may be employed as chemotaxonomic markers in particular plant genera.^{17–19} Therefore, there is a question on the origin of 3-NPA (**1**) in *A. falcatus* and *C. viminalis*, the only 3-NPA-producing species in the respective genera *Astragalus* and *Coronilla* (Table 2). It is possible that 3-NPA (**1**) accumulated in *A. falcatus* and *C. viminalis* may not originate from these plants, but may be produced by associated endophytes. In contrast, 3-NPA (**1**) should be a plant metabolite of the genera *Hippocrepis*, *Scorpiurus*, and *Securigera* (Table 2). Studies on the interaction and correlation between plant hosts and endophytes regarding the production of 3-NPA (**1**) need to be pursued. Furthermore, 3-NPA (**1**) has recently been found to be significantly involved in nitrification processes in leguminous plants.¹¹ As endophytes are able to produce high levels of 3-NPA (**1**), endophytic fungi may also participate in the nitrification process of the nitrogen cycle.

Recently, Schwarz et al. reported 3-hydroxypropionic acid as a nematicidal principle in endophytic fungi and also reported that several strains of endophytes could produce 3-hydroxypropionic acid.²⁰ However, comparison of ¹H and ¹³C NMR data²⁰ with those of 3-NPA (**1**) showed that the structure of the claimed nematicidal agent, 3-hydroxypropionic acid, is more likely to be 3-NPA (**1**). Although 3-NPA (**1**) is found in plants^{9–14} and some fungi,^{15,16} there have been no reports on the production of **1** by fungi of endophytic origin. During 1999–2004, in addition to our chemical investigation of many types of fungi (insect pathogenic, seed, wood-decaying, and marine fungi),²¹ the ¹H NMR screening of more than two hundred fungal crude extracts showed that only a few strains of seed fungi (another plant-associated fungi) produced 3-NPA (**1**). The presence of 3-NPA (**1**) in many strains of fungal endophytes reported here (Table 1), together with the previous data on the existence of 3-NPA (mistakenly described as 3-hydroxypropionic acid) in several strains of endophytic fungi, *Phomopsis phaseoli* and *Melanconium betulinum*,²⁰ suggested

* To whom correspondence should be addressed. Tel: +66-1-8298788. Fax: +66-2-5646707. E-mail: prasat@biotec.or.th.

[†] Program of Biotechnology and Department of Chemistry, Chulalongkorn University.

[‡] Department of Microbiology, Mahidol University.

[§] Department of Microbiology, Chulalongkorn University.

[⊥] Center for Biotechnology, Mahidol University.

^{||} National Center for Genetic Engineering and Biotechnology.

Table 1. Strains of 3-NPA-Producing Endophytes and Plant Hosts

fungal strains and hosts	location of plant collection
<i>Phomopsis</i> sp. usia5 from leaf of <i>Urobotrya siamensis</i> (Opiliaceae)	Nakhonrachasima Province, Thailand
Unidentified fungal strain grsp11 from twig of <i>Grewia</i> sp. (Tiliaceae)	Pitsanulok Province, Thailand
Unidentified fungal strain grsp19 from twig of <i>Grewia</i> sp. (Tiliaceae)	Pitsanulok Province, Thailand
<i>Phomopsis</i> sp. mfer5 from twig of <i>Mesua ferrea</i> (Guttiferae)	Chiangmai Province, Thailand
unidentified fungal strain rlyi1 from twig of <i>Rhododendron lyi</i> (Ericaceae)	Pitsanulok Province, Thailand
unidentified fungal strain tasp15 from twig of <i>Tadehagi</i> sp. (Leguminosae)	Pitsanulok Province, Thailand
unidentified fungal strain gell14 from twig of <i>Gmelina elliptica</i> (Labiateae)	Pitsanulok Province, Thailand

Table 2. Occurrence of 3-NPA in Legumes¹¹

species	3-NPA ($\mu\text{mol/g}$), $n = 3$
<i>Astragalus alpinus</i>	0
<i>A. cicer</i>	0
<i>A. danicus</i>	0
<i>A. falcatus</i>	69.8 (± 2.6)
<i>A. lusitanicus</i>	0
<i>A. mexicanus</i>	0
<i>Coronilla coronata</i>	0
<i>C. juncea</i>	0
<i>C. minima</i>	0
<i>C. scorpioides</i>	0
<i>C. vaginalis</i>	0
<i>C. valentina</i>	0
<i>C. valentina glauca</i>	0
<i>C. viminalis</i>	38.5 (± 1.8)
<i>Hippocrepis balearica</i>	24.7 (± 4.2)
<i>H. comosa</i>	142.0 (± 7.5)
<i>H. emerus emerus</i>	60.8 (± 3.3)
<i>H. unisiliquosa</i>	61.5 (± 5.7)
<i>Lotus alpinus</i>	0
<i>L. angustissimus</i>	6.9 (± 0.6)
<i>L. corniculatus</i>	0
<i>L. creticus</i>	0
<i>L. edulis</i>	0
<i>L. pedunculatus</i>	13.8 (± 2.2)
<i>L. tenuis</i>	0
<i>L. tetragonolobus</i>	0
<i>L. uliginosus</i>	63.3 (± 4.0)
<i>Onobrychis arenaria</i>	0
<i>O. montana</i>	0
<i>Oxytropis campestris</i>	0
<i>O. gaudinii</i>	0
<i>O. jacquinii</i>	0
<i>Scorpiurus muricatus</i>	9.4 (± 0.6)
<i>S. vermiculatus</i>	18.0 (± 0.9)
<i>Securigera orientalis</i>	22.3 (± 0.8)
<i>S. parviflora</i>	47.4 (± 12.4)
<i>S. securidaca</i>	41.9 (± 1.7)
<i>S. varia</i>	85.9 (± 6.3)

that 3-NPA (**1**) may be used as a chemotaxonomic marker for endophytic fungi. In the present work, two *Phomopsis* strains, usia5 and mfer5, were 3-NPA-producing endophytes (Table 1); however other fungal strains could not be taxonomically identified.

3-NPA (**1**) exhibited potent antimycobacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra with the minimum inhibition concentration (MIC) value of 3.3 μM . 3-NPA (**1**) at 167.9 μM was inactive against NCI-H187 (small-cell lung cancer), BC (breast cancer), and KB (oral cavity cancer) cell lines. 3-NPA (**1**) was also inactive (at 419.8 μM) toward the Vero cell line. 3-NPA (**1**) is a known inhibitor of the mitochondrial enzyme succinate dehydrogenase (a part of complex II), which links the tricarboxylic acid cycle to the respiratory electron transport chain, and its toxicity has gained acceptance as an animal model of Huntington's disease.^{22–25} The mode of action of 3-NPA (**1**) for antimycobacterial activity may be related to the inhibition of mycobacterial succinate dehydrogenase. Recent proteomic studies of *M. tuberculosis* revealed the presence of a succinate-semialdehyde dehydrogenase gene in the bacterium,²⁶ and therefore 3-NPA (**1**) could be a potential

lead chemotype for this enzyme target. It should be noted that 3-NPA (**1**) has been known as a potent neurotoxic agent.²⁷

Experimental Section

General Experimental Procedures. NMR experiments were carried out on a Bruker DRX 400 NMR spectrometer, operating at 400 MHz for proton and 100 MHz for carbon. The ESITOFMS were obtained using a Micromass LCT mass spectrometer, and the lock mass calibration was applied for determination of the accurate masses.²⁸

Isolation of Endophytic Fungi. Healthy leaves and twigs were collected from six species of Thai medicinal plants (*Urobotrya siamensis*, *Grewia* sp., *Mesua ferrea*, *Rhododendron lyi*, *Tadehagi* sp., and *Gmelina elliptica*) in the forest areas of Chiangmai, Nakhonrachasima, and Pitsanulok Provinces of Thailand. Plant samples were cleaned under running tap water and then air-dried. Before surface-sterilization, the cleaned twigs were cut into pieces 5 cm long. Leaf and twig fragments were surface-sterilized as described by Schulz and co-workers²⁹ with some modifications. Plant fragments were sequentially immersed in 70% EtOH for 1 min, 5% NaOCl solution for 5 min, and sterile distilled H₂O for 1 min (two times). The surface-sterilized leaf and twig fragments were cut into small pieces using a sterile blade and placed on sterile water agar plates for further incubation at 30 °C. The hyphal tip of the endophytic fungus growing out from the plant tissue was cut by a sterile pasture pipet and transferred onto a sterile potato dextrose agar (PDA) plate. After incubation at 30 °C for 7–14 days, culture purity was determined from colony morphology.

Identification of Endophytic Fungi. Endophytic fungus isolates mfer5 and usia5 were identified on the basis of both morphology of fungi grown on banana leaf agar at 25 °C for 1–2 months and analysis of the DNA sequences of the ITS region of ribosomal RNA gene. Total DNA was extracted from fungal mycelia grown in potato dextrose broth. Primers ITS5 (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) and ITS4 (TCCTCCGCT-TATTGATATGC) were used to amplify the ITS1-5.8S-ITS2 region from total DNA extracts.^{30,31} The thermal cycle program was as follows: 3 min at 95 °C followed by 30 cycles of 50 s at 94 °C, 40 s at 48 °C, and 40 s at 72 °C, with a final extension period of 10 min at 72 °C. The amplified DNA was purified and directly subjected to sequencing reactions using primers ITS5 and ITS4. BLASTN 2.2.10 was used to search for similar sequences in the GenBank.³² DNA sequence similarity was determined by the ClustalW (1.82) multiple sequence alignment program.³³ Phylogenetic relationship was estimated using PAUP* (v 4.0 b10).³⁴

Endophytic fungi isolates mfer5 and usia5 grew on PDA as a white filamentous fungus colony. On banana leaf agar they developed black stromata bearing pycnidia. Only α -conidia were produced by the isolate usia5, while both α -conidia and β -conidia could be observed in the isolate mfer5. These characteristics suggest that they are members of the genus *Phomopsis*, but should be different species. A GenBank search for similar sequences to their ITS regions revealed several species of *Phomopsis* and their teleomorphs, *Diaporthe*, as the closest matches for similar sequences, with sequence identities of 90%–98% for the 18 known species closest hit. This confirmed that mfer5 and usia5 are *Phomopsis*. The mfer5 sequence showed the highest identity (98%) to those of *P. eucommii* and *P. lagerstroemiae*, while the usia5 sequence

exhibited the highest identity (97%) to those of *P. quercina*, *P. vaccinii*, *P. amygdali*, and *P. juniperivora*. The sequence similarity between strains mfer5 and usia5 was 93%. Phylogenetic analysis using maximum parsimony and a neighbor-joining algorithm placed them in two different clades, suggesting that they are different species in the genus *Phomopsis*. The DNA sequences ITS1-5.8S-ITS2 of mfer5 and usia5 have been submitted to GenBank with accession numbers AY907347 and AY907348, respectively. Cultures of *Phomopsis* sp. mfer5 and usia5 have been deposited at the BIOTEC Culture Collection, Thailand, under the registration codes BBC 4196 and BCC 9036, respectively.

Extraction and Isolation of 3-NPA (1). *Phomopsis* sp. usia5 was cultured in a MID³⁵ culture medium (4 L) for 21 days at 25 °C. Fungal cells were separated from a broth by filtration, and a culture broth was subsequently extracted with EtOAc (equal volume, ×3), yielding 1.2 g of a crude extract. The extract was subjected to a Sephadex LH-20 column (3 × 60 cm), which was eluted with MeOH. Nine fractions (each 90 mL) were obtained, and fraction 5 contained 3-NPA (1). A yield of 178 mg/L (culture broth) was obtained for 3-NPA (1).

3-Nitropropionic Acid (3-NPA) (1): white solid; ¹H and ¹³C NMR data are identical to those of an authentic sample (Sigma); ESITOFMS (positive ion mode) *m/z* 142.0108 [M + Na]⁺, calcd for [C₃H₅O₄N + Na]⁺, 142.0116; ESITOFMS (negative ion mode) *m/z* 118.0143 [M - H]⁻, calcd for [C₃H₅O₄N - H]⁻, 118.0140.

Bioassays. Antimycobacterial activity was assessed against *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra using the Microplate Alamar Blue Assay (MABA).³⁶ The mycobacterium *M. tuberculosis* H37Ra was cultured in Middle-brook 7H9 broth. The standard drugs isoniazid and kanamycin sulfate, used as reference compounds for the antimycobacterial assay, showed MIC values of 0.29–0.66 and 3.4–8.5 μM, respectively. The MIC values of the reference compounds were determined in the same experiment as experimental samples. Cytotoxicity was determined by employing the colorimetric method described by Skehan and co-workers.³⁷ The reference compound, ellipticine, exhibited activity toward the Vero, KB, NCI-H187, and BC cell lines with an IC₅₀ range of 0.8–1.2 μM.

Acknowledgment. Financial support from The Thailand Research Fund (grant no. DBG4780003) to N.S. is gratefully acknowledged. Research at BIOTEC is supported by the Bioresources Research Network, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology. P.C. thanks the Higher Education Commission Grants for Graduate Dissertation (Chulalongkorn University) for a student grant.

References and Notes

- Strobel, G. A. *Microbes Infect.* **2003**, *5*, 535–544.
- Strobel, G. A.; Daisy, B.; Castillo, U.; Harper, J. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 257–268.
- Schulz, B.; Boyle, C.; Draeger, S.; Rommert, A. K.; Krohn, K. *Mycol. Res.* **2002**, *106*, 996–1004.
- Kongsaree, P.; Prabpai, S.; Sriubolmas, N.; Vongvein, C.; Wiyakrutta, S. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 709–711.
- Wagenaar, M. M.; Clardy, J. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 1006–1009.
- Li, J. Y.; Strobel, G. A. *Phytochemistry* **2001**, *57*, 261–265.
- Brady, S. F.; Bondi, S. M.; Clardy, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 9900–9901.
- Shrestha, K.; Strobel, G. A.; Shrivastava, S. P.; Gewali, M. B. *Planta Med.* **2001**, *67*, 374–376.
- Simpson, D. J.; Wainwright, S. J.; Hipkin, C. R. *Vet Rec.* **1999**, *145*, 169–171.
- Salem, M. A.; Williams, J. M.; Wainwright, S. J.; Hipkin, C. R. *Phytochemistry* **1995**, *40*, 89–91.
- Hipkin, C. R.; Simpson, D. J.; Wainwright, S. J.; Salem, M. A. *Nature* **2004**, *430*, 98–101.
- Hipkin, C. R.; Salem, M. A.; Simpson, D.; Wainwright, S. J. *Biochem. J.* **1999**, *340*, 491–495.
- Patocka, J.; Bielavsky, J.; Cabal, J.; Fusek, J. *Acta Med.* **2000**, *43*, 9–13.
- Williams, M. C.; Stermitz, F. R.; Thomas, R. D. *Phytochemistry* **1975**, *14*, 2306–2308.
- Nielsen, K. F.; Smedsgaard, J. *J. Chromatogr. A* **2003**, *1002*, 111–136.
- Russell, R.; Paterson, M.; Kimmelmeier, C. *J. Chromatogr.* **1990**, *511*, 195–221.
- Mallavadhani, U. V.; Panda, A. K.; Rao, Y. R. *Phytochemistry* **1998**, *49*, 901–951.
- Jensen, S. R.; Franzyk, H.; Wallander, E. *Phytochemistry* **2002**, *60*, 213–231.
- Griffin, W. J.; Lin, G. D. *Phytochemistry* **2000**, *53*, 623–637.
- Schwarz, M.; Kopcke, B.; Weber, R. W.; Sterner, O.; Anke, H. *Phytochemistry* **2004**, *65*, 2239–2245.
- (a) Kittakoop, P.; Punya, J.; Kongsaree, P.; Lertwerawat, Y.; Jintasirikul, A.; Tanticharoen, M.; Thebtaranonth, Y. *Phytochemistry* **1999**, *52*, 453–457. (b) Boonphong, S.; Kittakoop, P.; Isaka, M.; Palittapongarnpim, P.; Jaturapat, A.; Danwisetkanjana, K.; Tanticharoen, M.; Thebtaranonth, Y. *Planta Med.* **2001**, *67*, 279–281. (c) Boonphong, S.; Kittakoop, P.; Isaka, M.; Pittayakhajonwut, D.; Tanticharoen, M.; Thebtaranonth, Y. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 965–967. (d) Chinworrungsee, M.; Kittakoop, P.; Isaka, M.; Rungrod, A.; Tanticharoen, M.; Thebtaranonth, Y. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 1965–1969. (e) Vongvanich, N.; Kittakoop, P.; Isaka, M.; Trakulnaleamsai, S.; Vimuttipong, S.; Tanticharoen, M.; Thebtaranonth, Y. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 1346–1348. (f) Chinworrungsee, M.; Kittakoop, P.; Isaka, M.; Chanphen, R.; Tanticharoen, M.; Thebtaranonth, Y. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2002**, *22*, 2473–2476. (g) Dettrakul, S.; Kittakoop, P.; Isaka, M.; Nopichai, S.; Suyarnsestakorn, C.; Tanticharoen, M.; Thebtaranonth, Y. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 1253–1255. (h) Chinworrungsee, M.; Kittakoop, P.; Isaka, M.; Maithip, P.; Supothina, S.; Thebtaranonth, Y. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 689–692. (i) Jongrungruangchok, S.; Kittakoop, P.; Yongsmith, B.; Bavovada, R.; Tanasupawat, S.; Boonudomlap, U.; Thebtaranonth, Y. *Phytochemistry* **2004**, *65*, 2569–2575. (j) Sawadjoon, S.; Kittakoop, P.; Isaka, M.; Kirtikara, K.; Madla, S.; Thebtaranonth, Y. *Planta Med.* **2004**, *70*, 1085–1086.
- Scallet, A. C.; Haley, R. L.; Scallet, D. M.; Duhart, H. M.; Binienda, Z. K. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2003**, *993*, 305–312.
- Calkins, M. J.; Jakel, R. J.; Johnson, D. A.; Chan, K.; Kan, Y. W.; Johnson, J. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**, *102*, 244–249.
- Fontaine, M. A.; Geddes, J. W.; Banks, A.; Butterfield, D. A. *J. Neurochem.* **2000**, *75*, 1709–1715.
- Bogdanov, M. B.; Ferrante, R. J.; Kuemmerle, S.; Klivenyi, P.; Beal, M. F. *J. Neurochem.* **1998**, *71*, 2642–2644.
- Schmidt, F.; Donahoe, S.; Hagens, K.; Mattow, J.; Schaible, U. E.; Kaufmann, S. H.; Aebersold, R.; Jungblut, P. R. *Mol. Cell Proteomics* **2004**, *3*, 24–42.
- (a) Brouillet, E.; Jenkins, B. G.; Hyman, B. T.; Ferrante, R. J.; Kowall, N. W.; Srivastava, R.; Roy, D. S.; Rosen, B. R.; Beal, M. F. *J. Neurochem.* **1993**, *60*, 356–359. (b) Erecinska, M.; Nelson, D. J. *Neurochem.* **1994**, *63*, 1033–1041. (c) Wullner, U.; Young, A. B.; Penney, J. B.; Beal, M. F. *J. Neurochem.* **1994**, *63*, 1772–1781. (d) Borlongan, C. V.; Koutouzis, T. K.; Sanberg, P. R. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **1997**, *21*, 289–293.
- Eckers, C.; Wolff, J. C.; Haskins, N. J.; Sage, A. B.; Giles, K.; Bateman, R. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 3683–3688.
- Schulz, B.; Sucker, J.; Aust, H. J.; Krohn, K.; Ludewig, K.; Jone, P. G.; Doring, D. *Mycol. Res.* **1995**, *99*, 1007–1015.
- Lee, S. B.; Taylor, J. W. In *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*; Innes, M. A., Gelfand, J., Sninsky, J., White, T. J., Eds.; Academic Press: San Diego, 1990; pp 282–287.
- White, T. J.; Bruns, T.; Lee, S.; Taylor, J. In *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*; Innes, M. A., Gelfand, J., Sninsky, J., White, T. J., Eds.; Academic Press: San Diego, 1990; pp 315–322.
- Altschul, S. F.; Madden, T. L.; Schäffer, A. A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W.; Lipman, D. J. *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 3389–3402.
- Thompson, J. D.; Higgins, D. G.; Gibson, T. J. *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 4673–4680.
- Swofford, D. L. *PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods)*, Version 4; Sinauer Associates: Sunderland, MA, 2003.
- Pinkerton, F.; Strobel, G. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1976**, *73*, 4007–4011.
- Collins, L.; Franzblau, S. G. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1997**, *41*, 1004–1009.
- Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J. T.; Bokesch, H.; Kenney, S.; Boyd, M. R. *J. Nat. Cancer Inst.* **1990**, *82*, 1107–1112.

Cyclopentenones, Scaffolds for Organic Syntheses Produced by the Endophytic Fungus *Mitosporic Dothideomycete* sp. LRUB20

Porntep Chomcheon,[†] Nongluksna Sriubolmas,[‡] Suthep Wiyakrutta,[§] Nattaya Ngamrojanavanich,[†] Narongsak Chaichit,[⊥] Chulabhorn Mahidol,^{||} Somsak Ruchirawat,^{||} and Prasat Kittakoop^{*,||}

Program of Biotechnology and Department of Chemistry, Faculty of Science, and Department of Microbiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Thailand, Department of Microbiology, Faculty of Science, Mahidol University, Thailand, Department of Physics, Faculty of Science and Technology, Thammasat University, Thailand, and Chulabhorn Research Institute, Vipavadee-Rangsit Highway, Bangkok 10210, Thailand

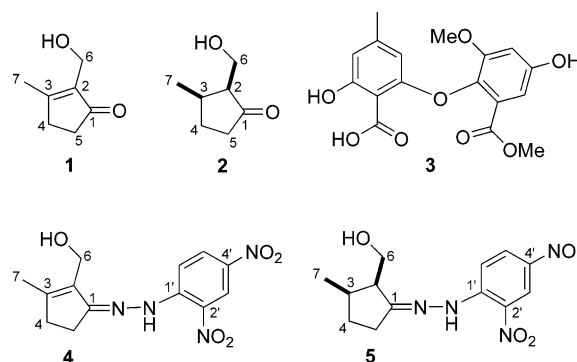
Received April 3, 2006

Two new natural products, 2-hydroxymethyl-3-methylcyclopent-2-enone (**1**) (synthetically known) and *cis*-2-hydroxymethyl-3-methylcyclopentanone (**2**), and a known compound, asteric acid (**3**), were isolated from the endophytic fungus *mitosporic Dothideomycete* sp. LRUB20, which was isolated from the stem of the Thai medicinal plant *Leea rubra*. Compound **2** was separated and identified in the form of its 2,4-dinitrophenylhydrazone derivative (**5**). Compounds **1**, **3**, and hydrazone **5** exhibited mild antimycobacterial activity, both with MIC values of 200 $\mu\text{g/mL}$. Compounds **1**, **3**, and **4** were inactive (at 50 $\mu\text{g/mL}$) toward Vero, KB, NCI-H187, and BC cell lines. Hydrazone **5** showed only mild cytotoxicity against the Vero cell line with an IC_{50} value of 21.7 $\mu\text{g/mL}$; however, it was inactive toward KB, NCI-H187, and BC cell lines. Endophytic fungi may be a source for the production of building blocks for organic syntheses.

Thailand is located in a tropical area, furnishing great biodiversity ranging from higher organisms (plants and animals) to microorganisms. Thai microorganisms isolated from unique habitats, e.g., actinomycetes from acidic peat swamps,¹ fungal endophytes from Thai medicinal plants,^{2,3} entomopathogenic fungi from insects,⁴ and bacteria from marine origins,⁵ have been shown to be sources of bioactive compounds. Endophytic fungi are a potential source for the production of a diverse array of bioactive metabolites, some of which are promising candidates for drug development.⁶ Interestingly, particular fungal endophytes are able to produce bioactive molecules previously isolated from higher plants, including useful drugs, e.g., Taxol and camptothecin.⁷ Furthermore, plant metabolites may actually originate from associated endophytes.^{2,8} The present work demonstrates that, in addition to being a source of bioactive substances, endophytic fungi also produce useful chemical scaffolds for organic syntheses. Two new natural products, 2-hydroxymethyl-3-methylcyclopent-2-enone (**1**) (synthetically known) and *cis*-2-hydroxymethyl-3-methylcyclopentanone (**2**), and a known compound, asteric acid (**3**), were isolated from the fungal endophyte *mitosporic Dothideomycete* sp. strain LRUB20, which was isolated from the stem of the Thai medicinal plant *Leea rubra* Blume ex Spreng. (Leeaceae).

Purification of the culture broth extract of the endophytic fungus strain LRUB20 by repeated Sephadex LH-20 column chromatography furnished 2-hydroxymethyl-3-methylcyclopent-2-enone (**1**) and asteric acid (**3**). Spectroscopic data of asteric acid (**3**) were in good agreement with reported data.⁹ Since compound **2** could not be separated from **1** by column chromatography (Sephadex LH-20 and Si gel) and HPLC (C_{18} reversed phase), it was separated and identified in the form of its 2,4-dinitrophenylhydrazone derivative (**5**).

2-Hydroxymethyl-3-methylcyclopent-2-enone (**1**) was obtained as a colorless oil. Comparison of the ^1H and ^{13}C spectra of **1** with



those of 2-hydroxymethyl-3-methylcyclopent-2-enone, a common chemical scaffold in organic synthesis,¹⁰ suggested that **1** was 2-hydroxymethyl-3-methylcyclopent-2-enone. It should be noted that δ_{C} (173.6) of the C-3 double bond in **1** was significantly shifted downfield, similar to the carbonyl resonances for carboxylic acids or esters. Compound **4**, i.e., a 2,4-dinitrophenylhydrazone derivative of **1**, was prepared, and the δ_{C} (158.2) of C-3 was 15.4 ppm shifted upfield. ^1H – ^1H COSY and HMBC spectra allowed assignment of protons and carbons in **1** and **4**. Furthermore, X-ray single-crystal analysis of 2,4-dinitrophenylhydrazone **4** confirmed the structure of **1** (see Supporting Information).

As mentioned earlier, compound **2** was obtained as an inseparable mixture with compound **1**. Subsequently, the cyclopentenone mixture of **1** and **2** was transformed to the corresponding 2,4-dinitrophenylhydrazones **4** and **5**, which were separated on a Sephadex LH-20 column. The ESITOFMS spectrum indicated the molecular formula $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{O}_5\text{N}_4$ for hydrazone **5**. The ^1H – ^1H COSY spectrum of **5** revealed the connectivity from H-2 through H-7, while the HMBC spectrum showed correlations from H-2, H-4, H-5, and H-6 to C-1 and from the NH proton to C-1, C-1', C-2', and C-6', establishing the gross structure of **5**. The NOESY spectrum of **5** showed intense cross-peaks between the H-6 methylene and H-7 methyl and between the H-7 methyl and H-4 β , suggesting a *cis* orientation of the methyl and methylene groups. On the basis of these data, compound **5** was a hydrazone derivative of *cis*-2-hydroxymethyl-3-methylcyclopentanone (**2**). While the *cis* isomer of 2-hydroxymethyl-3-methylcyclopentanone (**2**) is a natural

* To whom correspondence should be addressed. Tel: +666-9755777. Fax: +662-5740622, ext. 1513. E-mail: prasatkittakoop@yahoo.com.

[†] Program of Biotechnology and Department of Chemistry, Chulalongkorn University.

[‡] Department of Microbiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University.

[§] Department of Microbiology, Faculty of Science, Mahidol University.

[⊥] Department of Physics, Thammasat University.

^{||} Chulabhorn Research Institute.

product, its *trans* isomer is widely used, together with cyclopentenone **1**, as an intermediate in the chemical synthesis of natural products.¹¹

Among the compounds isolated, 2-hydroxymethyl-3-methylcyclopent-2-enone (**1**), asteric acid (**3**), and hydrazone **5** exhibited mild antimycobacterial activity, with a minimum inhibitory concentration (MIC) value of 200 $\mu\text{g/mL}$. Compounds **1**, **3**, and **4** were inactive (at 50 $\mu\text{g/mL}$) toward Vero, KB, NCI-H187, and BC cell lines. Hydrazone **5** showed only mild cytotoxicity against the Vero cell line, with an IC_{50} value of 21.7 $\mu\text{g/mL}$; however, it was inactive toward KB, NCI-H187, and BC cell lines. Cyclopentenones in nature are rare and occur as 2-cyclopentenones with an odd-number carbon alkyl chain attached at C-5 or as 2,3-dimethyl-2-cyclopentenone commonly found in volatile components in food.¹² Due to interesting antibacterial and antifungal activities reported,¹² synthetic chemists have shown interest in the syntheses of cyclopentenones.¹³ In the present work, despite the fact that fungal metabolites **1** and **2** are not attractive in bioassays (anticancer and antimycobacteria), they are useful scaffolds for organic synthesis.^{10,11} Green chemistry may play a crucial role in future chemical syntheses, and the use of microbial building blocks for subsequent use in organic syntheses provides fundamental advantages in comparison to chemical methods.¹⁴ The term “white biotechnology” has been recently introduced for microbial production of building blocks, and various 2-oxocarboxylic acids are examples of chemical scaffolds from microbial fermentation.¹⁴ In the present study, the fungal metabolite 2-hydroxymethyl-3-methylcyclopent-2-enone (**1**) could be obtained with high yield up to 0.4 g from 5 L of culture broth when culturing the fungus LRUB20 in a particular culture medium (data not shown). Therefore, the production of **1** in multigram scale is practically possible. Unfortunately, the important chiral derivative **2** is generally found as a minor component in all culture media investigated. On the basis of this investigation, endophytic fungi may be useful for the production of building blocks for organic syntheses.

Experimental Section

General Experimental Procedures. Optical rotation was measured on a JASCO DIP370 polarimeter, and UV spectra were recorded on a Cary 1E UV-vis spectrophotometer. IR spectra were measured on a Perkin-Elmer 2000 spectrometer. NMR experiments were carried out on a Bruker DRX 400 NMR spectrometer, operating at 400 MHz for proton and 100 MHz for carbon spectra. The ESITOFMS spectra were obtained using a Micromass LCT mass spectrometer.

Isolation of Endophytic Fungus. An apparently healthy twig was collected from a Thai medicinal plant, *Leea rubra* Blume ex Spreng. (family Leeaceae), in the forest areas of Pitsanulok Province, Thailand. The sample was cleaned under running tap water and then air-dried. The cleaned twig was cut into a 5 cm piece, and the fragment was surface-sterilized as described by Schulz and co-workers¹⁵ with some modifications. The fragment was sequentially immersed in 70% EtOH for 1 min, NaOCl solution (6% available chlorine) for 5 min, and sterile distilled H₂O for 1 min (two times). Using a sterile blade, the twig fragment was then cut into small pieces and placed on sterile water agar plates for incubation at 30 °C. The hyphal tip of the endophytic fungus growing out from the plant tissue was removed using a sterile pasture pipet and transferred onto a sterile potato dextrose agar (PDA) plate. After incubation at 30 °C for 7–14 days, culture purity was determined from colony morphology.

Identification of Endophytic Fungus. Endophytic fungus isolate LRUB20 was identified on the basis of both morphology on PDA and banana leaf agar and analysis of the DNA sequences of the 18S ribosomal RNA gene and ITS region of the ribosomal RNA gene. Total DNA was extracted from fungal mycelia grown in potato dextrose broth using DNeasy plant mini kit (Qiagen). Primers NS1 (GTAGTCATATGCTTGCTC) and NS8 (TCCGCAGGTTACCTACGGA)¹⁶ were used to amplify the 18S rRNA gene from total DNA extracts. The thermal cycle program was as follows: 3 min at 95 °C followed by 30 cycles of 50 s at 95 °C, 40 s at 42 °C, and 2 min at 72 °C, with a final extension period of 10 min at 72 °C. The amplified DNA was purified

and directly subjected to sequencing reactions using primers NS1, NS2, NS3, NS4, NS5, NS6, NS7, and NS8.¹⁶ Primers ITS5 (GGAAG-TAAAAGTCGTAACAAGG) and ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC)¹⁶ were used to amplify the ITS1–5.8S–ITS2 region from total DNA extracted. The thermal cycle program was as follows: 3 min at 95 °C followed by 30 cycles of 50 s at 95 °C, 40 s at 45 °C, and 40 s at 72 °C, with a final extension period of 10 min at 72 °C. The amplified DNA was purified and directly subjected to sequencing reactions using primers ITS5 and ITS4. BLASTN 2.2.10¹⁷ was used to search for similar sequences in the GenBank. DNA sequence similarity was determined by the ClustalW (1.82) multiple sequence alignment program.¹⁸ Phylogenetic relationship was estimated using PAUP* (v 4.0 b10).¹⁹

Endophytic fungus isolate LRUB20 grown on PDA had a gray velvety colony and produced characteristic brown spores. On banana leaf agar it did not develop any fruiting body after cultivation at 25 °C for 2 months. A GenBank search for similar sequences showed that the 18S rRNA gene sequence of LRUB20 had 96% sequence identities to those of *Acrospermum compressum* and *A. gramineum* in the family Acrospermaceae, subphylum Pezizomycotina, phylum Ascomycota. Phylogenetic analysis of LRUB20 with 33 known species hit using maximum parsimony placed it in the same clade with *A. compressum* and *A. gramineum* with 100% bootstrap support. Microscopic morphology of LRUB20 differs apparently from that of *Dactylaria* (the anamorph of *A. compressum*) and *Virgariella* (the anamorph of *A. gramineum*).^{20,21} On the basis of the current Ascomycota systematics,²² LRUB20 is tentatively classified as a mitospore species member of Dothideomycetes et Chaetothyriomycetes incertae sedis, class Dothideomycetes, subphylum Pezizomycotina. In an attempt to classify LRUB20 to lower taxonomic level, the ITS1–5.8S–ITS2 sequence was used as query sequence. The highest ITS sequence similarity to known species hit was only 78% to *Mycocleptodiscus terrestris*, a mitospore Magnaporthaceae, Sordariomycetes incertae sedis, subphylum Pezizomycotina, suggesting that LRUB20 is potentially a new species. The 18S rRNA gene sequence and ITS sequence of LRUB20 have been submitted to GenBank with accession number DQ381536 and DQ384608, respectively. The culture of isolate LRUB20 has been deposited at the MIM Laboratory, Department of Microbiology, Mahidol University, Thailand.

Bioassays. Cytotoxicity was determined by employing the colorimetric method described by Skehan and co-workers.²³ The reference compound, ellipticine, exhibited activity toward the Vero, KB, NCI-H187, and BC cell lines with IC_{50} ranges of 0.2–0.3 $\mu\text{g/mL}$. Antimycobacterial activity was assessed against *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra using the microplate Alamar Blue assay (MABA).²⁴ The mycobacterium *M. tuberculosis* H37Ra was cultured in Middlebrook 7H9 broth. The standard drugs isoniazid and kanamycin sulfate showed MIC values of 0.040–0.090 and 2.0–5.0 $\mu\text{g/mL}$, respectively.

Extraction and Isolation. The endophytic fungus mitospore Dothideomycete sp. LRUB20 was cultured in a malt Czapek culture medium (5 L) for 21 days at 25 °C. Fungal cells were separated from the culture broth by filtration, and the broth was subsequently extracted with EtOAc (equal volume, $\times 3$), yielding 1.5 g of a crude extract. The extract was subjected to a Sephadex LH-20 column (3 $\times$ 60 cm), eluted with MeOH, to yield 10 fractions (A1–A10). Fraction A7 was crystallized (MeOH), yielding 198 mg of asteric acid (**3**). Fraction A5 was further purified by a Sephadex LH-20 column (2.5 $\times$ 52 cm), and nine fractions (B1–B9) were obtained. Fractions B3 and B4 were combined and subjected to Sephadex LH-20 column chromatography (1.5 $\times$ 43 cm) to afford seven fractions (C1–C7). Fraction C5 contained 83 mg of 2-hydroxymethyl-3-methylcyclopent-2-enone (**1**), while fraction C6 was a mixture of compound **1** and compound **2**. Further separation by Sephadex LH-20, Si gel, and HPLC (C₁₈ reversed phase) failed to separate **2** from **1**. This inseparable mixture of cyclopentenones was then derivatized to their corresponding 2,4-dinitrophenylhydrazones. The inseparable mixture (30 mg) was dissolved in MeOH (with catalytic amount of formic acid), and 2,4-dinitrophenylhydrazine (50 mg) was added. The reaction mixture was kept stirring at room temperature for 24 h, then separated using a Sephadex LH-20 column, to yield hydrazones **4** (16.2 mg) and **5** (12.8 mg). Hydrazone **4** was crystallized from MeOH for X-ray crystal analysis; however, hydrazone **5** failed to crystallize from any solvent system.

2-Hydroxymethyl-3-methylcyclopent-2-enone (1): colorless oil; UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 207 (3.69), 304 (2.99) nm; IR (KBr) ν_{max} 3423 (br), 2925, 1689, 1644, 1437, 1388, 1341, 1307, 1066, 1006 cm^{-1} ;

^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 4.30 (2H, s, H-6), 2.54–2.56 (2H, m, H-4), 2.37–2.40 (2H, m, H-5), 2.11 (3H, s, H-7); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 210.6 (C, C-1), 173.6 (C, C-3), 138.6 (C, C-2), 54.9 (CH_2 , C-6), 34.4 (CH_2 , C-5), 32.0 (CH_2 , C-4), 17.2 (CH_3 , C-7); ESITOFMS m/z 149.0586 (calcd for $[\text{C}_7\text{H}_{10}\text{O}_2 + \text{Na}]^+$, 149.0578).

Compound 4: red solid; mp 183–186 °C; UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 214 (4.45), 255 (4.45), 285 (4.21), 385 (4.65) nm; IR (KBr) ν_{max} 3503, 3423, 3299, 3108, 2914, 2340, 2108, 1615, 1583, 1512, 1497, 1415, 1329, 1252, 1134, 1060 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 10.91 (1H, s, NH), 9.15 (1H, d, J = 2.6 Hz, H-3'), 8.31 (1H, dd, J = 9.6, 2.6 Hz, H-5'), 7.84 (1H, d, J = 9.6 Hz, H-6'), 4.53 (2H, s, H-6), 2.74 (4H, m, overlapping signals of H-4 and H-5), 2.07 (3H, s, H-7); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 168.1 (C, C-1), 158.2, (C, C-3), 144.7 (C, C-1'), 137.6 (C, C-4'), 135.0 (C, C-2), 130.1 (CH, C-5'), 129.0 (C, C-2'), 123.7 (CH, C-3'), 115.9 (CH, C-6'), 56.1 (CH_2 , C-6), 34.8 (CH_2 , C-4), 25.5 (CH_2 , C-5), 15.9 (CH_3 , C-7); ESITOFMS m/z 307.1050 (calcd for $[\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{O}_5\text{N}_4 + \text{H}]^+$, 307.1042).

Compound 5: red solid; mp 169–171 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{28}$ –78.9 (c 0.60, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 227 (4.70), 251 (4.59), 366 (4.86) nm; IR (KBr) ν_{max} 3443 (br), 3312, 3107, 2958, 2931, 2873, 1619, 1589, 1518, 1504, 1423, 1335, 1310, 1269, 1135, 1066, 919, 832 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 10.86 (1H, s, NH), 9.15 (1H, d, J = 2.6 Hz, H-3'), 8.32 (1H, dd, J = 9.5, 2.6 Hz, H-5'), 7.80 (1H, d, J = 9.5 Hz, H-6'), 4.01 (1H, dd, J = 11.5, 4.0 Hz, H-6b), 3.83 (1H, dd, J = 11.5, 7.2 Hz, H-6a), 2.70 (1H, ddd, J = 18.0, 9.0, 1.5 Hz, H-5 β), 2.43–2.50 (1H, m, H-5 α), 2.41–2.48 (1H, m, H-2), 2.19–2.26 (1H, m, H-4 α), 1.91–2.01 (1H, m, H-3), 1.49–1.59 (1H, m, H-4 β), 1.20 (3H, d, J = 6.5 Hz, H-7); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 169.8 (C, C-1), 144.8 (C, C-1'), 138.0 (C, C-4'), 130.2 (CH, C-5'), 130.0 (C, C-2'), 123.6 (CH, C-3'), 115.9 (CH, C-6'), 62.2 (CH_2 , C-6), 54.2 (CH, C-2), 35.7 (CH, C-3), 31.6 (CH_2 , C-4), 28.1 (CH_2 , C-5), 18.5 (CH_3 , C-7); ESITOFMS m/z 309.1190 (calcd for $[\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{O}_5\text{N}_4 + \text{H}]^+$, 309.1199).

Acknowledgment. Financial support from The Thailand Research Fund (TRF) to N.S. (grant no. DBG4780003) is gratefully acknowledged. N.C. also thanks the TRF for the award of Senior Research Scholar (grant no. RTA4880008). A student grant from the Higher Education Commission Grants for Graduate Dissertation (Chulalongkorn University) to P.C. is acknowledged. We thank Prof. O. E. Eriksson, Prof. T. W. Flegel, and Dr. J. Worapong for suggestions on fungal identification.

Supporting Information Available: X-ray data for compound 4. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

References and Notes

- Thawai, C.; Kittakoop, P.; Tanasupawat, S.; Suwanborirux, K.; Sriklung, K.; Thebtaranonth, Y. *Chem. Biodiversity* **2004**, *1*, 640–645.
- Chomcheon, P.; Wiyakrutta, S.; Sriubolmas, N.; Ngamrojanavanich, N.; Isarangkul, D.; Kittakoop, P. *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 1103–1105.
- Kongsaeree, P.; Prabpai, S.; Sriubolmas, N.; Vongvein, C.; Wiyakrutta, S. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 709–711.
- Isaka, M.; Kittakoop, P.; Kirtikara, K.; Hywel-Jones, N. L.; Thebtaranonth, Y. *Acc. Chem. Res.* **2005**, *38*, 813–823.
- (a) Chinworrungsee, M.; Kittakoop, P.; Isaka, M.; Chanphen, R.; Tanticharoen, M.; Thebtaranonth, Y. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2002**, *22*, 2473–2476. (b) Jaruchoktawechai, C.; Suwanborirux, K.; Tanasupawat, S.; Kittakoop, P.; Menasveta, P. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 984–986.
- (a) Strobel, G. A. *Microbes Infect.* **2003**, *5*, 535–544. (b) Strobel, G. A.; Daisy, B.; Castillo, U.; Harper, J. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 257–268.
- (a) Puri, S. C.; Verma, V.; Amna, T.; Qazi, G. N.; Spiteller, M. *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 1717–1719. (b) Stierle, A.; Strobel, G.; Stierle, D. *Science* **1993**, *260*, 214–216. (c) Stierle, A.; Strobel, G.; Stierle, D.; Grothaus, P.; Bignami, G. *J. Nat. Prod.* **1995**, *58*, 1315–1324.
- Prajoukklang, A.; Sirithunyalug, B.; Charoenchai, P.; Suvannakad, R.; Sriubolmas, N.; Piyamongkol, S.; Kongsaeree, P.; Kittakoop, P. *Chem. Biodiversity* **2005**, *2*, 1358–1367.
- (a) Stermitz, Frank R.; Schroeder, H. A.; Geigert, J. *Phytochemistry* **1973**, *12*, 1173. (b) Natori, S.; Nishikawa, H. *Chem. Pharm. Bull.* **1962**, *10*, 117–124.
- (a) Cho, E. S.; Won, Y. C.; Lee, S. Y.; Lee, B. Y.; Shin, D. M.; Chung, Y. K. *Inorg. Chim. Acta* **2004**, *357*, 2301–2308. (b) Ziegler, F. E.; Kover, R. X.; Yee, N. N. K. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 5155–5159.
- (a) Marx, J. N.; Norman, L. R. *J. Org. Chem.* **1975**, *40*, 1602–1606. (b) Marx, J. N.; Norman, L. R. *Tetrahedron Lett.* **1973**, *44*, 4375–4378. (c) Stepanov, A. V.; Veselovsky, V. V. *Russ. Chem. Bull.* **2002**, *51*, 359–361.
- (a) Lubken, T.; Schmidt, J.; Porzel, A.; Arnold, N.; Wessjohann, L. *Phytochemistry* **2004**, *65*, 1061–1071. (b) Lee, K.-G.; Lee, S.-E.; Takeoka, G. R.; Kim, J.-H.; Park, B.-S. *J. Sci. Food Agric.* **2005**, *85*, 1580–1586.
- (a) Gallos, J. K.; Stathakis, C. I.; Kotoulas, S. S.; Koumbis, A. E. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 6884–6890. (b) Smith, A. B., III; Branca, S. J.; Pilla, N. N.; Guaciaro, M. A. *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 1855–1869. (c) Khan, F. A.; Dash, J.; Rout, B. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 9285–9288.
- (a) Stottmeister, U.; Aurich, A.; Wilde, H.; Andersch, J.; Schmidt, S.; Sicker, D. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, *32*, 651–664. (b) Maury, J.; Asadollahi, M. A.; Moller, K.; Clark, A.; Nielsen, J. *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.* **2005**, *100*, 19–51.
- Schulz, B.; Sucker, J.; Aust, H. J.; Krohn, K.; Ludewig, K.; Jone, P. G.; Doring, D. *Mycol. Res.* **1995**, *99*, 1007–1015.
- White, T. J.; Bruns, T.; Lee, S.; Taylor, J. In *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*; Innes, M. A., Gelfand, J., Sninsky, J., White, T. J., Ed.; Academic Press: San Diego, 1990; pp 315–322.
- Altschul, S. F.; Madden, T. L.; Schäffer, A. A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W.; Lipman, D. J. *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 3389–3402.
- Thompson, J. D.; Higgins, D. G.; Gibson, T. J. *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 4673–4680.
- Swofford, D. L. *PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods)*, Version 4; Sinauer Associates: Sunderland, MA, 2003.
- Webster, J. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **1956**, *39*, 361–366.
- Tubaki, K. *J. Hattori Bot. Lab.* **1958**, *20*, 142–244.
- Eriksson, O. E. *Myconet* **2006**, *12*, 1–82. Retrieved March 24, 2006, from http://www.umu.se/myconet/M_outline.html.
- Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J. T.; Bokesch, H.; Kenney, S.; Boyd, M. R. *J. Nat. Cancer Inst.* **1990**, *82*, 1107–1112.
- Collins, L.; Franzblau, S. G. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1997**, *41*, 1004–1009.

NP060148H