



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

พฤกษเคมีและการพิสูจน์เอกลักษณ์ราเอนโดไฟต์จากพืช
สมุนไพรในจังหวัดนครราชสีมา

Chemotaxonomy and Identification of Endophytic Fungi
from Medical Plants in Nakhon Ratchasima Province

โดย

นางสาวศรีนวล ตันสุวรรณ
มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา

กันยายน 2560

สัญญาเลขที่ MRG5280213

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

พฤกษเคมีและการพิสูจน์เอกลักษณ์ราเอนโดไฟต์จากพืช
สมุนไพรในจังหวัดนครราชสีมา

Chemotaxonomy and Identification of Endophytic Fungi
from Medical Plants in Nakhon Ratchasima Province

ผู้วิจัย สังกัด

นางสาวศรีนวล ตันสุวรรณ

มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย

สกว. และ สกอ. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : สัญญาเลขที่ MRG5280213
ชื่อโครงการ : พฤษเคมีและการพิสูจน์เอกลักษณ์ราเอนโดไฟต์จากพืช
สมุนไพรในจังหวัดนครราชสีมา
ชื่อนักวิจัย : นางสาวศรีนวล ต้นสุวรรณ มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา
E-mail Address : srianuan1@hotmail.com
ระยะเวลาโครงการ : 2 ปี

การศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอนโดไฟต์ที่แยกจากพืชสมุนไพร ได้แก่ เหียง (*Dipterocarpus obtusifolius* Teijsm.ex Miq) เก็บตัวอย่างจาก 3 พื้นที่ในจังหวัดนครราชสีมา ฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวนอกได้ราเอนโดไฟต์ทั้งหมด 79 ไอโซเลท เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Malt extract broth (MEB) เป็นเวลา 1 เดือน สกัดเส้นใยและน้ำเพาะเลี้ยงเส้นใยด้วยสารละลายเอธิลอะซีเตท นำไประเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศจนได้สารสกัดหยาบ ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยเทคนิค Paper disc diffusion กับเชื้อแบคทีเรียทดสอบ 6 ชนิด ได้แก่ *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Vibrio* spp., *Salmonella typhimurium* และ *Bacillus megaterium* พบว่าสารสกัดหยาบราเอนโดไฟต์ที่แยกได้มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงสุด 3 ลำดับแรก ได้แก่ เชื้อราไอโซเลท B15, C23 และ A42 โดยแสดงผลของบริเวณเส้นผ่านศูนย์กลางยับยั้ง (Inhibition zone) ต่อเชื้อ *P. fluorescens* เท่ากับ 22 มิลลิเมตร, *B. megaterium* 17 มิลลิเมตร และ *B. megaterium* 10 มิลลิเมตร

ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟต์ ด้วยวิธี DPPH assay พบว่า สารสกัดจากเส้นใยไอโซเลท A42, C23 และ B15 แสดงค่าความเข้มข้นของสารที่ทำให้อนุมูลอิสระลดลงครึ่งหนึ่ง (IC_{50}) เท่ากับ 278.04, 5531.89 และ 6726.38 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ สารสกัดจากน้ำเพาะเลี้ยงเส้นใยไอโซเลท A42, B15 และ C23 แสดงค่า IC_{50} เท่ากับ 288.82, 3472.68 และ 5565.88 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุลของราเอนโดไฟต์ โดยเปรียบเทียบลำดับ DNA บริเวณ ITS1, ITS4 และ 5.8s rRNA พบว่า เชื้อราไอโซเลท A42 มีความคล้ายคลึงกับ *Aspergillus sydowii* 100% เชื้อราไอโซเลท B15 ความคล้ายคลึงกับ *Valsaeae* sp. 100 % และเชื้อราไอโซเลท C23 ไม่สามารถพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุลได้

คำสำคัญ : เหียง, ราเอนโดไฟต์, สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ, การหาลำดับเบสดีเอ็นเอ

Abstract

Project Code : MRG5280213
Project Title : Chemotaxonomy and Identification of Endophytic Fungi
from Medical Plants in Nakhon Ratchasima Province
Investigator : Miss Srinuan Tansuwan, Nakhon Ratchasima Rajabhat
University
E-mail Address : srinuan1@hotmail.com
Project Period : 2 years

Endophytic fungi from medical plant, *Dipterocarpus obtusifolius* Teijsm.ex Miq. were isolated from three areas in Nakhon Ratchasima Province by using surface sterilized technique. Seventy-nine fungal isolate were obtained from samples. Each endophytic fungi was cultured in malt extract broth (MEB) for 1 month. Mycelia and broth were extracted by ethyl acetate while rotary evaporators were used to remove solvent. The paper disc diffusion assay was used to evaluate the antibacterial activities against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Vibrio* spp., *Salmonella typhimurium* and *Bacillus megaterium*. Endophytic fungi isolate B15, C23 and A42 were showed inhibition zone against *P. fluorescens*; 22 mm, *B. megaterium*; 17 mm and *B. megaterium*; 10 mm, respectively.

Evaluate the antioxidant activities of endophytic fungi 3 isolates; A42, B15 and C23. The antioxidant activities were determined by DPPH method. It was shown that the extract mycelia of endophytic fungi A42, C23 and B15 were shown the half maximal inhibitory concentration activities (IC_{50}); 278.04, 5531.89 and 6726.38 $\mu\text{g/ml}$, respectively. While the crude extracted broth of endophytic fungi 3 isolates; A42, B15 and C23 were shown the IC_{50} ; 288.82, 3472.68 and 5565.88 $\mu\text{g/ml}$, respectively. On the basis of morphology and DNA sequences of ITS1, TIS4 and 5.8s rRNA region, the endophytic fungi A42 was similar to *Aspergillus sydowii* 100%, the endophytic fungi B15 was similar to *Valsaceae* sp. 100% and the endophytic fungi C23 couldn't unidentified.

Keyword : *Dipterocarpus obtusifolius* Teijsm.ex Miq., endophytic fungi, bioactive activity, DNA sequences

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	(1)
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	(2)
กิตติกรรมประกาศ.....	(3)
สารบัญ.....	(4)
สารบัญตาราง.....	(6)
สารบัญภาพ.....	(7)
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
ความสำคัญของการวิจัย.....	3
ขอบเขตของการวิจัย.....	3
สถานที่ทำการทดลอง.....	3
กรอบแนวคิดในการวิจัย.....	3
สมมุติฐานการวิจัย.....	4
นิยามคำศัพท์เฉพาะ.....	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
เหียง.....	5
สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ.....	6
ราเอนโดไฟต์.....	7
รายงานการวิจัยเกี่ยวกับสารผลิตภัณฑ์ของราเอนโดไฟต์.....	8
สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอนโดไฟต์.....	9
การจัดจำแนกราเอนโดไฟต์.....	11
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	12
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	19
ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง.....	19
เครื่องมือที่ใช้ในการรวบรวมข้อมูล.....	19
วิธีดำเนินการวิจัย.....	20
บทที่ 4 ผลการวิจัย.....	25
การเก็บตัวอย่างพืช.....	25
การแยกราเอนโดไฟต์.....	25

หน้า

	การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค.....	29
	ราเอนโดไฟต์.....	15
	การทดสอบประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจาก ราเอนโดไฟต์.....	36
	การพิสูจน์เอกลักษณ์ของราเอนโดไฟต์.....	36
บทที่ 5	สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	41
	สรุปผลการวิจัย.....	41
	อภิปรายผล.....	42
	ข้อเสนอแนะ.....	44
	บรรณานุกรม.....	45
	ภาคผนวก.....	52
	ภาคผนวก ก อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ.....	52
	ภาคผนวก ข สันฐานวิทยาของราเอนโดไฟต์ และปริมาณส่วนสกัดหยาบจาก ราเอนโดไฟต์.....	54
	ภาคผนวก ค ฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟต์.....	70
	ภาคผนวก ง การตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอและ PCR product.....	74

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 3.1	ส่วนผสมในการทำ PCR..... 23
ตารางที่ 4.1	จำนวนราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากใบเหียง..... 25
ตารางที่ 4.2	ประเภทและจำนวนราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากเหียง..... 28
ตารางที่ 4.3	ฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคของสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟต์ที่แยก จากใบเหียง อำเภอเสิงสาง..... 30
ตารางที่ 4.4	ฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคของสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟต์ที่แยก จากใบเหียง อำเภอเมือง..... 33
ตารางที่ 4.5	ฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคของสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟต์ที่แยก จากใบเหียง อำเภอแก้งสนามนาง..... 34
ตารางที่ 4.6	ค่าความเข้มข้นที่ทำให้ค่าอนุมูลอิสระลดลงครึ่งหนึ่ง (IC ₅₀) ของ สารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟต์..... 36
ตารางผนวกที่ ข-1	ลักษณะของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากใบเหียงจากอำเภอเสิงสาง ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ..... 54
ตารางผนวกที่ ข-2	ลักษณะของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากใบเหียงจากอำเภอเมือง ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ..... 60
ตารางผนวกที่ ข-3	ลักษณะของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากใบเหียงจากอำเภอ แก้งสนามนางที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ..... 63
ตารางผนวกที่ ข-4	ลักษณะและปริมาณส่วนสกัดหยาบจากราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากใบ เหียงจากอำเภอเสิงสาง..... 66
ตารางผนวกที่ ข-5	ลักษณะและปริมาณส่วนสกัดหยาบจากราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากใบ เหียงจากอำเภอเมือง..... 68
ตารางผนวกที่ ข-6	ลักษณะและปริมาณส่วนสกัดหยาบจากราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากใบ เหียงจากอำเภอแก้งสนามนาง..... 69

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 2.1	ราเอนโดไฟต์ที่อาศัยอยู่ในเซลล์พืช..... 7
ภาพที่ 2.2	การทดสอบการสร้างสารระเหยจากราเอนโดไฟต์ในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช..... 9
ภาพที่ 2.3	ราเอนโดไฟต์แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพในการควบคุมเชื้อแบคทีเรียก่อโรคพืช..... 9
ภาพที่ 2.4	โครงสร้างทางเคมีของสาร Paclitaxel..... 10
ภาพที่ 2.5	โครงสร้างทางเคมีของสาร Naphthalene..... 10
ภาพที่ 2.6	โครงสร้างทางเคมีของสารกลุ่ม Graphis lactone A..... 11
ภาพที่ 2.7	โครงสร้างทางเคมีของสาร Paclitaxel..... 19
ภาพที่ 4.1	ตัวอย่างราเอนโดไฟต์ในกลุ่ม Endophytic fungi ไอโซเลท A38..... 26
ภาพที่ 4.2	ตัวอย่างราเอนโดไฟต์ในกลุ่ม Mycelia sterilia ไอโซเลท A32..... 26
ภาพที่ 4.3	ตัวอย่างราเอนโดไฟต์ในกลุ่ม <i>Alternaria</i> sp. ไอโซเลท A72..... 27
ภาพที่ 4.4	ตัวอย่างราเอนโดไฟต์ในกลุ่ม <i>Fusarium</i> sp. ไอโซเลท C23..... 27
ภาพที่ 4.5	ตัวอย่างราเอนโดไฟต์ในกลุ่ม <i>Phomopsis</i> sp. ไอโซเลท A8..... 27
ภาพที่ 4.6	ตัวอย่างราเอนโดไฟต์ในกลุ่ม <i>Xylaria</i> sp. ไอโซเลท A55..... 28
ภาพที่ 4.7	การยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบเส้นใยรา และสารสกัดหยาบจากน้ำเพาะเลี้ยงจากราเอนโดไฟต์ C23..... 35
ภาพที่ 4.8	การยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบเส้นใยรา และสารสกัดหยาบจากน้ำเพาะเลี้ยงจากราเอนโดไฟต์ B15..... 35
ภาพที่ 4.9	การยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบเส้นใยรา และสารสกัดหยาบจากน้ำเพาะเลี้ยงจากราเอนโดไฟต์ A42..... 35
ภาพที่ 4.10	ลำดับเบสบริเวณ ITS ของราเอนโดไฟต์ A42..... 37
ภาพที่ 4.11	ชนิดของเชื้อราที่มีความคล้ายคลึงกับราเอนโดไฟต์ A42 มากที่สุด 11 อันดับ..... 38
ภาพที่ 4.12	การจัดลำดับเบสของรา <i>Aspergillus sydowii</i> 38
ภาพที่ 4.13	ลำดับเบสบริเวณ ITS ของราเอนโดไฟต์ B15..... 39
ภาพที่ 4.14	ชนิดของเชื้อราที่มีความเหมือนกับราเอนโดไฟต์ B15 มากที่สุด 9 อันดับ..... 40
ภาพที่ 4.15	การจัดลำดับเบสของรา <i>Valsaceae</i> sp..... 40

ภาพผนวกที่ ค-1	ค่าร้อยละของการยับยั้งอนุมูลอิสระ (% Inhibition) กับความเข้มข้นสารละลายมาตรฐาน Ascorbic acid ในสารละลายเอธิลอะซีเตท.....	70
ภาพผนวกที่ ค-2	ค่าร้อยละของการยับยั้งอนุมูลอิสระ (% Inhibition) กับความเข้มข้นสารสกัดหยาบจากเส้นใยราเอนโดไฟต์ A42.....	70
ภาพผนวกที่ ค-3	ค่าร้อยละของการยับยั้งอนุมูลอิสระ (% Inhibition) กับความเข้มข้นสารสกัดหยาบจากน้ำเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟต์ A42.....	71
ภาพผนวกที่ ค-4	ค่าร้อยละของการยับยั้งอนุมูลอิสระ (% Inhibition) กับความเข้มข้นสารสกัดหยาบจากเส้นใยราเอนโดไฟต์ B15.....	71
ภาพผนวกที่ ค-5	ค่าร้อยละของการยับยั้งอนุมูลอิสระ (% Inhibition) กับความเข้มข้นสารสกัดหยาบจากน้ำเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟต์ B15.....	72
ภาพผนวกที่ ค-6	ค่าร้อยละของการยับยั้งอนุมูลอิสระ (% Inhibition) กับความเข้มข้นสารสกัดหยาบจากเส้นใยราเอนโดไฟต์ C23.....	72
ภาพผนวกที่ ค-7	ค่าร้อยละของการยับยั้งอนุมูลอิสระ (% Inhibition) กับความเข้มข้นสารสกัดหยาบจากน้ำเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟต์ C23.....	73
ภาพผนวกที่ ง-1	คุณภาพของดีเอ็นเอจากราเอนโดไฟต์.....	74
ภาพผนวกที่ ง-2	PCR product ของราเอนโดไฟต์.....	75

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเป็นสารที่กำลังได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก โดยส่วนใหญ่แยกได้จากพืช สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติหลายชนิดที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพและถูกนำไปพัฒนาเพื่อผลิตเป็นยารักษาโรค หรือเพื่อป้องกันการเกิดโรคบางชนิด รวมถึงใช้ในอาหารเสริมชนิดต่าง ๆ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bioactive Compounds) คือ สารจากสิ่งมีชีวิตตามธรรมชาติที่มีผลต่อสิ่งมีชีวิตทั้งคน สัตว์ และพืช คุณลักษณะที่ดีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต้องเป็นสารที่มีผลจำเพาะเจาะจง ไม่ส่งผลทางลบต่อร่างกาย หรือมีผลข้างเคียงน้อย นอกจากฤทธิ์ทางชีวภาพแล้วอาจพบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) ได้อีกด้วย สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติบางชนิดที่ได้จากพืชแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดี ผู้นำไปใช้จึงต้องการในปริมาณที่มาก แต่พืชอาจสังเคราะห์ได้ในปริมาณน้อย ซึ่งไม่เพียงพอต่อความต้องการ จึงจำเป็นต้องใช้วัตถุดิบในการสกัดมากขึ้น โดยวัตถุดิบจากพืชที่นำมาสกัดสาร ได้แก่ ดอก ผล ลำต้น พืชจะมีข้อจำกัดในการนำมาใช้ เช่น มีเพียงบางฤดูกาล อายุของพืช หรือสิ่งแวดล้อมในการปลูก ฯลฯ และพืชบางชนิดต้องผ่านกระบวนการในห้องปฏิบัติการที่ค่อนข้างยุ่งยาก ใช้ต้นทุนในค่อนข้างสูง จึงมีความจำเป็นในการค้นหาแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแหล่งต่าง ๆ

จุลินทรีย์นับว่าเป็นแหล่งสำคัญของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในธรรมชาติ สามารถผลิตสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (Secondary metabolites) ชนิดใหม่ที่ครอบคลุมถึงเวชภัณฑ์รักษาโรค อุตสาหกรรมการเกษตร ฯลฯ (Demain. 1999 : 455-463 ; Keller and Yu. 2005 : 437-458 ; Strobel and others. 2004 : 257-268 ; Porras-Alfaro and Bayman. 2011 : 291-315) จากการสำรวจของ New Chemical Entities (NCEs) ระหว่างปี ค.ศ.1981-2005 แหล่งของเวชภัณฑ์มากกว่า 40 % ได้มาจากจุลินทรีย์ (Khosla. 1997 : 2577-2590 ; Clardy and Walsh. 2004 : 829-837 ; Sieber and Marahiel. 2005 : 715-738) การศึกษาข้อมูลพื้นฐานของจุลินทรีย์เป็นที่สนใจอย่างกว้างขวาง เนื่องจากจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตที่รวดเร็ว มีรายงานว่าการศึกษาประโยชน์ของจุลินทรีย์ต่อมนุษย์ แบ่งเป็นจุลินทรีย์พวกแบคทีเรีย 1 % และเชื้อราอีก 5 % (Staley and others. 1997 : 32) จุลินทรีย์เหล่านี้สามารถควบคุมวิถีการสังเคราะห์สารได้ภายในห้องปฏิบัติการ (Bok and others. 2006 : 31-37 ; Hertweck. 2009 : 450-452) โดยเฉพาะเลี้ยงด้วยอาหารสังเคราะห์และสารเคมีที่เหมาะสมเพื่อให้จุลินทรีย์นำไปใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึม (Metabolism) และเกิดสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติหรือสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (Bergmann and others. 2007 : 213-217 ; Knappe and others. 2008 : 11446-11454 ; Schroeckh and others. 2009 : 14558-14563 ; Riyaz-UI-Hassan and others. 2012 : 464-473)

จากรายงานการวิจัยหลายฉบับในหลายปีที่ผ่านมา พบว่าเชื้อราเป็นแหล่งจุลินทรีย์ที่น่าสนใจ โดยบางชนิดที่อาศัยอยู่ในช่องว่างระหว่างเซลล์ (Intercellular space) ของพืชด้วย

ภาวะพึ่งพาอาศัยโดยไม่ก่อให้เกิดโรคกับพืชอาศัย เรียกว่า ราเอนโดไฟต์ (Endophytic fungi) (Schulz and Boyle. 2005 : 661-686) ซึ่งราเอนโดไฟต์สามารถสังเคราะห์สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติได้ในระยะเวลาที่สั้นกว่าการสังเคราะห์สารในพืช อีกทั้งมีข้อจำกัดในการสังเคราะห์สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติน้อยกว่าในพืช การเตรียมวัตถุดิบหรือแยกสารจากราเอนโดไฟต์สามารถทำได้ทุกฤดูกาล และทำได้มากตามความต้องการ ดังนั้น จึงเป็นทางเลือกในการนำมาสกัดสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเพื่อใช้เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Strobel and others. 2004 : 257-268 ; Wang and others. 2011 : 1056-1074 ; Zhang and others. 2012 : 753-771) จากการศึกษาของ Strobel and others (1993) พบว่าราเอนโดไฟต์จาก *Taxus brerifolia* มีมูลค่าทางเศรษฐกิจกว่าสามพันห้าร้อยล้านบาท โดยสามารถผลิตสาร Taxol ที่เป็นส่วนผสมของยาต้านมะเร็ง (Stierle and others. 1993 : 214-216, Strobel and others. 2004 : 257-268 ; Wang and others. 2011 : 1056-1074 ; Zhang and others. 2012 : 753-771) ดังนั้น จึงเป็นแนวทางที่สามารถแยกสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากราเอนโดไฟต์ที่อาจแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อนำสารเหล่านั้นไปใช้ประโยชน์ด้านต่าง ๆ เช่น ด้านการเกษตร การแพทย์ อุตสาหกรรม ฯลฯ (Strobel. 2003 : 535-544 ; Wang and others. 2011 : 1056-1074 ; Zhang and others. 2012 : 753-771)

งานวิจัยในครั้งนี้มีความสนใจในการนำพืชสมุนไพรในจังหวัดนครราชสีมา คือ เหียง (*Dipterocarpus obtusifolius* Teijsm.ex Miq) ซึ่งเป็นพืชใบเลี้ยงคู่ ไม้ยืนต้นขนาดใหญ่ ที่พบกระจายพันธุ์เป็นจำนวนมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (เต็ม สมิตินันท์. 2501 : 78-82) จากภูมิปัญญาท้องถิ่นพบว่ามีความสมบัติเป็นไม้ในอุตสาหกรรมก่อสร้าง ทางภาคเหนือใช้ใบแก๋ห่อยาสูบและห่อของสดแทนใบกล้วยน้ำมันและชันใช้ทาไม้ ยาเรือหรือยาเครื่องจักรสาน นำมาเย็บเป็นตับสำหรับมุงหลังคา ทั้งนี้เหียงยังมีประโยชน์ทางด้านสมุนไพร โดยมีสรรพคุณทางยา คือ รสฝาด ต้มน้ำผสมกับเกลือ อมแก้ปวดฟัน หรือฟันโยกคลอน ใบและยาง รสฝาดร้อน ใช้กินเป็นยาตัดลูก (ทำให้ไม่มีบุตร) น้ำมันยางสมานแผล แก้หนอง ขับปัสสาวะ รักษาแผลในทางเดินปัสสาวะ แก้กษาว น้ำยางมีรสร้อน น้ำมันใช้ทาแผลภายนอก เปลือกลำต้น ใช้ต้มน้ำดื่มแก้ท้องเสีย การศึกษาครั้งนี้เพื่อสกัดสารจากราเอนโดไฟต์ และคาดว่าจะได้ข้อมูลทางชีวภาพ และความรู้ที่ได้จากงานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ในแง่ความรู้พื้นฐานที่จะนำไปสู่การนำสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพไปใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ ต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. คัดเลือกราเอนโดไฟต์จากพืชสมุนไพรในจังหวัดนครราชสีมาที่สร้างสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ
2. ศึกษาสารสกัดจากราเอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์ต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรค
3. ศึกษาสารสกัดจากราเอนโดไฟต์ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ
4. พิสูจน์เอกลักษณ์ราเอนโดไฟต์ที่สร้างสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล

ความสำคัญของการวิจัย

1. ได้ราเอนโดไฟต์
2. ได้สารสกัดจากราเอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ
3. ทราบถึงฤทธิ์ต่อเชื้อแบคทีเรียและความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากราเอนโดไฟต์
4. เป็นฐานข้อมูลชนิดของราเอนโดไฟต์

ขอบเขตของการวิจัย

ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากใบเหียงในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์ และใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ศึกษาชนิดของราเอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพโดยวิธีทางชีวโมเลกุล

1. ประชากร ได้แก่ ราเอนโดไฟต์
2. กลุ่มตัวอย่าง
 - 2.1 เชื้อแบคทีเรียก่อโรค ที่
 - 2.2 สารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากใบเหียง
3. ชนิดของตัวแปร
 - 3.1 ตัวแปรจัดกระทำ ได้แก่ ราเอนโดไฟต์ที่แยกจากใบเหียง
 - 3.2 ตัวแปรตาม
 - 3.2.1 ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์
 - 3.2.2 ประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ
 - 3.3 ตัวแปรควบคุม ได้แก่ ปริมาณสารสกัด ปริมาณเชื้อแบคทีเรีย อาหารเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย วิธีวิเคราะห์ สารต้านอนุมูลอิสระ

สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการชีววิทยา ชั้น 4 อาคารศูนย์วิทยาศาสตร์ (อาคารจุฬารัตนวลัยลักษณ์) มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา

กรอบแนวคิดในการวิจัย

เหียง (*Dipterocarpus obtusifolius* Teijsm.ex Miq) เป็นพืชท้องถิ่นที่มีจำนวนมากสามารถนำส่วนต่าง ๆ ของพืชมาใช้ประโยชน์ เก็บตัวอย่างใบจากจังหวัดนครราชสีมา นำมาคัดแยกเชื้อราเอนโดไฟต์แล้วเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเพื่อสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ จากนั้นนำมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์ ความสามารถในการเป็นสาร

ต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการพัฒนาสารควบคุมและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติให้เกิดประโยชน์

สมมุติฐานการวิจัย

สารสกัดราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากเหียง มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์ได้แตกต่างกัน และมีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้แตกต่างกัน

นิยามคำศัพท์เฉพาะ

1. ราเอนโดไฟต์ หมายถึง เชื้อราที่อาศัยอยู่บริเวณช่องว่างระหว่างเซลล์ของพืช โดยไม่ก่อโรคกับพืชผู้ให้อาศัย
2. สารสกัดจากราเอนโดไฟต์ หมายถึง สารสกัดจากราเอนโดไฟต์สกัดโดยใช้สารละลายเอธิลอะซีเตท
3. เชื้อแบคทีเรียก่อโรค หมายถึง เชื้อแบคทีเรียที่ทำให้มนุษย์เกิดโรค
4. การยับยั้ง หมายถึง ผลของสารสกัดที่ทำให้เชื้อแบคทีเรียก่อโรคหยุดการเจริญเติบโต หรือไม่มีการเจริญเติบโต
5. สารต้านอนุมูลอิสระ หมายถึง โมเลกุลของสารที่สามารถจับกับตัวรับและสามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลสารอื่น ๆ
6. เหียง หมายถึง พืชวงศ์ DIPTEROCARPACEAE ชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Dipterocarpus obtusifolius* Teijsm.ex Miq ลักษณะเป็นไม้ยืนต้นขนาดใหญ่ ใบเลี้ยงคู่
7. ประสิทธิภาพ หมายถึง ความสามารถของสารสกัดจากราเอนโดไฟต์ ในการเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ
8. สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ หมายถึง สารจากสิ่งมีชีวิตตามธรรมชาติที่มีผลต่อสิ่งมีชีวิตทั้งคน สัตว์ และพืช ต้องเป็นสารที่มีผลจำเพาะเจาะจง

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เหียง

เหียง เป็นพืชวงศ์ DIPTEROCARPACEAE

ชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Dipterocarpus obtusifolius* Teijsm. ex Miq.

ชื่อสามัญ คือ Hairy Keruin

ชื่ออื่น คือ ตะแบง (ภาคตะวันออก) สะแบง (จังหวัดอุดรธานีและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ) ตาด (พินธุโลกและจันทบุรี)

1. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ไม้ต้นขนาดใหญ่ สูง 8-30 เมตร ผลัดใบ เปลือกหนา สีน้ำตาลหรือเทา แตกเป็นสะเก็ดหนา และเป็นร่องลึกตามยาว เนื้อไม้สีแดงอ่อนถึงน้ำตาลปนแดง เรือนยอดเล็กสปีรอนส์ ออกสีเขียว

กิ่งอ่อนและใบ มีขนสีขาวปกคลุม ใบเดี่ยว เรียงเวียนสลับ แผ่นใบรูปไข่ ขนาดใหญ่ กว้าง 10-20 เซนติเมตร ยาว 13-25 เซนติเมตร ปลายมน โคนมนหรือหยักเว้าตื้น ฐานเป็นรูปหัวใจ

ดอก เป็นช่อเดี่ยวตามซอกใบใกล้ปลายกิ่ง กลุ่มละ 3-7 ดอก ขนาดดอก 3.5-5 เซนติเมตร แกนกำนรูปสลับฟันปลา ก้านช่อดอกยาว 2-5 เซนติเมตร และมีขนหนาแน่น ก้านดอกย่อยมีตั้งแต่สั้นมากจนยาวได้ถึง 1 เซนติเมตร กลีบดอก 5 กลีบ สีชมพูสด กลีบดอกรูปกรวย โคนกลีบชิดกันปลายบิดเวียนเป็นรูปกังหัน เส้นผ่าศูนย์กลางดอก 4-5 เซนติเมตร ขนาดกลีบ กว้าง 0.5-1 เซนติเมตร ยาว 4.8-5 เซนติเมตร ผิวด้านนอกมีขนสั้นปกคลุมรูปดาว เกสรตัวผู้มีประมาณ 30 อัน อัดแน่นรอบรังไข่ อับเรณูรูปหัวลูกศร รังไข่อยู่เหนือวงกลีบ มีขน มี 3 ช่อง แต่ละช่องมีออวุล 2 เม็ด กลีบเลี้ยงขนาด 1.4 เซนติเมตร มี 5 กลีบ มีขนหนาแน่น ใบประดับที่ก้านดอกย่อยรูปใบหอกหรือรูปแถบ กลีบเลี้ยงโคนเชื่อมติดกันเป็นรูปถ้วย ยาว 1-1.5 เซนติเมตร ปลายแยกเป็น 5 แฉก มีสองขนาด แฉกยาว 2 แฉก กว้าง 2-3 มิลลิเมตร ยาว 1-1.2 เซนติเมตร แฉกสั้น 3 แฉก กว้างประมาณ 3 มิลลิเมตร ยาว 4-5 มิลลิเมตร

ผลและเมล็ด ผลผนังชั้นในแข็ง ผลกลม แข็ง เกลี้ยง ไม่มีสันหรือปุ่มด้านบน เมื่ออ่อนมีขนปกคลุม เมื่อแก่เรียบเกลี้ยง ผลแก่สีน้ำตาลเป็นมัน เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3 เซนติเมตร ปีกที่พัฒนามาจากกลีบเลี้ยงมี 5 ปีก ปีกยาวรูปขอบขนาน 2 ปีก กว้าง 2.3 เซนติเมตร ยาวประมาณ 13 เซนติเมตร มีเส้นตามยาวปีก 1 เส้น เส้นย่อยสานเป็นร่างแห อีก 3 ปีกเล็ก มีขนาดยาว 1-1.5 เซนติเมตร มีหยักลึก ปีกอ่อนสีแดงสด เมล็ด 1 เมล็ด

นิเวศวิทยาและการแพร่กระจาย การกระจายพันธุ์กว้างขวางในแถบภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ตั้งแต่ประเทศพม่า มลายู ลาว กัมพูชา และเวียดนาม ในประเทศไทย

พบทั่วไปทุกภาค เป็นไม้เด่นที่พบในป่าเต็งรัง พบขึ้นตามป่าแพะ เบญจพรรณแล้ง บางครั้งพบในป่าดิบ (เต็ม สมิตินันท์. 2538 : 51-53) โดยเหียงสามารถใช้ประโยชน์ได้ตลอดทั้งปี

2. การนำไปใช้ประโยชน์

ด้านสมุนไพร ใบ ใช้ต้มกับเกลือแก้ปวดฟัน แก้ฟันโยกคลอน ใบและน้ำมันยาง ใช้กินเป็นยาตัดลูก สมานแผล แก้หนอง ขับเสมหะ ขับปัสสาวะ รักษาแผลในทางเดินปัสสาวะ แก้ตกขาว เปลือก ใช้ต้มน้ำดื่ม แก้ท้องเสีย

ด้านอาหาร กลีบดอกรับประทานได้ มีรสเปรี้ยวเล็กน้อย ชาวบ้านใช้จิ้มน้ำพริก

ด้านอื่น ๆ ได้แก่ เนื้อไม้ นำมาใช้ในการสร้างบ้าน สร้างคอกสัตว์ ยางไม้ ใช้ยาเครื่องจักสาน ยาไม้แนวเรือ ทำได้ ทาไม้ ใบแก่ เย็บเป็นตับมุงหลังคา กั้นฝา ห่ออาหาร

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

รายงานหลายฉบับให้ความหมายของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ คือ สารจากสิ่งมีชีวิตตามธรรมชาติที่มีผลต่อสิ่งมีชีวิตทั้งคน สัตว์ และพืช ซึ่งสอดคล้องกับ วรณฤดี หิรัญรัตน์ (2552) กล่าวว่า สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีต้องเป็นสารที่มีความจำเพาะเจาะจง เช่น มีฤทธิ์จำเพาะต่อเซลล์ของมะเร็งเต้านม มีฤทธิ์จำเพาะต่อเชื้อวัณโรค ฯลฯ และสารนั้นจะต้องไม่ส่งผลทางลบต่อร่างกาย หรือมีผลข้างเคียงน้อยมาก เพราะเมื่อสารนั้นถูกนำมาแปรรูปให้เป็นส่วนประกอบของยา

ในปี 1993 และ 2001 พบสารประกอบที่แยกได้จากรากประมาณ 1,500 ชนิด ในจำนวนดังกล่าวมากกว่าครึ่งมีคุณสมบัติยับยั้งแบคทีเรีย รา หรือยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ (Keller and Yu. 2005 : 437-458) นอกจากนี้ ยังมีการรายงานว่าสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิ โดยเฉพาะสารปฏิกิริยาระหว่างไดนาไมซ์ใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ ได้แก่ ยับยั้งการอักเสบ ป้องกันระบบภูมิคุ้มกันและยังส่งผลต่อระบบนิเวศอีกด้วย ทำให้เกิดความสัมพันธ์ระหว่างพืชและสัตว์กินพืช แผลงกับแมลง และพืชกับพืช บางครั้งเรียกสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิว่าเป็น “สารพิษจากพืช” องค์ประกอบเป็นโพลีคีไทด์ (Polyketides) เปปไทด์ (Peptides) และเทอร์ปีน (Terpene) มีผลต่อการเจริญเติบโตของพืช กระตุ้นฮอร์โมนพืช และเป็นภูมิคุ้มกันในการป้องกันโรคติดต่อ

ราเอนโดไฟต์ (Endophytic fungi)

หมายถึง เชื้อราที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืช บางครั้งอาศัยอยู่ในเซลล์หรือช่องว่างระหว่างเซลล์ของพืชในเนื้อเยื่อต่าง ๆ เช่น ราก ลำต้น ใบ ก้านใบ ฯลฯ พบราเอนโดไฟต์ได้ในพืชทุกชนิดและมีความเกี่ยวข้องกับพืชในสภาวะพึ่งพาอาศัยกัน โดยพืชให้ที่อยู่อาศัย เป็นแหล่งอาหาร และปกป้องเชื้อราจากสภาวะที่ไม่เหมาะสม เช่น ความร้อนความแห้งแล้ง ส่วนราเอนโดไฟต์จะสร้างสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิที่เป็นประโยชน์ต่อพืช เช่น สารที่ส่งเสริมการเจริญของพืช สารช่วยยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคพืชหรือสารป้องกันสัตว์กินพืช (Hawksworth.

1991 : 641-655) ส่งเสริมให้พืชมีความสามารถต้านทานสภาวะขาดแคลนอาหาร (Petrini. 1991 : 179-187)

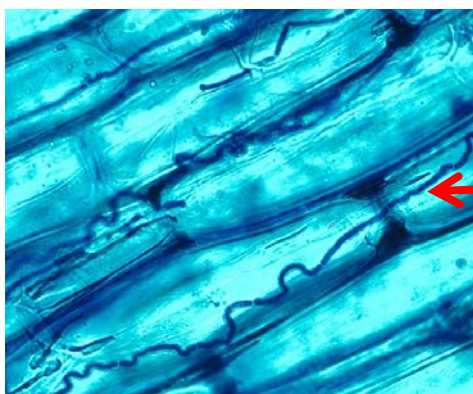
1. การจำแนกราเอนโดไฟต์

การจำแนกรากลุ่มราเอนโดไฟต์ในทางนิเวศวิทยา สามารถแบ่งราเอนโดไฟต์ได้เป็น 2 กลุ่ม ดังนี้ (กฤต เพชรสุวรรณ, วินัส สุวรรณกันต์ และ ศวรี ตันติกุล. 2543 : บทคัดย่อ)

2.1 Clavicipitaceous grass endophyte เป็นราเอนโดไฟต์ที่อาศัยอยู่ในพืชตระกูลหญ้า ซึ่งเป็นเชื้อราที่อยู่ในวงศ์ CLAVICIPITACEAE การค้นพบครั้งแรกของราเอนโดไฟต์ในกลุ่มนี้คือ พบในเมล็ดของหญ้า *Lolium tumulentum* L. ซึ่งเป็นวัชพืชในแปลงปลูกพบโดย Vogl ในปี ค.ศ.1989 หลังจากนั้นมีการรายงานพบเชื้อรากลุ่มนี้อย่างต่อเนื่อง โดยพบในพืชตระกูลหญ้า เช่น หญ้าตระกูล Poaceae หญ้าตระกูล Cyperaceae หญ้าตระกูล Janeaceae ฯลฯ โดยคาดว่ามีความถี่ของพืชตระกูลหญ้ามามากกว่า 80 สกุล และมากกว่าร้อยละยี่สิบที่พบรากลุ่มนี้อาศัยอยู่

2.2 Non-Clavicipitaceous grass endophyte เป็นราเอนโดไฟต์ที่อาศัยอยู่ในไม้ยืนต้นหรือไม้พุ่ม และยังรวมถึงราเอนโดไฟต์ที่ไม่ได้อยู่ในวงศ์ CLAVICIPITACEAE ราเอนโดไฟต์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ เชื้อราในดิวิชันย่อย Ascomycotina, Deuteromycotina, Zygomycotina และ Basidiomycotina

ราเอนโดไฟต์ของพืชตระกูลหญ้าเป็นที่รู้จักกันมาแล้วมากกว่า 70 ปี แต่การศึกษาราเอนโดไฟต์ที่อาศัยอยู่ในไม้ยืนต้นและไม้พุ่มเริ่มได้รับการศึกษาเพียงกว่า 20 ปีที่ผ่านมา โดยเริ่มทำการศึกษาจากต้นสนพันธุ์ยุโรป ต่อมาภายหลังจึงเริ่มมีรายงานการรวบรวมรายชื่อพืชที่พบราเอนโดไฟต์อาศัยอยู่ โดยพืชพวกจิมโนสเปิร์ม (Gymnosperm) และพืชพวกแองจิโอสเปิร์ม (Angiosperm) ทั้งหมดที่มีราเอนโดไฟต์อาศัยอยู่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง



ภาพที่ 2.1 ราเอนโดไฟต์ที่อาศัยอยู่ในเซลล์พืช

ที่มา: Nick. Online. 2016.

2. ความสัมพันธ์ระหว่างราเอนโดไฟต์กับพืชในทางนิเวศวิทยา

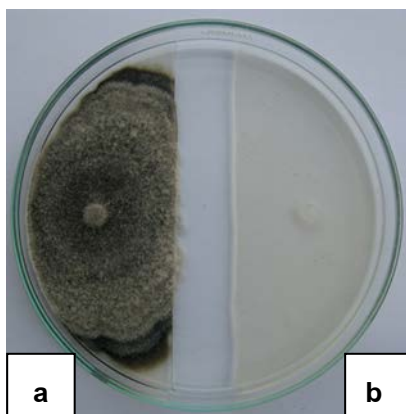
ราเอนโดไฟต์จะอาศัยอยู่ในพืช โดยไม่ก่อให้เกิดโรคกับพืชที่ราเอนโดไฟต์อาศัยอยู่ (Strobel and others. 2001 : 2943-2950) โดยอาศัยอยู่ในช่องว่างระหว่างเซลล์ของส่วนต่าง ๆ ของพืช ได้แก่ ลำต้น เปลือก ท่อลำเลียงน้ำ ใบ เส้นใบ ราก และเมล็ด ราเอนโดไฟต์มีความเกี่ยวข้องกับพืชในลักษณะพึ่งพากันและสภาวะที่อยู่ร่วมกัน โดยฝ่ายหนึ่งได้รับประโยชน์แต่อีกฝ่ายไม่ได้รับประโยชน์และไม่ได้รับอันตราย (Commensalism) แต่บางครั้งอาจทำให้เกิดพยาธิสภาพกับพืชผู้ให้อาศัยได้ถ้าพืชนั้นเกิดความอ่อนหรือเกิดสภาวะเครียด (Dariusz and others. 2000 : 923-940) โดยจะพบราเอนโดไฟต์ได้ในพืชตระกูลหญ้า ไม้ผลัดใบ ไม้ยืนต้น ไม้พุ่ม (Strobel and others. 2003 : 535-544)

3. การศึกษาสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพของราเอนโดไฟต์

โดยส่วนใหญ่มักศึกษาจากพืชสมุนไพรหรือพืชที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยสันนิษฐานว่าราเอนโดไฟต์ที่อาศัยอยู่ร่วมกับพืชอาจมีความสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดเดียวกับสารที่พืชผู้ให้อาศัยผลิตได้

รายงานการวิจัยเกี่ยวกับสารผลิตภัณฑ์ของราเอนโดไฟต์

ราเอนโดไฟต์จำนวนหลายชนิดที่ยังไม่ได้มีการศึกษาถึงสารที่ราเอนโดไฟต์ผลิตหลังจากปี ค.ศ. 1907 Darnel (Tan. 2001 : 448-459) ได้ศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่คาดว่าจะแหล่งของสารเมแทบอไลต์เพื่อใช้ทางการแพทย์ การเกษตร และทางอุตสาหกรรม (Tan. 2001 : 448-459 ; Strobel and others. 2004 : 257-268) ได้ศึกษาโดยละเอียดถึงโครงสร้างของสารที่ราเอนโดไฟต์ผลิตขึ้น พบสารต่าง ๆ ดังนี้ แอลคาลอยด์ (Alkaloid) สารอนุพันธ์ของอินโดล (Indole derivative) เลซิธิน (Lecithin) สเตียรอยด์ (Steroid) เทอร์ปีนอยด์ (Terpenoids) อนุพันธ์ของไอโซโคมาลีน (Iso-coumarine derivative) ควินิน (Quinine) ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) ฟีนิลโพรพานอยด์ (Phenylpropanoids) เปปไทด์ (Peptide) ฟีนอล (Phenol) กรดฟีนอลิก (Phenolic acid) สารประกอบแอมฟาทิก (Aliphatic Compounds) และสารอื่นอีกเป็นจำนวนมาก และเมื่อไม่นานมานี้ได้มีการรายงานพบว่าออร์โมนที่มีผลต่อพืชที่แยกได้จากราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ *Colletotrichum gloeosporioides* สามารถเหนี่ยวนำให้แคลลัสของพืชเจริญเติบโตได้

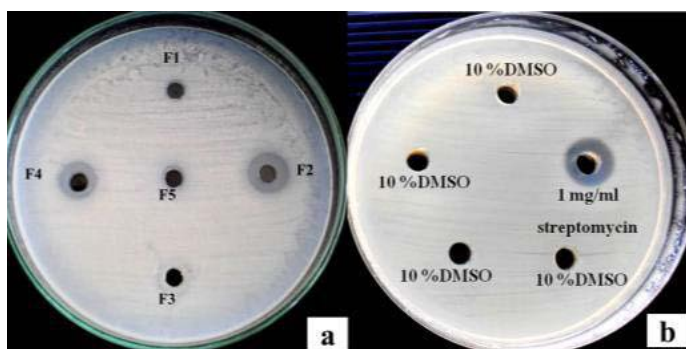


ภาพที่ 2.2 การทดสอบการสร้างสารระเหยจากราเอนโดไฟต์ในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช
(a คือ ราเอนโดไฟต์ *Cordana* sp., b คือ เชื้อราก่อโรคพืช *Wodulisporium* sp.)

ที่มา: ดัดแปลงจาก Lee and others. Online. 2009.

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอนโดไฟต์

สารประกอบจากราเอนโดไฟต์บางชนิดสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นได้ เช่น แบคทีเรีย ไวรัส โปรโตซัว ฯลฯ นอกจากนี้ยังมีผลต่อมนุษย์และสัตว์ชนิดอื่นด้วย (Strobel. 2003 : 535-544) ตัวอย่างเช่น ราสายพันธุ์ *Crinipellis perniciosa* ซึ่งเป็นเชื้อราก่อโรคพืชทำให้เกิดโรค 'Witch's Broom' ถูกยับยั้งโดยราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากต้นโกโก้ (Rubini and others. 2005 : 24-33) ราเอนโดไฟต์บางชนิดสร้างสารระเหยที่มีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ที่ ได้แก่ ราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ *Muscador albus* ที่แยกได้จากต้น *Cinnamomum zeylanicum* หรือต้นชะเอม (Strobel and others. 2001 : 2943-2950)

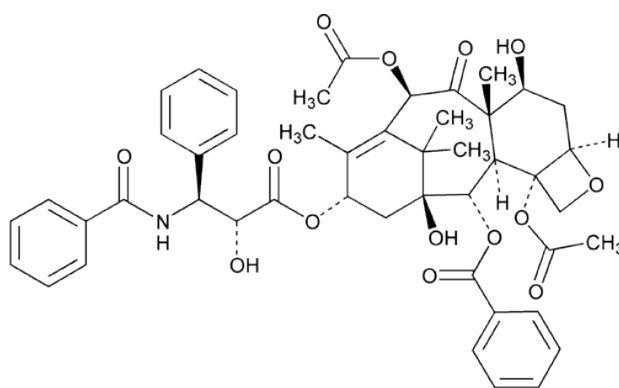


ภาพที่ 2.3 ราเอนโดไฟต์แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพในการควบคุมเชื้อแบคทีเรียก่อโรคพืช
(a คือ สารสกัดที่ได้จากราเอนโดไฟต์ และ b คือ สารควบคุม)

ที่มา: ภัทรพรพรรณ พรหมแก้ว, สายสมร ลำยอง และบุญสม บุญบรรณ. 2559. 157.

1. สารผลิตภัณฑ์จากราเอนโดไฟต์ในการต่อต้านมะเร็งและเนื้องอก

ราเอนโดไฟต์ที่พบในต้นหลิว *Psetalotiopsis* spp. ได้แก่ ราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ *P. microspora* สามารถสร้างสาร Paclitaxel โครงสร้างดังภาพที่ 2.4 ในการต่อต้านเซลล์มะเร็ง (Strobel and others. 1996 : 435-440) Podophyllotoxin ใช้เป็นยาต้านโรคมะเร็ง ซึ่งเป็นสารจากราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากต้น *Podophyllum peltatum* (Eyberger, Dondapati and Porter. 2006 : 1121-1124) สารต่อต้านการเกิดเนื้องอกจากราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากพืชสมุนไพรโดยทำการทดสอบกับ HL-60 ตัวอย่างเช่น สารเมแทบอลิต์จากเชื้อ *Aspergillus palasiticus* ซึ่งเป็นราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากต้น Redwood

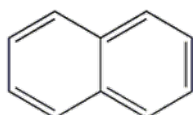


ภาพที่ 2.4 โครงสร้างทางเคมีของสาร Paclitaxel

ที่มา : Feiwen. Online. 2007

2. ผลิตภัณฑ์จากราเอนโดไฟต์ที่ใช้ในการควบคุมแมลง

สารควบคุมแมลงทางชีวภาพที่แยกได้จากราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ *Muscador vipigenus* ที่แยกได้จากต้น *Paullinia paulinioides* โดยราเอนโดไฟต์ชนิดนี้สามารถสร้างสาร Naphthalene โครงสร้างดังภาพที่ 2.5 ซึ่งมีผลในการรบกวนแมลง (Daisy and others. 2002 : 3737-3741) และราเอนโดไฟต์ชนิดอื่น ๆ เช่น *Phomopsis phaseoli* ซึ่งแยกได้จากพืชในป่าเขตร้อน มีความสามารถในการสร้างสาร 3-hydroxypropionic acid ซึ่งมีฤทธิ์ในการต่อต้านตัวอ่อนของแมลง (Schwarz. 2004 : 2239-2245)

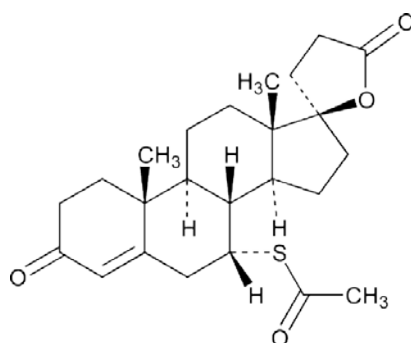


ภาพที่ 2.5 โครงสร้างทางเคมีของสาร Naphthalene

ที่มา : Todd. Online. 2016

3. ผลผลิตจากราเอนโดไฟต์ในการเป็นสารต่อต้านอนุมูลอิสระ

ราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากต้น *Podophyllum hexandrus* สามารถสร้างสาร Podophyllotoxin ซึ่งมีการประยุกต์ใช้ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Puri and others. 2006 494-510) สาร Graphis lactone A โครงสร้างดังภาพที่ 2.6 จากราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ *Cephaloporum* sp. IFB – 001 โดยแยกได้จากต้น *Trachelospermum jasminoides* พบว่ามีความสามารถเป็นสารต่อต้านอนุมูลอิสระได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Song and others. 2005 : 506-509)



ภาพที่ 2.6 โครงสร้างทางเคมีของสารกลุ่ม Graphis lactone A

ที่มา : Andrzej. Online. 2007

4. ผลผลิตจากราเอนโดไฟต์ในการเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

สาร Neurotoxin ได้แก่สาร Lolitren B ซึ่งมีโครงสร้างเป็น Indole diterpene จากราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ *Neotyphodium lolii* มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของ hSlo-large calcium potassium ของตับโดยศึกษาจากตัวอ่อนของมนุษย์ (Dalziel Finch and Dunlop. 2005 : 421-426) สาร Cytochalasin F มีฤทธิ์ในการยับยั้งการสังเคราะห์แสงของพืช ซึ่งสกัดได้จากราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ *Geniculosporium* sp. โดยคัดแยกได้จากต้น *Teucrium scorodonia*

การจัดจำแนกราเอนโดไฟต์

ในอดีตการจัดจำแนกราเอนโดไฟต์จะทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและระบุชนิดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แต่ราเอนโดไฟต์ส่วนใหญ่มีความคล้ายคลึงกันมากทำให้ระบุชนิดได้ยาก (Zhang and others. 2006 : 753-771 ; Hyde and Soyong. 2007 : 281-289) นอกจากนี้ราเอนโดไฟต์จำนวนมากในสภาวะการเพาะเลี้ยงไม่สามารถสร้างสปอร์ได้ (Lacap and others. 2003 : 53-66) จึงทำให้เกิดการพัฒนาวิธีการจัดจำแนกโดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลซึ่งทำให้เราทราบถึงความหลากหลายและลักษณะทางอนุกรมวิธาน วิธีการนี้ให้ผลสำเร็จและมีความแม่นยำสูง (Johnston and Jones. 1997 : 420-430 ; Mazzaglia and

others. 2001 : 670-675 ; Vega and others. 2010 : 122-138) การศึกษาลักษณะทางชีวโมเลกุลจะทำการศึกษาถึงการจัดลำดับเบสของ rDNA แล้วนำไปใช้ในการจัดหมวดหมู่ ปัจจุบันได้มีการวิเคราะห์ลำดับเบสบนตำแหน่ง ITS (Internal transcribed spacers) ได้แก่ ITS1 ITS4 เพื่อใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของราเอนโดไฟต์เพราะวิธีการนี้มีความถูกต้องแม่นยำสูงโดยใช้เปรียบเทียบในฐานข้อมูลของ Genbank (Vilgalys. 2003 : 4-5 ; Arnold and Lutzoni. 2007 : 541-549 ; Cai and others. 2009 : 183-204) แล้วอาศัยวิธีการพิสูจน์เอกลักษณ์อื่น ๆ ร่วมด้วย

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

สุทธิณี ลิขิตตระกูลรุ่ง. (2546) แยกราเอนโดไฟต์จากต้นมะเขือเทศ พริก และมะเขือพวง โดยนำส่วนของกิ่งใบ และก้านใบ มาเชื้อที่ผิวด้วยวิธี Triple sterilization ได้ราเอนโดไฟต์จำนวน 611 ไอโซเลท ทดสอบประสิทธิภาพของราเอนโดไฟต์ ในการควบคุมโรคใบไหม้ของมะเขือเทศในโรงเรือน โดยแช่เมล็ดของมะเขือเทศใน Suspension ของราเอนโดไฟต์ชนิดต่าง ๆ พบว่าต้นมะเขือที่แช่ด้วย *Xylaria* sp. No. 381 มีดัชนีการทำลายของโรคน้อยที่สุด ส่วนการควบคุมโรคใบไหม้โดยการพ่นราเอนโดไฟต์บนต้นมะเขือเทศ พบว่าวิธีที่พ่น *Xylaria* sp. No.381 มีดัชนีการทำลายของโรคน้อยที่สุดแตกต่าง ๆ อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับ *Fusarium* sp. No.158

กนกวรรณ สว่าง และคณะ. (2547) ศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเชื้อ *Bipolaris oryzae* ที่เป็นสาเหตุโรคพืช 12 สายพันธุ์ สามารถคัดเลือกเชื้อรา *Bipolaris oryzae* สำหรับใช้ในการทดลองครั้งนี้ หลังจากทำการแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพให้บริสุทธิ์ จากสารสกัดเอธิลอะซีเตท โดยใช้เทคนิคทางโครมาโทกราฟี แยกสารได้ทั้งหมด 7 ชนิด แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มของ Ophiobolins 4 ชนิด ได้แก่ 3-anhydroophiodolin A, Ophiobolin I, Ophiobolin A, และ 6-ophiobolin A และสารในกลุ่ม Cochlioquinones 3 ชนิด ได้แก่ Isocochlioquinone A, Isocochlioquinone C และ Anhydrocochlioquinone A โดยสารทั้ง 7 ชนิดยังไม่เคยมีการรายงานมาก่อน การพิสูจน์โครงสร้างของสารใช้วิธีทางสเปกโทรสโคปีและเปรียบเทียบกับข้อมูลที่เคยมีการรายงานไว้แล้ว จากการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งและการศึกษาการยับยั้งเอนไซม์ Acetylcholinesterase สาร 2 มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งทั้ง Hela และ KB ดีที่สุด โดยมีค่า $IC_{50} < 0.1$ และ $0.89 \mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ ในส่วนของฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Acetylcholinesterase สาร 1 2 3 4 5 และ 7 แสดงฤทธิ์ยับยั้งที่ระดับความเข้มข้น $1 \mu\text{g/ml}$

นุชจิรา อ่อนนวล และคณะ. (2547) วิจัยเรื่องสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพราเอนโดไฟต์ที่แยกจากเปล้าใหญ่ (*Croton oblongifolius*) ในจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยเก็บตัวอย่างส่วนที่เป็นใบอ่อน ใบแก่ กิ่ง และเปลือกของเปล้าใหญ่ แยกราเอนโดไฟต์ได้ 47 ไอโซเลท เมื่อทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ทดสอบของสารสกัดราเอนโดไฟต์โดยใช้วิธี Agar well diffusion method พบว่าราเอนโดไฟต์ไอโซเลต CuLm17 สามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดี จากการจัด

จำแนกสายพันธุ์โดยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่า ราเอนโดไฟต์ไอโซเลต CuLm17 คือ *Penicillium* sp. เมื่อเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟต์ไอโซเลต CuLm17 ในอาหารเหลว มอลท์สกัด แล้วแยกสารให้บริสุทธิ์โดยวิธีทางโครมาโทกราฟีและการตกผลึก ได้สารบริสุทธิ์ 2 ชนิด คือสาร ME1 และ สาร ME2 เมื่อวิเคราะห์โครงสร้างของสารที่แยกได้ โดยอาศัยสมบัติทางกายภาพ ใช้เทคนิคทางสเปกโทรสโคปี (IR, MS, UV, ^1H , ^{13}C NMR และ 2D NMR) และเทคนิค X-ray พบว่าสารบริสุทธิ์ ME1 คือ Folipastatin และสารบริสุทธิ์ ME2 คือ Unguinol เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่าสาร Folipastatin มีฤทธิ์ยับยั้ง *B. subtilis* ATCC 6633, *S.aureus* ATCC 25923, *E.coli* ATCC 25922 และ *P. aeruginosa* ATCC 27853 โดยมีค่า MIC เท่ากับ 164.5, 657.9, 328.9 และ 328.9 μm ตามลำดับ รวมทั้งมีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งทดสอบ HEP - G2 (ตับ), SW - 620 (ลำไส้ใหญ่), CHAGO (ปอด), KATO - 3 (กระเพาะอาหาร) และ BT- 474 (เต้านม) โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 15.7, 15.3, 14.5, 15.8 และ 22.6 μm ตามลำดับ และสาร Unguinol มีฤทธิ์ยับยั้ง *B.subtilis* ATCC 6633, *S.aureus* ATCC 25923, *E.coli* ATCC 25922 และ *P. aeruginosa* ATCC 27853 โดยมีค่า MIC เท่ากับ 191.7, 1533.7, 1533.7 และ 1533.7 μm ตามลำดับ รวมทั้งมีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งทดสอบ KATO-3 (gastric) โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 21.2 μm แต่สารทั้ง 2 ชนิดไม่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

พรเทพ ชมชื่น. (2547) การศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอนโดไฟต์ *Phomopsis* sp. ไอโซเลต USIA 5 จากผักหวานเมา (*Urobotrya siamensis*) และไอโซเลต LRUB 20 จากกะตังใบ *Leea rubra* โดยนำสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟต์ไอโซเลต LRUB 20 มาแยกสารบริสุทธิ์โดยเทคนิคโครมาโทกราฟีได้สาร 3 ชนิด คือ Asterric acid, 2-hydroxymethyl-3-methyl-cyclopent-2-enone และ 2-hydroxymethyl-3-methyl-cyclopentanone สารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟต์ไอโซเลต USIA 5 แยกสารบริสุทธิ์ได้ 1 ชนิด คือ 3-nitropropionic acid การพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของสารใช้วิธีวิเคราะห์ข้อมูล UV , IR , MS และ NMR ร่วมกับการเปรียบเทียบข้อมูลที่มีรายงานมาแล้ว เมื่อนำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ไปทดสอบทางชีวภาพ พบว่าสาร Asterric acid, 2-hydroxymethyl-3-methyl-cyclopent-2-enone และ 3-nitropropionic acid แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ด้วยค่า MIC เท่ากับ 200, 200 และ 0.39 g/ml ตามลำดับ การศึกษาทางสัณฐานวิทยาและการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ ITS1 – 5.8S-ITS2 ของ rDNA สามารถจำแนกประเภทราเอนโดไฟต์ไอโซเลต USIA 5 คือ *Phomopsis* sp. ในวงศ์ Diaporthaceae ขณะที่การศึกษาทางสัณฐานวิทยาพบว่าราเอนโดไฟต์ไอโซเลต LRUB 20 ไม่สร้างสปอร์ จึงจำแนกประเภทราเอนโดไฟต์ ไอโซเลต LRUB 20 ไว้ในวงศ์ Magnaporthaceae

สินทวี สิงห์วงศ์วัฒน์. (2547) ศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอนโดไฟต์ที่แยกจากกระท่อม (*Mitragyna speciosa* Korth) โดยเก็บตัวอย่างใบกระท่อมจากจังหวัดปทุมธานี อโยธยา และสุราษฎร์ธานี แยกได้ทั้งหมด 39 ไอโซเลต ทำการทดสอบฤทธิ์ของราเอนโดไฟต์ด้วยวิธี Dual-culture agar diffusion พบว่าราเอนโดไฟต์ไอโซเลต P03 สามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ดีที่สุด เมื่อนำมาจัดจำแนกสายพันธุ์โดยศึกษา

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของ rDNA พบว่า ราเอนโดไฟต์ P03 คือ *Glomerella cingulate* จากนั้นทำการแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยนำราเอนโดไฟต์ P03 มาเลี้ยงในอาหารเหลว Sabouraud dextrose ทำการแยกสารบริสุทธิ์จากน้ำหมักและเส้นใยของราด้วยวิธีโครมาโทกราฟี และการตกผลึก และวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสารดังกล่าว โดยอาศัยสมบัติทางกายภาพ และเทคนิคทางสเปกโทรสโคปี พบว่า เมื่อแยกส่วนสกัดเอธิลอะซีเตทจากเส้นใยได้ของผสม 1 ชนิดคือ น้ำมัน (ของผสม 1) และสารบริสุทธิ์ 1 ชนิดคือ Ergosterol peroxide (สารบริสุทธิ์ 1) เมื่อแยกส่วนสกัดเอทานอลจากเส้นใย ได้สารบริสุทธิ์ 1 ชนิดคือ Ursolic acid (สารบริสุทธิ์ 2) นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้มาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และ *Candida albican* ATCC 10231 ด้วยค่า MIC เท่ากับ 15.6 (36.4), 15.6 (36.4), 15.6 (36.4) และ 61.25 (143.1) µg/ml ตามลำดับ และมีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับ (HEP-G2) เซลล์มะเร็งปอด (CHAGO) เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (SW620) เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO-3) และเซลล์มะเร็งเต้านม (BT474) โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 5.0 (11.7), 6.3 (14.7), 5.2 (12.1), 5.8 (13.6), และ 8.5 (19.2) µg/ml ตามลำดับ สำหรับสารบริสุทธิ์ 2 มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ จุลินทรีย์ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และ *Candida albican* ATCC 10231 ด้วยค่า MIC เท่ากับ 125 (274.1), 125 (174.1), 250 (548.2), 125 (274.1) และ 125 (274.1) µg/ml ตามลำดับและมีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง เซลล์มะเร็งตับ (HEP-G2) เซลล์มะเร็งปอด (CHAGO) เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (SW620) เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO-3) และเซลล์มะเร็งเต้านม (BT474) โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 5.4 (11.8), 5.6 (12.3), 0.8 (1.7), 0.5 (1.1) และ 0.7 (1.5) µg/ml ตามลำดับ

จันทิมา อุทะกะ. (2548) ศึกษาสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์จากราเอนโดไฟต์ที่แยกจากใบกวาวเครือขาว (*Pueraria mirifica*) โดยทำการสุ่มเก็บใบกวาวเครือขาวจาก 4 จังหวัด คือ กรุงเทพมหานคร ลพบุรี ตาก และเชียงราย มาคัดแยกราเอนโดไฟต์โดยผ่านวิธีฆ่าเชื้อที่ผิวจนสามารถแยกราได้ทั้งหมด 43 ไอโซเลต ทำการทดสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี dual agar diffusion technique พบว่าราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ 63LVM01 มาพิสูจน์เอกลักษณ์ทางสัณฐานวิทยาและอนุชีววิทยาเมื่อเทียบลำดับ DNA บริเวณ ITS1 ITS2 และ 5.8s rRNA พบว่าราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ 63LVM01 จัดเป็น *Mycocleptodiscus* sp. ซึ่งมีฤทธิ์เนื่องจากสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้ 3 ชนิด คือ *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* และ *Candida albicans* และสามารถยับยั้งได้ดีที่สุด ดังนั้นจึงเลือกราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ 63LVM01 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Yeast extract broth (YEB) แล้วนำมาสกัดและแยกสารด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี และการตกผลึกได้สาร 4 ชนิด ประกอบด้วย Uracil และ Cyclo (L-Leu-L-Pro) และสารที่เป็นผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติใหม่ 2 ชนิด คือ Cyclo (L-Ser-L-Tryp) และ Cyclo (L-Ala-L-Tryp) ซึ่งสารที่ได้ทั้ง 4 ชนิด ได้มาจากสารสกัดหยาบเอธิลอะซีเตทของน้ำเลี้ยง

เชื้อ ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์สารทั้ง 4 ชนิด ด้วยวิธี Minimum inhibitory concentration method (MIC) เมื่อใช้ *Penicillin G*, *Erythromycin*, *Sulfadimidine*, *Streptomycin*, *Ketoconazole* และ *Iprodione* เป็น positive control พบว่า Cyclo (L-Leu-L-Pro) มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* ATCC 6633 ได้ปานกลาง 1.96 (9.33) $\mu\text{g/ml}$ (μM) และมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 และ *C. albicans* ATCC 10231 ได้ต่ำและ Cyclo(L-Ser-L-Tryp) มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *C. albicans* ATCC 10231 ที่มีค่า MIC เท่ากับ 1.96 (7.18) $\mu\text{g / ml}$ (μM) ซึ่งมีฤทธิ์ดีกว่า *Ketoconazole* และ *Iprodione* 2.6 และ 4.2 เท่าตามลำดับ

นางลักษณ์ ศรีอุปมาศ. (2548) ศึกษาราเอนโดไฟต์จากพืชสมุนไพรไทยและนำมาตรวจกรองหาฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยเก็บตัวอย่างกิ่งและใบที่มีรอยโรคของพืชสมุนไพร 81 ชนิดจากป่าทั้งสี่ภาคของประเทศไทย คัดเลือกราเอนโดไฟต์ที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกัน 360 ไอโซเลต มาเพาะเลี้ยงใน Malt Czapek broth และ Yeast extract sucrose broth นำสารสกัดจากน้ำหมักมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ การทดสอบสารสกัดด้วยวิธี Microplate alamar blue assay พบสารสกัดจากราเอนโดไฟต์ 92 ไอโซเลต มีฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (MIC 0.0625-200 $\mu\text{g/ml}$) การทดสอบสารสกัดด้วยวิธี [^3H] hypoxanthine incorporation พบสารสกัดจากราเอนโดไฟต์ 6 ไอโซเลต มีฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย *Plasmodium falciparum* K1 (IC_{50} 1.2-9.1 $\mu\text{g/ml}$)

ชัยวัฒน์ บุญมากาศ และคณะ. (2550) ศึกษาพืชในวงศ์ Stemonaceae ในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอนโดไฟต์ที่อาศัยอยู่ในพืชชนิดนี้ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในพืช ได้แก่ *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas solanacearum*, และ *Xanthomonas citrii* การทดลองนี้ได้เก็บตัวอย่างของ *Stemona burkiliic* ที่ได้จากจังหวัดเชียงใหม่ ลำพูน ระยอง และนครราชสีมา เก็บตัวอย่างใบพร้อมก้านและราก *S. kerrii* จำนวน 58 ตัวอย่าง ราเอนโดไฟต์ที่แยกมาได้มีทั้งหมด 170 ไอโซเลต ซึ่งเมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อหลังจากปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออกแล้วนำมาทดสอบวิธี Plate diffusion method พบว่ามี 15 ไอโซเลต ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย และเมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว PDB+0.2%YE และ Modified MID ในจำนวนนี้พบว่า ราเอนโดไฟต์บางไอโซเลตสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้ทั้ง 4 สายพันธุ์ ในขณะที่บางไอโซเลตสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียบางชนิดได้เท่านั้น

นางลักษณ์ ศรีอุปมาศ และคณะ. (2551) ศึกษาสารต้านมะเร็งจากราเอนโดไฟต์ในพืชสมุนไพรไทย เก็บตัวอย่างจากกิ่งใบไม้ของพืช แยกราเอนโดไฟต์ที่น่าสนใจได้แก่ (1) รา *Lrub20* แยกได้จากกระดังงาดอกแดง มีฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค (2) รา *Phomopsis* sp. *Usia5* แยกได้จากเสน มีฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรคได้ดี และแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทรวงอก มะเร็งช่องปาก มะเร็งปอด (3) รา *Bipolaris* sp. *Ctom 12* แยกได้จากเคด มีฤทธิ์ต้าน *Plasmodium falciparum* และมีฤทธิ์ดีในการฆ่าเซลล์มะเร็งหลายชนิด ได้แก่ มะเร็งท่อน้ำดี มะเร็งเยื่อช่องปาก มะเร็งปากมดลูก มะเร็งเต้านม มะเร็งปอด และ เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (4) รา *Phomopsis* sp. *Mfer5* แยกได้จากบุนนาค สร้างสาร 3-NPA เป็นสารพิษที่พบได้ทั่วไป

ในราเอนโดไฟต์หลายชนิด (5) รา *Fusicoccum* sp. Gell14 แยกจากทองแมว (6) รา *Phomopsis* sp. Rlyi1 ในกุหลาบขาว (7) รา *Fusarium* sp. Tasp15 จากไชหิน สร้างสาร 3-nitropropionic acid รา Gspe 11 จากพุตริटनाสามารถฆ่าเซลล์มะเร็งทรวงอก และเซลล์มะเร็งปอด

วันพร เข็มมุกต์. (2552) ได้แยกราเอนโดไฟต์จาก ใบ กิ่ง และรากลำไยที่มีการเจริญเติบโตสมบูรณ์ ในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่และลำพูน ทำการฆ่าเชื้อด้วยวิธี Triple sterilization ได้เชื้อรา 660 ไอโซเลท จัดกลุ่มของเชื้อราได้ทั้งสิ้น 65 Taxa นำราเอนโดไฟต์จำนวน 50 ไอโซเลท ทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum* sp. สาเหตุโรคใบจุดดำในลำไยด้วยวิธี Dual culture พบเชื้อรา *Eurotium* sp., *Colletotrichum* sp. No.2, *Myceliasterilia* sp., *Beltrania* sp. และ *Trichoderma* spp. ให้ผลการยับยั้งดีที่สุดที่สุด และนำมาทดสอบความสามารถในการควบคุมโรคใบจุดดำในลำไย พบว่ากรรมวิธีนี้ดีพ่นด้วย *Colletotrichum* sp. No.2 และ *Eurotium* sp. มีดัชนีการทำลายน้อยที่สุด

สุจิตรา หาญทง. (2552) ศึกษาการแยกสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งจากราเอนโดไฟต์ในใบและเปลือกราชดัด โดยวิจัยนี้สามารถแยกได้ทั้งหมด 34 ไอโซเลท หลังทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร 5 ชนิด ได้แก่ Potato dextrose broth (PDB), Malt extract broth (MEB), Malt czapek broth (MCzB), Sabouraud's dextrose broth (SDB) และ Glucose yeast extract broth (GYB) สารสกัดหยาบที่ได้นำมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งคน 5 ชนิด คือ มะเร็งตับ (Hep-G2) มะเร็งลำไส้ (SW-620) มะเร็งปอด (CHAGO) มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO-3) และมะเร็งทรวงอก (BT-474) จากผลทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ และการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ^1H NMR ของสารสกัดเหล่านั้น ทำให้สามารถเลือกสารที่จะนำมาเพาะเลี้ยงในขั้นต่อไปได้ 3 ชนิด ได้แก่ RB-20/2A, RB-20c และ RL-K3 ซึ่งเมื่อทำการแยกส่วนสกัดของราเหล่านี้ให้บริสุทธิ์ พบว่าได้สารที่มีการรายงานมาก่อน 8 ชนิด คือ Macrosporin, Alternariolmonomethyl ether, Alternariol, Integric acid, Cytochalasin C, Cytochalasin Q, Cytochalasin D และ Cyclo(D-tyrosyl-D-proline) จากนั้นนำสารที่แยกได้ทั้งหมดมาทำการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง พบว่า สาร 1 มีความเป็นพิษที่จำเพาะต่อเซลล์ BT-474 และ KATO-3 ในระดับสูง โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.69 และ 8.69 μM ตามลำดับ ส่วนสาร 2 แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ SW-620, KATO-3 และ BT-474 (ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 3.01, 2.17 และ 12.19 μM ตามลำดับ) ในขณะที่สาร 3 มีความเป็นพิษที่จำเพาะต่อเซลล์ SW-620 และ CHAGO (IC_{50} เท่ากับ 9.33 และ 18.67 μM ตามลำดับ) และสาร 4 แสดงความเป็นพิษกับทุกเซลล์ที่ทดสอบ สำหรับสาร 7 และสาร 5 มีความเป็นพิษต่อเซลล์ Hep-G2, KATO-3 และ BT-474 ในระดับที่ใกล้เคียงกัน

อรรวรรณ ปิยะบุญ. (2553) ศึกษาประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ คือ เชื้อรา *Trichoderma harzianum* CB-Pin-01., *T. harzianum* PM 51 และแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* กับ *B. amyloliquefaciens* สำหรับควบคุม *Phytophthora parasitica* ด้วยวิธี Dual cultures พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์สามารถยับยั้งเชื้อรา *P. parasitica* ได้โดยเชื้อรา *T. harzianum* ทั้ง

2 สายพันธุ์ มีประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. parasitica* ได้ดีกว่าเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. การฉีดพ่นเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เปรียบเทียบกับสารเคมี Metalaxyl บริเวณโคนต้นยางชำถุง พบว่าประสิทธิภาพการยับยั้งของเชื้อรา *T. harzianum* PM 51 แตกต่างกับประสิทธิภาพการยับยั้งของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ส่วนประสิทธิภาพของเชื้อรา *T. harzianum* ทั้ง 2 สายพันธุ์ ไม่แตกต่าง เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สารเคมี Metalaxyl

Bacon และคณะ (1977 : 576-581) พบว่า ราเอนโดไฟต์ส่วนใหญ่สามารถใช้ส่วนประกอบของเซลล์พืชได้ มีการสร้างเอนไซม์ และสร้างองค์ประกอบที่ช่วยเร่งการเจริญเติบโตของพืช และสร้างสารที่สามารถใช้ประโยชน์ในทางเภสัชกรรม หรือทางเกษตรกรรมได้ และศึกษาพบว่าต้นกล้ากะหล่ำปลีที่คลุกเมล็ดด้วยเชื้อรา *Heteroconium chaetospora* ที่ได้จากรากกะหล่ำมีการเจริญเติบโตที่สมบูรณ์ พืชมีความแข็งแรง โดยราเอนโดไฟต์ *H. chaetospora* สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของต้นกล้ากะหล่ำ (Narisawa and others. 1998 : 373-382) พบว่าราเอนโดไฟต์ *Fusarium* บางชนิด *Nigrospora oryzae*, *Acremonium zeae* และ *Periconia macrospinoso* สามารถกระตุ้นให้ข้าวโพดสร้างสารทุติยภูมิที่มีผลทำให้ข้าวโพดมีความต้านทานโรค

Bayman และคณะ (1996 : 143-149) คัดแยกราเอนโดไฟต์จากรากและใบของพืชในสกุล *Lepanthes* นำใบและรากมาล้างผ่านน้ำ ฆ่าเชื้อที่ผิวโดยแช่ในเอธานอล 75% เป็นเวลา 1 นาที แช่ใน 3.4% Sodium hypochlorite เป็นเวลา 10 นาที และแช่ในเอธานอล 75% เป็นเวลา 30 วินาที หลังจากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นที่หนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว นำตัวอย่างรากมาตัดตัวอย่างละ 6 ชิ้น ขนาด 2 – 5 มิลลิเมตร และตัวอย่างใบมาตัดเป็นวงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร บริเวณปลายใบ กลางใบ และโคนใบ และตัดแบ่งครึ่งอีกครั้ง นำชิ้นส่วนจากรากตัวอย่างละ 3 ชิ้น และตัวอย่างจากใบที่ตัดแบ่งเป็นครึ่งวงกลม วางบนอาหาร Half-strength malt extract agar ที่ผสม Rose bengal ความเข้มข้น 35 mg/l บ่มที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส นำโคโลนีของราที่ได้ย้ายไปเลี้ยงในอาหาร MEA หรือ V8 juice agar

Liu และคณะ (2001) คัดแยกราเอนโดไฟต์เนื้อเยื่อจากลำต้นของ *Astemisia annua* โดยนำส่วนของลำต้น *A. annua* มาล้างผ่านน้ำและนำมาฆ่าเชื้อที่ผิวนอกโดยแช่ในเอธานอล 75% เป็นเวลา 1 นาที แช่ใน 5% Sodium hypochlorite เป็นเวลา 5 นาที และนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นที่หนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง และนำตัวอย่างพืชมาตัดเป็นแท่งขนาด 1 เซนติเมตร จาก 1 แท่งให้ตัดแบ่งเป็น 2 แท่งตามแนวตั้งตรง นำชิ้นตัวอย่างวางบนอาหาร PDA ที่เติมสารปฏิชีวนะ Ampicillin 150 mg/l และ Streptomycin 100 mg/l เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 ± 1 องศาเซลเซียส เมื่อเส้นใยเจริญรอบ ๆ ชิ้นส่วนของตัวอย่าง คัดเลือกเชื้อราให้ได้เชื้อราที่บริสุทธิ์และเพาะเลี้ยงเชื้อราที่ได้

Kim และคณะ (2007 : 332-337) แยกราเอนโดไฟต์จากใบ ลำต้น และรากของพืชผัก 5 ชนิด คือ พริก แตงกวา มะเขือเทศ พักทอง และผักกาดขาวจีน ซึ่งทำการเก็บตัวอย่างแบบสุ่มเก็บตัวอย่างพืชที่ปกติ 3-5 ต้น ต่อพื้นที่ นำตัวอย่างพืชมาทำความสะอาดโดยล้างผ่านน้ำและผึ่งให้แห้งฆ่าเชื้อที่ผิวโดยแช่ตัวอย่างพืชในเอธานอล 70% เป็นเวลา 1 นาที แช่ใน 5% Sodium

hypochlorite เป็นเวลา 5 นาที และนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นที่เพิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง นำตัวอย่างมาตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ และนำมาเลี้ยงบนอาหาร Malt extract agar ซึ่งเติมสารปฏิชีวนะ Chloramphenicol ความเข้มข้น 50 mg/L โดยวางชิ้นตัวอย่างพืช 4 ชิ้นต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มเชื้อที่ 25 องศาเซลเซียส เมื่อเชื้อราเจริญทำการถ่ายเชื้อโดยใช้อาหาร Potato dextrose agar

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

1. เชื้อแบคทีเรียก่อโรค ได้แก่ *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Vibrio* spp., *Salmonella typhimurium* และ *Bacillus megaterium*
2. สารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากเหียง ที่สกัดด้วยสารละลายเอธิลอะซีเตท

เครื่องมือที่ใช้ในการรวบรวมข้อมูล

1. อุปกรณ์ ได้แก่

- ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar air flow) ยี่ห้อ Microflow รุ่น M 50545
- ชุดกรองสุญญากาศ ยี่ห้อ Millipore รุ่น Vacuubrand
- ไมโครปิเปต (Transfer pipette) ยี่ห้อ Rainin
- เครื่องชั่ง (Balance) ยี่ห้อ Mettler Toledo รุ่น PG2002-S
- กล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา (Microscope) ยี่ห้อ Nikon รุ่น E400
- หม้อนึ่งความดัน (Autoclave) ยี่ห้อ Tomy รุ่น SS-325
- เครื่องกลั่นระเหยสุญญากาศ (Rotary evaporator) ยี่ห้อ Buchi รุ่น B-169

Vacuum System

- เครื่องแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า (Gel Electrophoresis) ยี่ห้อ Cleaver Scientific power supply รุ่น MP-3AP

Research รุ่น PTC-200

- เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น UV-1601

2. สารเคมี ได้แก่

- 70% เอทานอล (Ethanol) บริษัท LAB-SCAN ประเทศไทย
- เอธิลอะซีเตท (Ethyl acetate) บริษัท UNIVAR ประเทศนิวซีแลนด์
- DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) บริษัท SIGMA ประเทศไทย
- Ascorbic acid บริษัท UNIVAR ประเทศนิวซีแลนด์

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่

- Potato dextrose agar (PDA) และ Potato dextrose broth (PDB)
- Mueller Hinton agar (MHA)
- Trypticase soy broth (TSB)
- Yeast extract agar (YEA)
- Malt extract agar (MEA) และ Malt extract broth (MEB)

- Carrot agar (CA)
- V8 agar

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเก็บรวบรวมข้อมูล

1.1. การเก็บตัวอย่างพืช เก็บตัวอย่างเหียง คือ ใบที่มีสภาพสมบูรณ์ ไม่มีการทำลายของโรคและแมลงล้างใบให้สะอาด วางผึ่งให้แห้ง

1.2. การแยกราเอนโดไฟต์โดยใช้วิธีการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวนอก ดัดแปลงจากวิธีของ Posada and others. (2007 : 332-337)

- 1) ตัดใบเหียงให้มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 6 มิลลิเมตร
- 2) แช่ในแอลกอฮอล์ 70% นาน 30 วินาที แช่ในสารละลาย Sodium hypochlorite (10% available chlorine) นาน 1 นาที ล้างในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อนาน 1 นาที 2 ครั้ง และซับให้แห้งบนกระดาษกรองปราศจากเชื้อ
- 3) วางตัวอย่างที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้ว ลงบนจานอาหาร PDA แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส สังเกตการเจริญของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอจากเนื้อเยื่อพืชทุกวัน
- 4) แยกปลายเส้นใยของเชื้อราที่เจริญออกมาจากเนื้อเยื่อพืชไปเพาะเลี้ยงต่อบนจานอาหาร PDA จานใหม่และบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จนกระทั่งราเอนโดไฟต์ที่แยกได้เจริญเต็มที่ สังเกตความบริสุทธิ์ของราเอนโดไฟต์

1.3. การศึกษาสัณฐานวิทยาของราเอนโดไฟต์ ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากเหียง โดยนำราเอนโดไฟต์มาเลี้ยงในอาหารแข็งทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ PDA, MEA, YEA, CA และ V8 ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อราที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 สัปดาห์ สังเกตลักษณะของเส้นใย บันทึกผล จากนั้นนำเชื้อรามาวะเลี้ยงด้วยวิธี Slide culture แล้วย้อมด้วยสีย้อม Lactophenol cotton blue เพื่อจำแนกสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2. การศึกษาฤทธิ์สารสกัดหยาบในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค โดยใช้วิธี Disc diffusion techniques

2.1 การเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟต์และการสกัด

- 1) เพาะเลี้ยงราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากข้อ 3.1.2 ในอาหาร MEB ปริมาตร 100 ml ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน
- 2) กรองแยกเส้นใยและน้ำหมักเส้นใยรา (Broth) ที่เพาะเลี้ยงได้
- 3) สกัดน้ำหมักเส้นใยราและสกัดเส้นใยราด้วยเอธิลอะซีเตต
- 4) นำไประเหยแห้งภายใต้การลดความดันด้วยเครื่องกลั่นระเหยสุญญากาศ จนกระทั่งได้สารสกัดหยาบหยาบ (Crude extract)

2.2. การเตรียมแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ ใช้แบคทีเรียที่มีอายุไม่เกิน 24 ชั่วโมง และความเข้มข้นของเชื้อ 10^5 - 10^7 เซลล์/ml

1) เชื้อโคโลนีของเชื้อทดสอบที่เพาะเลี้ยงไว้ประมาณ 24 ชั่วโมง จำนวน 2-3 โคโลนี เพาะเลี้ยงในหลอดอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2) นำเชื้อจากข้อ 1) มาเจือจางให้ได้จำนวนแบคทีเรีย 10^5 - 10^7 เซลล์/ml โดยเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปวัดความขุ่นให้ได้ เท่ากับ 0.2 ที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร

2.3 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ ในการทดสอบนี้จะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MHA เขียนตำแหน่งที่จานอาหารแข็ง เพื่อระบุตำแหน่งที่จะวาง Paper disc

2.4 ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบ

1) กลุ่มทดลองคือ สารสกัดหยาบหยาบจากเส้นใยราและน้ำหมักเส้นใยราที่สกัดด้วยสารละลายเอธิลอะซีเตท

2) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยใช้สารละลายเอธิลอะซีเตทปรับปริมาตรของสารสกัดหยาบหยาบ

3) หยดสารสกัดหยาบหยาบปริมาตร 25 μ l บนแผ่น Paper disc ทิ้งไว้ให้แห้งเป็นเวลา 1 ชั่วโมง (กลุ่ม Negative control ใช้สารละลายเอธิลอะซีเตท และกลุ่ม Positive control ใช้สารปฏิชีวนะ ปริมาตร 25 μ l)

4) วิธีเพาะเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหารทดสอบ ใช้ไม้พินสำลิจับแบคทีเรียที่ปรับความเข้มข้นเรียบร้อยแล้วบิดให้แห้งพอสมควร ทั่ว ข้างหลอดทดลองจากนั้นทำการ Swab ให้ทั่วบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยลากเส้นผ่านศูนย์กลาง จานเพาะเลี้ยงเชื้อแล้วป้ายเป็นเส้นตั้งฉากผ่านเส้นที่ลากไว้ดี ๆ ให้ทั่วผิวหน้า แล้วหมุนจานเพาะเชื้อ ไปประมาณ 60 องศา แล้วป้ายอีกครั้ง ทำซ้ำ 3 ครั้ง เพื่อให้แบคทีเรียกระจายสม่ำเสมอทั่วผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ ทิ้งไว้ 3 - 5 นาที เพื่อให้ผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง

5) นำแผ่น Paper disc ที่หยดสารสกัดหยาบจากราและน้ำหมักเส้นใยราเอนโดไฟต์ วางลงบนเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิด

6) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วนำมาวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่ไม่มีแบคทีเรียเจริญ (Inhibition zone) โดยวัดหน่วยเป็นมิลลิเมตร

7) นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ค่าสถิติ

3. การทดสอบประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH (2,2 - Diphenyl - 1 - picrylhydrazyl radical scavenging capacity assay) ดัดแปลงจากวิธีของ Brand-Williams, Cuvelier and Berset. (1995 : 25-30)

3.1 เจือจางสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟต์ที่ความเข้มข้น 100 μ g/ml

3.2 เตรียมสารละลาย Ascorbic acid และเจือจางลดลงครึ่งหนึ่ง ได้แก่ 100, 75, 60, 40, 25 และ 12.50 μ g/ml

3.3 นำสารสกัดหยาบหยาบที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 0.2 ml ผสมกับสารละลาย DPPH 3.8 ml แล้วนำไปบ่มในที่มืดอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที

3.4 วัดค่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยเครื่อง Spectrophotometer ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร บันทึกค่าการดูดกลืนแสง เปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งใช้สารละลายเอธิลอะซีเตทแทนสารสกัดหยาบ โดยใช้สารละลายเอธิลอะซีเตทเป็น Blank

3.5 นำค่าที่วัดได้มาคำนวณหา%การดักจับอนุมูล DPPH จากสูตร

$$\% \text{ Radical scavenging} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

เมื่อ A_{control} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม

A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของชุดทดสอบ

3.6 คำนวณหาค่า IC_{50} จากกราฟระหว่าง % Scavenging กับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ

3.7 เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการลดปริมาณอนุมูลอิสระลดลงครึ่งหนึ่ง (IC_{50}) ของสารสกัดหยาบราเอนโดไฟต์กับสารละลายมาตรฐาน Ascorbic acid

4. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของราเอนโดไฟต์

4.1 การเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟต์เพื่อสกัดดีเอ็นเอ เพาะเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟต์ในอาหารเหลว PDB ปริมาตร 100 ml บ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเร็ว 120 รอบ/นาที เป็นเวลา 5-10 วัน หลังจากนั้นนำเชื้อราที่ได้ไปกรองผ่านชุดกรองสุญญากาศ ล้างเส้นใยราด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ อย่างน้อย 2 ครั้ง ชับน้ำออกจากเส้นใยราด้วยกระดาษทิชชูที่ปราศจากเชื้อ แล้วถ่ายเส้นใยลงในโถรงบดยาที่ปราศจากเชื้อแล้วนำไปแช่ในตู้แช่แข็ง ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

4.2 การสกัดดีเอ็นเอ ด้วยวิธี CTAB method ดัดแปลงจาก O'Donnell and others. (1997 : 103-116)

- 1) บดเส้นใยราเอนโดไฟต์โดยเติม ไนโตรเจนเหลว ปริมาตร 50 ml
- 2) นำตัวอย่างที่บดได้ใส่ในหลอดไมโครเซนติฟิวจ์ ปริมาตร 1.5 ml
- 3) เติมสารละลาย CTAB ปริมาตร 700 μ l นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที
- 4) เติม Chloroform : Isoamyl alcohol (24:1, v/v) ปริมาตร 700 μ l นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 นาที แยกส่วน Supernatant ออกมาใส่หลอดไมโครเซนติฟิวจ์หลอดใหม่
- 5) เติม Isopropanol ปริมาตร 700 μ l นำไปวางในอ่างน้ำแข็ง นาน 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ
- 6) ทิ้งส่วน Supernatant จากนั้นเติมเอทานอล 70% ปริมาตร 500 μ l เพื่อล้างตะกอนดีเอ็นเอ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
- 7) ดูดส่วน Supernatant ทิ้ง ปล่อยให้ Pellet แห้ง นาน 10 นาที จากนั้นเติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเพื่อละลายตะกอนดีเอ็นเอ

8) การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยใช้ 0.8%

Agarose gel electrophoresis

4.3 การเพิ่มปริมาณส่วน ITS ของยีน rDNA เพิ่มปริมาณของ ribosomal DNA

ส่วนของ ITS1 - 5.8S - ITS2 ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ Universal fungal primer ใช้ Primers ITS1 และ ITS4 ตามวิธีของ (White and others. 1990 : 315-322)

1) การเตรียมส่วนผสมของ PCR (PCR mixture) ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ส่วนผสมในการทำ PCR

ส่วนผสม	ความเข้มข้นเริ่มต้น	ปริมาตร(μl)
Nanopure water	-	35.8
PCR buffer	10 X	5
MgCl ₂	25 mM	5
dNTPs mix	10 mM	1
Primer TIS1	10 μM	1
Primer ITS 4	10 μM	1
Taq DNA polymerase	2 U/μl	0.2
DNA template	100-500 ng	1
Total volume	-	50

2) การทำปฏิกิริยา PCR จัดแปลงจาก สิตา ปรีตานันท์. (2551 : บทคัดย่อ) เมื่อทำการผสมส่วนต่าง ๆ ดังตารางที่ 3.1 จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยาภายในเครื่อง PCR โดยใช้ PCR profile ดังนี้

- ขั้นที่ 1 94 องศาเซลเซียส 2 นาที
- ขั้นที่ 2 94 องศาเซลเซียส 1 นาที
- ขั้นที่ 3 55 องศาเซลเซียส 1 นาที
- ขั้นที่ 4 72 องศาเซลเซียส 2 นาที
- ขั้นที่ 5 ทำซ้ำขั้นที่ 2-4 ทั้งหมด 34 รอบ
- ขั้นที่ 6 72 องศาเซลเซียส 10 นาที

3) การตรวจสอบปริมาณของ PCR product ด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis โดยผสม PCR product ปริมาตร 3 μl กับ 6x Loading dye ปริมาตร 3 μl แล้วใช้ปิเปตดูดใส่ในช่อง 0.8% Agarose gel ที่แช่อยู่ใน TBE buffer ใช้กระแสไฟฟ้า 100 volt นาน 30-40 นาที ย้อมเจลด้วย Ethidium bromide เป็นเวลา 10 นาที ตรวจสอบ PCR product ภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง UV transilluminator และบันทึกภาพโดยใช้ Gel documentation

4.4 การกำจัดสิ่งปนเปื้อนใน PCR product ด้วยชุด Nucleospin[®] extract DNA

purification kit ตามวิธีการในคู่มือของบริษัท โดยนำ PCR product ผสมกับ Binding buffer

แล้วหยอดลงใน Nucleospin column ที่รองรับด้วย Collecting tube ขนาด 2 ml แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำ 2 ครั้ง เทของเหลวที่อยู่ด้านล่างทิ้งไปเติม Elution buffer ซึ่งผ่านการอุ่นที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส 15 นาที ลงใน Nucleospin column ที่รองรับด้วยไมโครทิวบ์ (Microtube) ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้ DNA ตกกลงมาในไมโครทิวบ์ ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของ DNA ที่ได้ด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis อีกครั้ง จากนั้นส่ง PCR product ที่ได้ไปอ่านลำดับเบสของ DNA ที่ Bioservice Unit, BIOTEC

4.5 การจัดเรียงลำดับเบส DNA เมื่อได้ DNA sequence ทำการตรวจสอบลักษณะและคุณภาพของลำดับเบส DNA ส่วน ITS ของ ราเอนโดไฟต์โดยใช้โปรแกรม BioEdit V.7.0.9 (Hall. Online. 2005) จากนั้นนำลำดับเบสของ DNA ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ GenBank ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) เพื่อหาเชื้อราที่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกันมากที่สุดแล้วนำลำดับเบส DNA ของราอื่น ๆ ที่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกัน โดยใช้โปรแกรม BioEdit V.7.0.9

บทที่ 4

ผลการวิจัย

การเก็บตัวอย่างพืช

เก็บตัวอย่างเหียง (*Dipterocarpus obtusifolius* Teijsm.ex Miq) ทั้งหมด 3 พื้นที่ใน จังหวัดนครราชสีมา ได้แก่ อำเภอเสิงสาง (A) 3 ต้น อำเภอเมือง (B) 2 ต้น และอำเภอ แก้งสนามนาง (C) 2 ต้น รวมทั้งหมด 7 ต้น

การแยกราเอนโดไฟต์โดยใช้วิธีการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวนอก (ดัดแปลงจากวิธีของ Posada and others. 2007)

แยกราเอนโดไฟต์ได้หมด 79 ไอโซเลท โดยแยกได้จากบริเวณ Midrib จำนวน 41 ไอโซเลท, Lateral vein จำนวน 20 ไอโซเลท และ Lateral vein (Leaf margin) จำนวน 18 ไอโซเลท โดยคัดเลือกเฉพาะลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกัน

ตารางที่ 4.1 จำนวนราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากใบเหียง

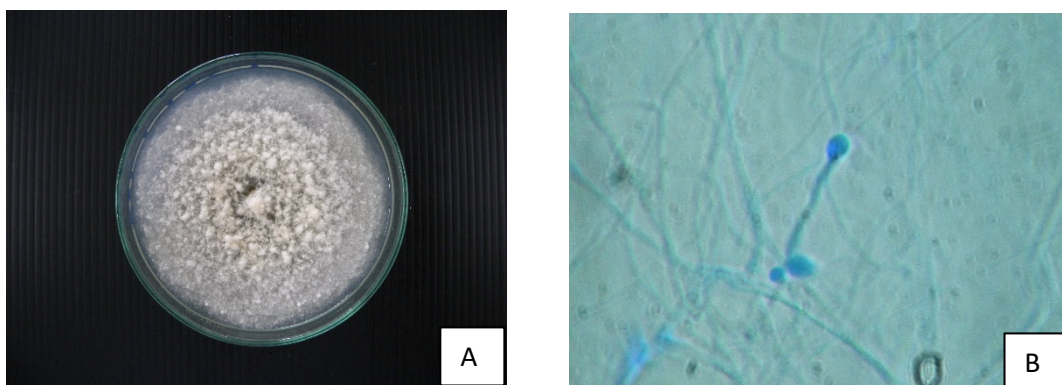
อำเภอ	จำนวนราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากใบเหียง			รวม
	เส้นกลางใบ	เส้นใบด้านข้าง	เส้นใบด้านข้าง (ขอบใบ)	
เสิงสาง (A)	25	9	8	42
เมือง (B)	9	3	6	18
แก้งสนามนาง (C)	7	8	4	19
รวม	41	20	18	79

การพิสูจน์เอกลักษณ์และสัณฐานวิทยาของราเอนโดไฟต์

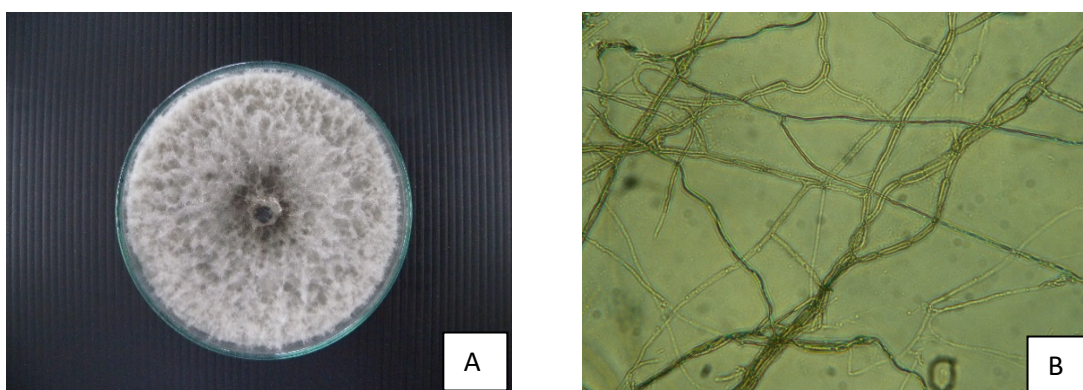
ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากเหียง โดยเฉพาะเลี้ยง ราเอนโดไฟต์ในอาหารแข็งทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ PDA, MEA, YEA, CA และ V8 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 สัปดาห์ (เนื่องจากราเอนโดไฟต์แต่ละชนิดมีอัตราการเจริญที่ต่างกัน) จากนั้น ศึกษาลักษณะของราเอนโดไฟต์ที่เลี้ยงในอาหารชนิดต่างๆ เช่น ลักษณะของรา สีของเส้นใย สี รวงควัตุ การสร้างสปอร์ หรือลักษณะพิเศษบางอย่าง ฯลฯ ลักษณะต่างๆ ของราเอนโดไฟต์ที่ แยกได้ทั้งหมด แสดงในภาคผนวก ข ตารางผนวกที่ ข-1, ข-2 และ ข-3

จากการทดลองที่เลี้ยงราเอนโดไฟต์ที่แยกได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ต่างกัน พบว่าอาหารมี ผลต่อการเจริญเติบโต ลักษณะของโคโลนี สีของเส้นใย สีของรวงควัตุ การสร้างสปอร์ หรือ

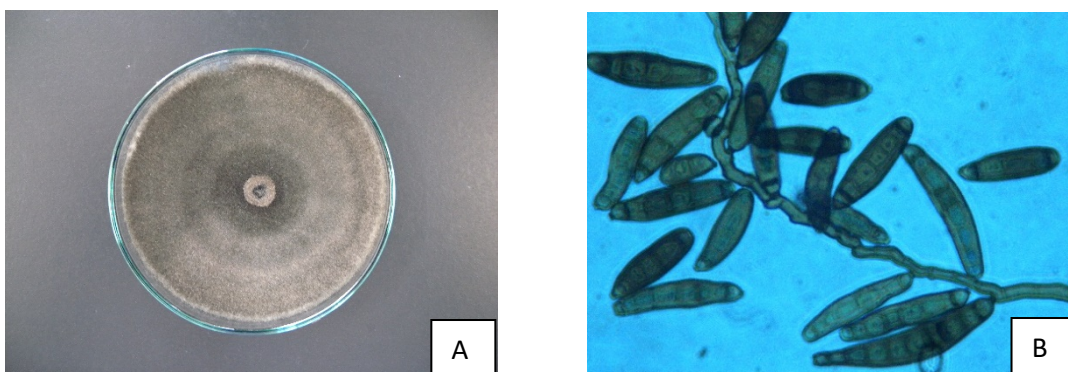
ลักษณะพิเศษบางอย่าง เนื่องจากในอาหารแต่ละชนิดมีสารอาหารที่แตกต่างกัน ซึ่งอาจจะส่งผลต่อการสร้างสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิที่แตกต่างกัน จากการจัดจำแนกราเอนโดไฟต์โดยการทำ Slide culture ย้อมด้วยสี Lactophenol cotton blue เพื่อจัดจำแนกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ สามารถแบ่งราเอนโดไฟต์ได้เป็น 6 ประเภท ดังตารางที่ 4.2 และลักษณะราเอนโดไฟต์ที่แยกได้ ดังภาพที่ 4.1-4.6



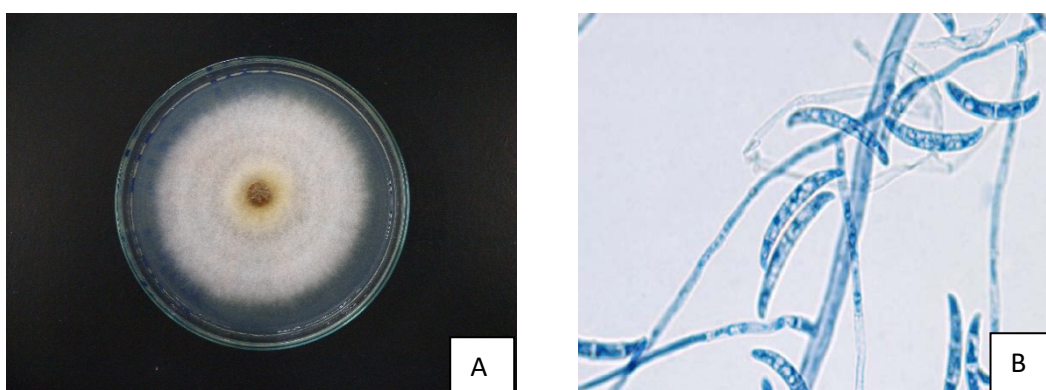
ภาพที่ 4.1 ตัวอย่างราเอนโดไฟต์ในกลุ่ม Endophytic fungi ไอโซเลท A38 (A) ลักษณะโคโลนีของราที่เจริญบนอาหาร PDA อายุ 14 วัน และ (B) เส้นใยและสปอร์



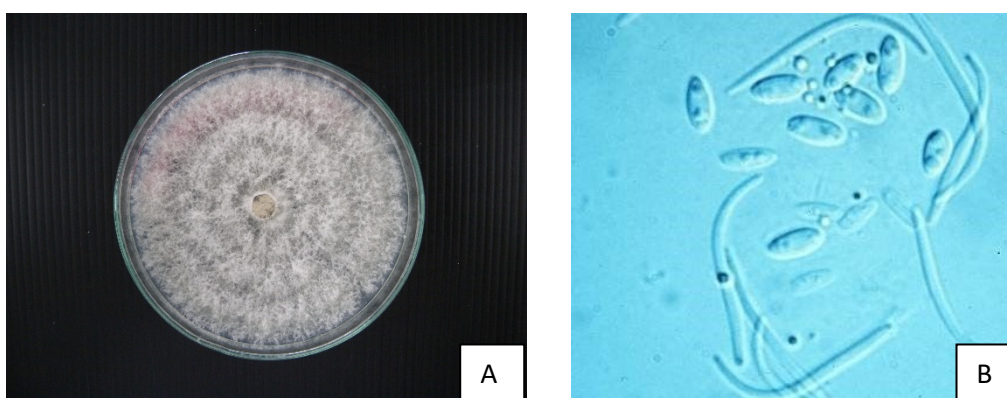
ภาพที่ 4.2 ตัวอย่างราเอนโดไฟต์ในกลุ่ม *Mycelia sterilia* ไอโซเลท A32 (A) ลักษณะโคโลนีของราที่เจริญบนอาหาร PDA อายุ 14 วัน และ (B) เส้นใยและสปอร์



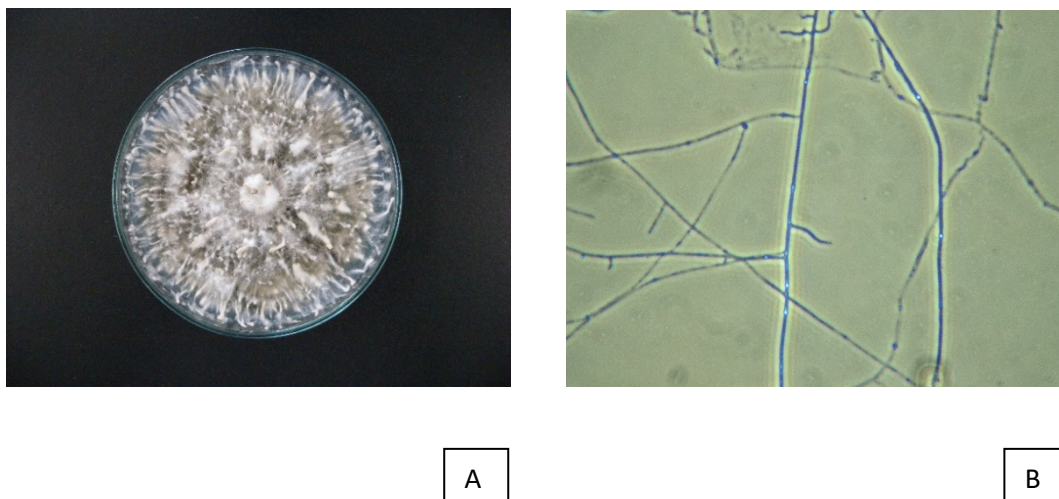
ภาพที่ 4.3 ตัวอย่างราเอนโดไฟต์ในกลุ่ม *Alternaria* sp. ไอโซเลท A72 (A) ลักษณะโคโลนีของราที่เจริญบนอาหาร PDA อายุ 14 วัน และ (B) เส้นใยและสปอร์



ภาพที่ 4.4 ตัวอย่างราเอนโดไฟต์ในกลุ่ม *Fusarium* sp. ไอโซเลท C23 (A) ลักษณะโคโลนีของราที่เจริญบนอาหาร PDA อายุ 14 วัน และ (B) เส้นใยและสปอร์



ภาพที่ 4.5 ตัวอย่างราเอนโดไฟต์ในกลุ่ม *Phomopsis* sp. ไอโซเลท A8 (A) ลักษณะโคโลนีของราที่เจริญบนอาหาร PDA อายุ 14 วัน และ (B) เส้นใยและสปอร์



ภาพที่ 4.6 ตัวอย่างราเอนโดไฟต์ในกลุ่ม *Xylaria* sp. ไอโซเลท A55 (A) ลักษณะโคโลนีของราที่เจริญบนอาหาร PDA อายุ 14 วัน และ (B) เส้นใยและสปอร์

ตารางที่ 4.2 ประเภทและจำนวนราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากเหียง

ประเภทราเอนโดไฟต์	ไอโซเลท	จำนวนที่พบ	%ที่พบ
Endophytic fungi	A11 A13 A18 A20 A21 A22 A23	28	35.44
	A24 A26 A31 A35 A38 A39 A62		
	A67 B1 B2 B6 B7 B8 B10 B11		
	B12 B13 B15 C23 C45 C55		
Mycelia sterillia	A1 A10 A12 A14 A19 A32 A36	19	24.05
	A40 A42 A45 A63 B3 B4 B5 B16		
	C4 C6 C11 C13		
<i>Alternaria</i> sp.	A3 A4 A15 A33 A46 A59 A61	16	20.25
	A64 A72 B14 B17 C7 C12 C26		
	C28 C42		
<i>Fusarium</i> sp.	B9 B18 C8 C21 C27 C39 C54	7	8.86
<i>Phomopsis</i> sp.	A7 A8 A9 A34 C50	5	6.32
<i>Xylaria</i> sp.	A41 A55 A56 C59	4	5.06

การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค โดยใช้วิธี Disc diffusion techniques

ลักษณะและปริมาณส่วนสกัดหยาบจากราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากใบเหียง ดังตาราง ผนวก ข-4, ข-5 และ ข-6 นำส่วนสกัดหยาบ 2 ส่วน ที่ได้จากการสกัดด้วยเอธิลอะซีเตททั้งจาก เส้นใยและน้ำเลี้ยงของราเอนโดไฟต์ ใช้ตัวอย่างละ 0.1 mg ผสมกับ 10% DMSO ปริมาตร 1 ml ปรับความเข้มข้นสารละลายให้มีความเข้มข้น 100 mg/l ใช้สารควบคุมบวก (Positive control) ได้แก่ Kanamycin และสารควบคุมลบ ได้แก่ 10% DMSO ในน้ำกลั่น พบว่าสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟต์สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค โดยพบเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณการยับยั้งได้กว้างกว่าตัวควบคุม ผลดังตารางที่ 4.3-4.5 เป็นตารางฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคของ สารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากใบเหียง อำเภอเสิงสาง อำเภอเมือง และอำเภอ แก้งสนามนาง ตามลำดับ

จากการศึกษาพบว่าสารสกัดที่สกัดจากเซลล์ของเชื้อราเอนโดไฟต์ และน้ำเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟต์ ด้วยตัวทำละลายเอธิลอะซีเตท แล้วนำสารสกัดหยาบที่ได้มาทดสอบเบื้องต้น พบว่าราเอนโดไฟต์จำนวน 48 ไอโซเลท มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ พบราเอนโดไฟต์ 3 ไอโซเลท ที่ให้ผลการยับยั้งสูงสุด ได้แก่ B15, C23 และ A42 ตามลำดับ ดังภาพที่ 4.7-4.9 เมื่อใช้ความเข้มข้น ของสารสกัด 0.1 mg/ml โดยเปรียบเทียบกับ Kanamycin เป็น Positive control ที่ความเข้มข้น 1 mg/ml โดยเชื้อราไอโซเลท B15, C23 และ A42 แสดงบริเวณยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบ *P. fluorescens* เท่ากับ 22 มิลลิเมตร *B. megaterium* 17 มิลลิเมตร และ *B. megaterium* 10 มิลลิเมตร ตามลำดับ ผลการยับยั้งของตัวควบคุมใช้ยาปฏิชีวนะ Kanamycin พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้ทั้งหมด 4 ชนิดที่ใช้ศึกษา โดยมีการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้มากที่สุด คือ มีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 11.35 มิลลิเมตร รองลงมาคือ *E. coli* เท่ากับ 10.25 มิลลิเมตร *P. fluorescens* เท่ากับ 8.55 มิลลิเมตรและ *B. megaterium* เท่ากับ 7.25 มิลลิเมตร ตามลำดับ

ตารางที่ 4.3ฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคของสารสกัดหยาบจากราเอ็นโดไฟต์ที่แยกได้จากใบเหียง อำเภอลำปาง

Isolation of endophytic fungi	Inhibition zone(mm)											
	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>		<i>P. fluorescens</i>		<i>Vibrio</i> spp.		<i>S. typhimurium</i>		<i>B. megaterium</i>	
	mycelia	broth	mycelia	broth	mycelia	broth	mycelia	broth	mycelia	broth	mycelia	broth
A1	-	-	1.6(±2.8)	2.6(±2.5)	7.3(±2.5)	1.0(±1.5)	-	-	-	-	1.3(±0.5)	0.6(±0.5)
A4	-	-	-	-	1.0(±1.0)	-	-	-	-	-	-	-
A3	-	-	1.0(±0.0)	-	3.3(±2.0)	5.0(±5.0)	-	-	-	-	4.0(±1.0)	1.0(±1.0)
A7	-	-	3.0(±0.0)	2.0(±0.0)	3.3(±0.5)	2.0(±0.0)	-	-	-	-	3.3(±0.5)	4.6(±1.1)
A8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A10	-	-	3.0(±0.0)	-	0.3(±0.5)	-	-	-	1.6(±0.5)	-	1.6(±0.5)	-
A11	-	-	2.0(±0.0)	-	2.3(±0.2)	-	-	-	-	-	2.6(±0.5)	-
A12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A13	-	-	-	-	1.5(±0.5)	-	-	-	-	-	1.3(±0.5)	-
A14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A15	-	-	1.3(±0.5)	-	4.6(±0.5)	2.3(±0.5)	-	-	-	-	3.3(±0.5)	1.3(±0.5)
A18	-	-	1.3(±0.5)	-	1.3(±0.5)	-	-	-	-	-	2.0(±0.0)	-
A19	-	-	2.6(±0.5)	-	5.6(±0.5)	-	-	-	-	-	5.0(±0.0)	-

ตารางที่ 4.3 (ต่อ)

Isolation of endophytic fungi	Inhibition zone(mm)											
	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>		<i>P. fluorescens</i>		<i>Vibrio</i> spp.		<i>S. typhimurium</i>		<i>B. megaterium</i>	
	mycelia	broth	mycelia	broth	mycelia	broth	mycelia	broth	mycelia	broth	mycelia	broth
A20	-	-	2.0(±0.0)	1.3(±0.5)	2.0(±0.0)	1.5(±0.0)	-	-	-	-	1.5(±0.0)	2.1(±0.2)
A21	-	-	0.8(±0.2)	-	0.5(±0.0)	-	-	-	-	-	1.6(±0.2)	-
A22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A23	-	-	0.8(±1.0)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A24	-	-	1.3(±1.1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A26	-	-	1.3(±1.1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A32	-	-	2.1(±0.2)	2.1(±0.2)	1.8(±0.2)	2.1(±0.2)	-	-	-	-	-	-
A33	-	-	0.6(±0.2)	-	1.6(±0.2)	-	-	-	-	-	3.0(±2.5)	5.3(±5.0)
A34	-	-	2.6(±0.5)	-	1.8(±0.2)	-	-	-	-	-	-	-
A35	-	-	3.0(±0.5)	2.0(±0.5)	2.6(±0.2)	4.0(±1.0)	-	-	-	-	-	-
A36	-	-	1.1(±0.2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A38	-	-	1.6(±0.2)	-	4.5(±0.5)	1.6(±0.2)	-	-	-	-	1.5(±0.5)	-
A39	-	-	1.6(±0.2)	5.1(±0.2)	1.5(±0.5)	1.8(±0.2)	-	-	-	-	1.8(±0.2)	3.1(±0.2)
A40	-	-	0.6(±0.2)	-	1.5(±0.0)	-	-	-	-	-	1.6(±0.7)	-

ตารางที่ 4.3 (ต่อ)

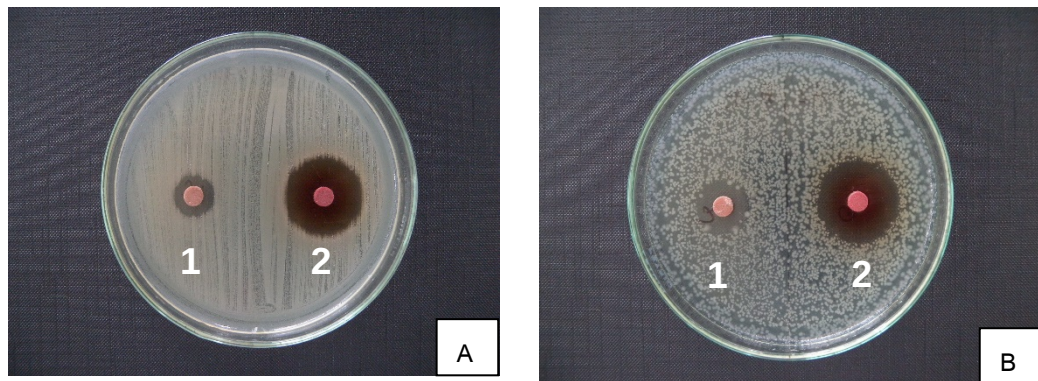
Isolation of endophytic fungi	Inhibition zone(mm)											
	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>		<i>P. fluorescens</i>		<i>Vibrio</i> spp.		<i>S. typhimurium</i>		<i>B. megaterium</i>	
	mycelia	broth	mycelia	broth	mycelia	broth	mycelia	broth	mycelia	broth	mycelia	broth
A41	-	-	-	3.3(±0.7)	-	13.1(±0.5)	-	-	-	-	-	-
A42	3.6(±0.5)	-	2.8(±1.1)	8.5(±0.8)	2.8(±0.5)	7.8(±1.0)	-	3.3(±1.2)	-	4.1(±0.2)	4.8(±0.2)	9.6(±0.5)
A45	-	-	-	-	4.5(±0.0)	-	-	-	-	-	-	-
A46	-	-	3.3(±0.2)	-	3.0(±0.5)	-	-	-	-	-	-	-
A55	-	-	-	1.5(±0.5)	-	-	-	-	-	-	-	-
A56	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A59	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A61	-	-	5.0(±0.5)	-	-	-	-	-	-	-	4.8(±0.2)	3.1(±0.5)
A62	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A63	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A64	-	1.6(±0.2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A67	-	0.8(±0.5)	1.5(±0.0)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A72	-	-	2.3(±0.2)	0.6(±0.2)	-	-	-	-	3.0(±0.8)	1.5(±0.5)	5.0(±0.2)	-

ตารางที่ 4.4ฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคของสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากใบเหียง อำเภอมือง

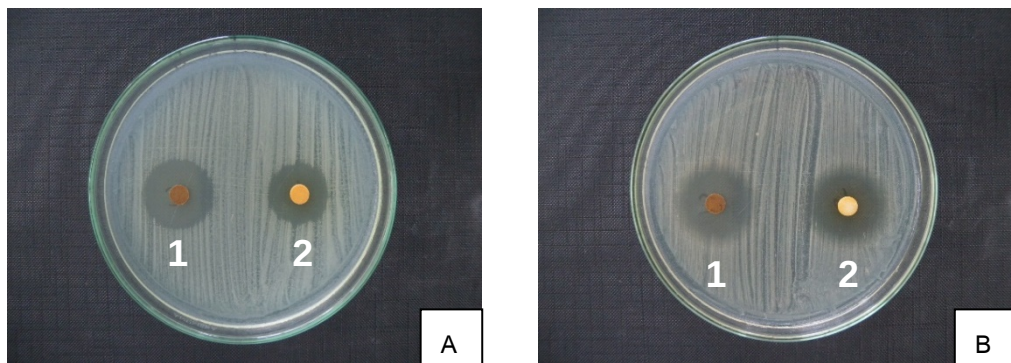
Isolation of endophytic fungi	Inhibition zone(mm)											
	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>		<i>P. fluorescens</i>		<i>Vibrio spp.</i>		<i>S. typhimurium</i>		<i>B. megaterium</i>	
	mycelial	broth	mycelia	broth	mycelia	broth	mycelia	broth	mycelia	broth	mycelia	broth
B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B4	-	-	2.3(±0.2)	1.1(±0.2)	2.1(±0.2)	0.5(±0.0)	-	-	-	-	4.0(±0.8)	1.8(±0.5)
B5	-	-	-	9.0(±1.3)	-	8.0(±0.5)	-	-	-	-	-	7.6(±0.7)
B6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B8	-	-	-	-	1.5(±0.0)	-	-	-	-	-	-	-
B9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B14	-	-	-	-	1.8(±0.2)	-	-	-	-	-	1.1(±1.1)	-
B15	-	-	7.0(±0.8)	6.3(±0.5)	7.3(±0.2)	5.6(±1.5)	-	-	-	-	5.0(±0.5)	5.5(±0.5)
B16	-	-	-	-	2.0(±0.5)	1.3(±0.2)	-	-	-	-	1.5(±1.0)	1.5(±0.8)
B17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B18	-	-	-	-	3.8(±0.5)	2.1(±0.7)	-	-	-	-	3.6(±1.1)	2.8(±0.2)

ตารางที่ 4.5ฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคของสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากใบเหียง อำเภอกำแพงแสนนาง

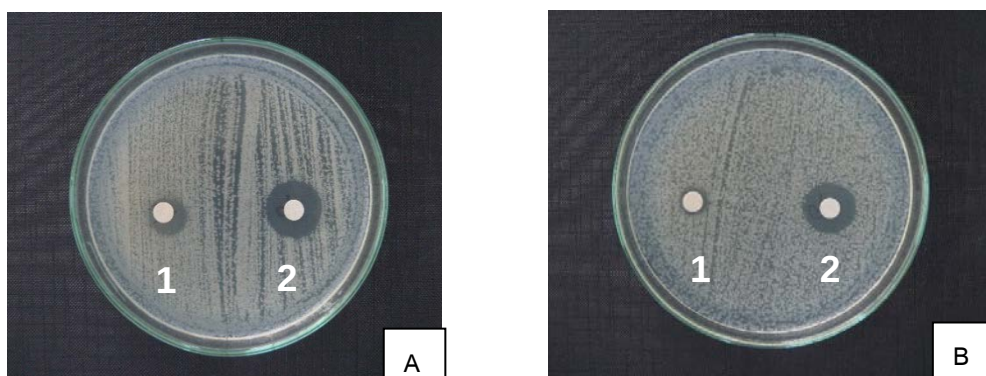
Isolation of endophytic fungi	Inhibition zone(mm)											
	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>		<i>P. fluorescens</i>		<i>Vibrio spp.</i>		<i>S. typhimurium</i>		<i>B. megaterium</i>	
	mycelia	broth	mycelia	broth	mycelia	broth	mycelia	broth	mycelia	broth	mycelia	broth
C12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.1(±0.2)	-
C27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C6	-	-	-	1.3(±0.2)	-	2.5(±0.0)	-	-	-	-	-	3.1(±0.2)
C7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C21	-	-	-	2.6(±0.2)	-	3.6(±0.2)	-	-	-	-	-	3.0(±0.0)
C26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C23	-	-	1.0(±0.8)	5.1(±0.5)	1.3(±0.2)	4.1(±0.5)	-	-	-	-	1.1(±0.2)	5.6(±1.0)
C4	-	2.0(±0.0)	-	-	-	0.6(±0.2)	-	-	-	-	-	1.6(±0.5)
C42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C54	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C50	-	-	0.8(±0.2)	2.1(±0.2)	-	2.1(±0.7)	-	-	-	-	0.5(±0.0)	3.3(±0.2)
C59	-	-	-	-	-	1.8(±0.2)	-	-	-	-	-	0.6(±0.2)
C55	-	-	1.8(±0.2)	-	-	0.8(±0.2)	-	-	-	-	-	0.8(±0.2)



ภาพที่ 4.7 การยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบเส้นใยรา (1) และสารสกัดหยาบจากน้ำเพาเลียงรา (2) จากราเอนโดไฟต์ C23, (A) บริเวณการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และ (B) บริเวณการยับยั้งเชื้อ *B. megaterium*



ภาพที่ 4.8 การยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบจากเส้นใยรา (1) และสารสกัดหยาบจากน้ำเพาเลียงรา (2) ของราเอนโดไฟต์ B15, (A) บริเวณการยับยั้ง *S. aureus* และ (B) บริเวณการยับยั้ง *P. fluorescens*



ภาพที่ 4.9 การยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบจากเส้นใยรา (1) และสารสกัดหยาบจากน้ำเพาเลียงรา (2) ของราเอนโดไฟต์ A42, (A) บริเวณการยับยั้ง *S. aureus* และ (B) บริเวณการยับยั้ง *B. megaterium*

การทดสอบประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากราเอนโดไฟต์
ดัดแปลงจากวิธีของ Brand-Williams Cuvelier and Berset (1995)

ประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากราเอนโดไฟต์ ด้วยวิธี DPPH (2,2 - Diphenyl - 1 - picrylhydrazyl radical scavenging capacity assay) โดยการนำสารสกัด
หยาบจากราเอนโดไฟต์ทั้งสารสกัดหยาบจากเส้นใยรา และสารสกัดหยาบจากน้ำเพาะเลี้ยงราที่
มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์สูงสุด จำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ A42, B15 และ C23

จากตารางที่ 4.6 พบว่าสารสกัดหยาบจากเส้นใยราไอโซเลท A42, C23 และ B15 ค่า
 IC_{50} เท่ากับ 279.04, 5531.89 และ 6726.38 $\mu\text{g/ml}$ สารสกัดหยาบจากน้ำเพาะเลี้ยงราไอโซเลท
A42, B15 และ C23 ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 288.82 $\mu\text{g/ml}$, 3472.68 $\mu\text{g/ml}$ และ 5565.88 $\mu\text{g/ml}$
ตามลำดับ เมื่อใช้ Ascorbic acid เป็นสารละลายมาตรฐาน ที่ความเข้มข้น 1 mg/ml มี IC_{50}
เท่ากับ 36.49 $\mu\text{g/ml}$

ตารางที่ 4.6 ค่าความเข้มข้นที่ทำให้ค่าอนุมูลอิสระลดลงครึ่งหนึ่ง (IC_{50}) ของสารสกัดหยาบ
จากราเอนโดไฟต์

ราเอนโดไฟต์	ค่าความเข้มข้นที่ทำให้ค่าอนุมูลอิสระลดลงครึ่งหนึ่ง IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	
	สารสกัดหยาบจาก เส้นใยรา	สารสกัดหยาบจาก น้ำเพาะเลี้ยงรา
A42	279.04 $\pm$ 29.91	288.82 $\pm$ 20.58
B15	6726.38 $\pm$ 585.93	3472.68 $\pm$ 282.51
C23	5531.89 $\pm$ 1177.00	5565.88 $\pm$ 1180.92
Ascorbic acid	36.49 $\pm$ 3.16	

หมายเหตุ IC_{50} ที่ได้จากการคำนวณของสมการเส้นตรงของสารละลายมาตรฐาน Ascorbic
acid และสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟต์ ระหว่างสารสกัดหยาบจากเส้นใยราและน้ำเพาะเลี้ยง
รา

การพิสูจน์เอกลักษณ์ของราเอนโดไฟต์

1. ราเอนโดไฟต์ A42

ลำดับเบสบริเวณ ITS ของ ribosomal RNA ประกอบด้วยส่วนของ ITS1 และ ITS4
มีความยาว 569 คู่เบส ดังภาพที่ 23 จากการพิสูจน์ทางชีวโมเลกุลพบว่าราเอนโดไฟต์ A42 มี
ความคล้ายคลึงกับรา *Aspergillus versicolor* 99% ในฐานข้อมูลของ GenBank

10	20	30	40	50
TCCGTAGGTG	AACCTGCGGA	AGGATCATT	CTGAGTGC	GCTGCCTCCG
GGCGCGGAAC	CTCCACCCG	TGAATACCTA	ACACTGTTGC	TTCGGCGGGG
AACCCCTCG	GGGGCGAGCC	GCCGGGGACT	ACTGAACTTC	ATGCCTGAGA
GTGATGCAGT	CTGAGTCTGA	ATATAAAATC	AGTCAAAACT	TTCAACAATG
GATCTCTTGG	TTCCGGCATC	GATGAAGAAC	GCAGCGAACT	GCGATAAGTA
ATGTGAATTG	CAGAATTCAG	TGAATCATCG	AGTCTTTGAA	CGCACATTGC
GCCCCCTGGC	ATTCCGGGGG	GCATGCCTGT	CCGAGCGTCA	TTGCTGCCCA
TCAAGCCCCG	CTTGTGTGTT	GGGTCGTCGT	CCCCCCCCCG	GGGACGGGCC
CGAAAGGCAG	CGGCGGCACC	GTGTCCGGTC	CTCGAGCGTA	TGGGGCTTTG
TCACCCGCTC	GACTAGGGCC	GGCCGGGCGC	CAGCCGACGT	CTCCAACCAT
TTTTCTTCAG	GTTGACCTCG	GATCAGGTAG	GGATACCCGC	TGAACTTAAG
CATATCAATA	AGCGGAGGA			

ภาพที่ 4.10 ลำดับเบสบริเวณ ITS ของราเอนโดไฟต์ A42

ลำดับเบสของราเอนโดไฟต์ A42 บริเวณ ITS ของ ribosomal RNA ประกอบด้วยส่วนของ rRNA (18s rRNA) ลำดับเบสที่ 1-19, misc RNA (ITS1) ลำดับเบสที่ 20-58, rRNA (5.8s rRNA) ลำดับเบสที่ 59-510, misc RNA (ITS4) ลำดับเบสที่ 511-549 และ rRNA (28s rRNA) ลำดับเบสที่ 550-569

จากลักษณะแสดงว่าราเอนโดไฟต์ A42 คือ ราในกลุ่ม *Mycelia sterillia* และเมื่อได้การวิเคราะห์ผลทางเทคนิคทางพันธุกรรม เพื่อตรวจสอบผลอีกครั้งพบว่าราชนิดนี้คือ *Aspergillus versicolor* ซึ่งจัดอยู่ใน Kingdom Fungi, Division Ascomycota, Order Eurotiales

เมื่อพิจารณาเฉพาะส่วนที่เป็น ITS โดยตัด Primer ทั้งสองตำแหน่งออกแล้วใช้โปรแกรม Blast ในฐานข้อมูล NCBI พบว่าราเอนโดไฟต์ A42 มีความคล้ายคลึงกับ *Aspergillus sydowii* 100% จึงสรุปได้ว่าราเอนโดไฟต์ A42 คือ *Aspergillus sydowii* ดังภาพที่ 24-25

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

Alignments							Download	GenBank	Graphics	Distance tree of results	
	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession				
☐	Aspergillus sydowii isolate 6017 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	835	835	100%	0.0	100%	KX363451.1				
☐	Aspergillus versicolor strain LSDSF0101 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	835	835	100%	0.0	100%	KY612329.1				
☐	Aspergillus sydowii isolate 13R-2-F01 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	835	835	100%	0.0	100%	KX958060.1				
☐	Aspergillus sydowii isolate 8L-9-F03 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	835	835	100%	0.0	100%	KX958054.1				
☐	Aspergillus sydowii isolate 8L-9-F02 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	835	835	100%	0.0	100%	KX958053.1				
☐	Aspergillus sp. strain M17 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	835	835	100%	0.0	100%	KX839406.1				
☐	Aspergillus versicolor strain LH1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	835	835	100%	0.0	100%	KX834318.1				
☐	Fungal sp. strain Xmf259 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	835	835	100%	0.0	100%	KX098218.1				
☐	Fungal sp. strain Xmf043 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	835	835	100%	0.0	100%	KX098037.1				
☐	Fungal sp. strain LBF18 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	835	835	100%	0.0	100%	KU728281.1				
☐	Aspergillus versicolor voucher BJ1-3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	835	835	100%	0.0	100%	KX527869.1				

ภาพที่ 4.11 ชนิดของเชื้อราที่มีความคล้ายคลึงกับราเอนโดไฟต์ A42 มากที่สุด 11 อันดับ

Aspergillus sydowii isolate 6017 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
Sequence ID: [KX363451.1](#) Length: 543 Number of Matches: 1

Range 1: 46 to 497 GenBank Graphics

Next Match Previous Match

Related Information

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
835 bits (452)	0.0	452/452 (100%)	0/452 (0%)	Plus/Plus
Query 1	ACCTCCACCGTGAATACCTAACTGTTGCTTCGGCGGGGAAACCCCTCGGGGGCGAG	60		
Sbjct 46	ACCTCCACCGTGAATACCTAACTGTTGCTTCGGCGGGGAAACCCCTCGGGGGCGAG	105		
Query 61	CCGCCGGGACTACTGAATTCATGCTGAGAGTGATGAGTCTGAGTCTGAATATAAA	120		
Sbjct 106	CCGCCGGGACTACTGAATTCATGCTGAGAGTGATGAGTCTGAGTCTGAATATAAA	165		
Query 121	TCAGTCAAAATTTCAACAATGGATCTTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGAGCGAA	180		
Sbjct 166	TCAGTCAAAATTTCAACAATGGATCTTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGAGCGAA	225		
Query 181	CTGCATAAGTAATGTAATGCAGAAATTCAGTGAATCATGAGTCTTTGAACGACATT	240		
Sbjct 226	CTGCATAAGTAATGTAATGCAGAAATTCAGTGAATCATGAGTCTTTGAACGACATT	285		
Query 241	GCGCCCCCTGGCATTCGGGGGGCATGCTGTCGAGCGTCATTGCTGCCATCAAGCCC	300		
Sbjct 286	GCGCCCCCTGGCATTCGGGGGGCATGCTGTCGAGCGTCATTGCTGCCATCAAGCCC	345		
Query 301	GGCTTGTGTGTTGGGTCGTCTCCCCCCCCGGGGGACGGGCGGAAAGGCAAGCGCGCA	360		
Sbjct 346	GGCTTGTGTGTTGGGTCGTCTCCCCCCCCGGGGGACGGGCGGAAAGGCAAGCGCGCA	405		
Query 361	CCGTGTCGGTCCCTCAGCGTATGGGGCTTTGTACCCGCTCGACTAGGGCGGGCCGGG	420		
Sbjct 406	CCGTGTCGGTCCCTCAGCGTATGGGGCTTTGTACCCGCTCGACTAGGGCGGGCCGGG	465		
Query 421	GCCAGCCGACGTCTCAACCATTTTCTTCAG	452		
Sbjct 466	GCCAGCCGACGTCTCAACCATTTTCTTCAG	497		

Activate Windows
Go to PC settings to activate Windows

ภาพที่ 4.12 การจัดลำดับเบสของรา *Aspergillus sydowii*

2. ราเอนโดไฟต์ B15

ลำดับเบสบริเวณ ITS ของ ribosomal RNA ประกอบด้วยส่วนของ ITS1 และ ITS4 มีความยาว 609 คู่เบส ดังภาพที่ 4.13 จากการพิสูจน์ทางชีวโมเลกุลพบว่าราเอนโดไฟต์ B15 มีความคล้ายคลึงกับรา *Endophytic fungi* sp.g 91.99 %

10	20	30	40	50
TCCGTAGGTG	AACCTGCGGA	GGGATCATTG	CTGGAACGCG	TCTCACGGCG
CACCCAGATA	CCCTATGTGA	ACCTATACCT	CTCTGTTGCC	TCGGCGCAGG
CTGGGAGCTT	CTGTAAACTC	CCCCACGCGG	ACCTCAACCC	TCCGCGCGGA
GCCGGCCCCG	CGGTGGCCCT	ACCAACTCTT	GTTTTTACCG	TGTCTCTTCT
GAGTAACCAA	AACAAAAAAT	GAATCAAAAC	TTTCAACAAC	GGATCTCTTG
GTTCTGGCAT	CGATGAAGAA	CGCAGCGAAA	TGCGATAAGT	AATGTGAATT
GCAGAATTCA	GTGAATCATC	GAATCTTTGA	ACGCACATTG	CGCCCCGCTGG
TATTCCAGCG	GGCATGCCTG	TTCGAGCGTC	ATTTCAACCC	TCAAGCTCTG
CTTGGTGTTG	GGGCGCGGCC	GCTCCCTCCG	GGGGGAGGCC	CGCCCTGAAA
TCCAGTGGCG	AGCTCGCTAG	GACTCCGAGC	GTAGTAGTTT	TCAACCTCGC
TATGGACGGA	CTAGCGGTGC	CCTGCCGTTA	AACCCCCCAA	TTTCTGAAAA
GTTGACCTCG	GATCAGGTAG	GAATACCCGC	TGAACTTAAG	CATATCAATA
AGCGGAGGA				

ภาพที่ 4.13 ลำดับเบสบริเวณ ITS ของราเอนโดไฟต์ B15

ลำดับเบสของราเอนโดไฟต์ B15 บริเวณ ITS ของ ribosomal RNA ประกอบด้วยส่วนของ rRNA (18s rRNA) ลำดับเบสที่ 1-19, misc RNA (ITS1) ลำดับเบสที่ 20-37, rRNA (5.8s rRNA) ลำดับเบสที่ 38-565, misc RNA (ITS4) ลำดับเบสที่ 566-589, และ rRNA (28s rRNA) ลำดับเบสที่ 590-609

จากลักษณะที่แสดงพบว่า ราเอนโดไฟต์ B15 คือรา *Endophytic fungi* sp. และเมื่อได้การวิเคราะห์ผลทางเทคนิคทางพันธุกรรม เพื่อตรวจสอบผลอีกครั้งพบว่าราชนิดนี้คือ *Endophytic fungi* sp.g ซึ่งจัดอยู่ใน Kingdom Fungi

เมื่อพิจารณาเฉพาะส่วนที่เป็น ITS โดยตัด primer ทั้งสองตำแหน่งออกแล้วใช้โปรแกรม blast ในฐานข้อมูล NCBI พบว่าราเอนโดไฟต์ B15 มีความคล้ายคลึงกับ *Valsaceae* sp. 100% สรุปได้ว่าราเอนโดไฟต์ B13 คือ เชื้อรา *Valsaceae* sp. ดังภาพที่ 4.14

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

Alignments								Download	GenBank	Graphics	Distance tree of results	
	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession					
☐	Valsaceae sp. GS52 genes for ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, partial and complete sequence	824	824	100%	0.0	95%	AB334109.1					
☐	Pseudoplagiostoma sp. CMUETT57 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcr	782	782	89%	0.0	97%	KR994682.2					
☐	Fungal endophyte culture-collection STR1:ICBG-Panama:TK514 18S ribosomal RNA gene, parti	747	747	100%	0.0	92%	KF435182.1					
☐	Fungal endophyte sp. g91 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spac	730	730	100%	0.0	92%	HM537064.1					
☐	Diaporthales sp. 1 ICMP 18914 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed	723	723	100%	0.0	91%	JN225917.1					
☐	Diaporthales sp. 2 ICMP 18915 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed	701	701	100%	0.0	91%	JN225879.1					
☐	Pseudoplagiostoma corymbiae CBS 132529 ITS region; from TYPE material	693	693	100%	0.0	91%	NR_120156.1					
☐	Pseudoplagiostoma eucalypti strain PE1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal tra	691	691	100%	0.0	91%	KT831771.1					
☐	Pseudoplagiostoma eucalypti genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial an	691	691	100%	0.0	91%	AB978374.1					

ภาพที่ 4.14 ชนิดของเชื้อราที่มีความคล้ายคลึงกับราเอนโดไฟต์ B15 มากที่สุด 9 อันดับ

Valsaceae sp. GS52 genes for ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, partial and complete sequence
Sequence ID: [AB334109.1](#) Length: 609 Number of Matches: 1

Range 1: 57 to 583 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
824 bits (446)	0.0	505/532 (95%)	9/532 (1%)	Plus/Plus
Query 1	GCCTCTCACGGCGACCCAGATACCCCTATGTGAACCTATACCTCTCTGTGCTCGGCGC	60		
Sbjct 57	GCCTCTCACGGCGACCCAGATACCCCTTGTGAACCTTATACCTATCTGTTGCTCGGCGC	116		
Query 61	AGGCTGGGAGCTTCTGTAACTCCCCACGCGACCTCAACCTCCGCGGAGCGCGCC	120		
Sbjct 117	AGGCTGGGAGCTTTTGTAACTCCCCACGCGAC-TC-A-CCTCTGCGGAGCAGGCC	173		
Query 121	CGCCGGTGGCCC-TACC--AACTCTGTTTTACGGTGTCTCTCTGAGTAACAAAACA	177		
Sbjct 174	CGCCGGCGCCCAACCAAACTCTGTTTTATAGTGTCTCTCTGAGTAAC--AAAACA	231		
Query 178	AAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGATCTCTTGGTTCTGGCATGATGAAGAAGCA	237		
Sbjct 232	AAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGATCTCTTGGTTCTGGCATGATGAAGAAGCA	291		
Query 238	GCAGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGAGATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGC	297		
Sbjct 292	GCAGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGAGATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGC	351		
Query 298	ACATTGCGCCCGCTGGTATTTCCAGCGGGCATGCTGTGAGCGTCAATTTCAACCTCAA	357		
Sbjct 352	ACATTGCGCCCGCTGGTATTTCCAGCGGGCATGCTGTGAGCGTCAATTTCAACCTCAA	411		
Query 358	GCTCTGCTTGGTGTGGGGCGCGCCGCTCCCTCCGGGGGAGGCCCGCCCTGAAATCCA	417		
Sbjct 412	GCTCTGCTTGGTGTGTGGGGCACTGCGCTCCCTCCGGGGGAGGCCCGCTGAAATCTA	471		
Query 418	GTGGCGAGCTCGTAGGACTCCGAGCGTAGTAGTTTCAACCTCGCTATGGACGGACTAG	477		
Sbjct 472	GTGGCGAGCTCGTAGGACTCCGAGCGTAGTAGTTTAACTCGCTATGGACGGACTAG	531		
Query 478	CGGTGCCCTGCCGTTAAACCCCTAAATTTCTGAAAAGTTGACCTCGGATCA	528		
Sbjct 532	CGGTGCCCTGCCGTTAAACCCCTAAATTTCTGAAAAGTTGACCTCGGATCA	583		

Related Information

Activate Windows
Go to PC settings to activate Windows

ภาพที่ 4.15 การจัดลำดับเบสของรา *Valsaceae sp.* ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับราเอนโดไฟต์ B15

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

การวิจัยในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากราเอนโดไฟต์จากพืชสมุนไพร คือ เหียง ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค โดยสกัดสารด้วยตัวทำละลายเอธิลอะซีเตท และศึกษาสารสกัดที่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์ ศึกษาสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟต์จากเหียงในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และจำแนกชนิดของเชื้อราเอนโดไฟต์ที่สร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยใช้วิธีทางชีวโมเลกุล ทำการเก็บตัวอย่างใบเหียงในจังหวัดนครราชสีมา 3 แหล่ง ได้แก่ อำเภอเสิงสาง (A) อำเภอเมือง (B) และอำเภอแก้งสนามนาง (C)

สรุปผลการวิจัย

1. แยกราเอนโดไฟต์จากเหียงได้หมด 79 ไอโซเลท โดยแยกได้จากบริเวณ midrib จำนวน 41 ไอโซเลท, Lateral vein จำนวน 20 ไอโซเลท และ Lateral vein (leaf margin) จำนวน 18 ไอโซเลท โดยคัดเลือกเฉพาะลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันพบว่าราเอนโดไฟต์ที่แยกได้สามารถแบ่งได้เป็น 6 ประเภทได้แก่ กลุ่ม Endophytic fungi , *Mycelia sterillia*, *Alternaria* sp., *Fusarium* sp., *Phomopsis* sp. และ *Xylaria* sp.

2. ศึกษาสารสกัดจากราเอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์ต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรค เมื่อนำราเอนโดไฟต์ที่แยกได้ 79 ไอโซเลท เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MEB ปริมาตร 100 ml บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 31 วัน แล้วทำการสกัดด้วยสารละลายเอธิลอะซีเตท แล้วนำสารสกัดหยาบที่ได้มาทดสอบกับเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ โดยวิธี Disc diffusion techniques จากการศึกษพบว่าสารสกัดหยาบจากน้ำเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟต์ (Broth) มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบสูงกว่า สารสกัดหยาบจากเส้นใยเชื้อราเอนโดไฟต์ (Mycelia)

3. ศึกษาสารสกัดจากราเอนโดไฟต์ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เมื่อนำสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟต์ทั้ง 3 ไอโซเลท ที่ให้ผลการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบสูงสุด มาทำการทดสอบหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทั้งจากส่วนของสารสกัดหยาบจากเส้นใยเชื้อราเอนโดไฟต์ และสารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟต์ ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH (2,2 - Diphenyl - 1 - picrylhydrazyl radical scavenging capacity assay) เมื่อเปรียบเทียบค่าความเข้มข้นที่ทำให้ค่าอนุมูลอิสระลดลงครึ่งหนึ่ง (IC_{50}) ที่ได้จากการคำนวณสมการเส้นตรงของสารสกัดจากราเอนโดไฟต์ ระหว่างสารสกัดหยาบจากเส้นใยราและน้ำเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟต์ พบว่าส่วนของน้ำเลี้ยงรา A42, C23 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่าสารสกัดจากเส้นใยรา และพบว่าส่วนของเส้นใยรา B15 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่าสารสกัดจากน้ำเลี้ยงรา

4. จำแนกชนิดของราเอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพโดยใช้วิธีทางชีวโมเลกุล นำราเอนโดไฟต์ทั้ง 3 ไอโซเลท ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงที่สุดมาทำการศึกษาลำดับเบสในส่วนของ Ribosomal DNA บริเวณของ ITS1 และ ITS4 พบว่าการจัดจำแนกด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล

สามารถจำแนกราเอนโดไฟต์ได้ 2 ไอโซเลท คือ เชื้อราไอโซเลท A42 มีความคล้ายคลึงกับ *Aspergillus sydowii* 100% เชื้อราไอโซเลท B15 ความคล้ายคลึงกับ *Valsaeae* sp. 100 % สำหรับเชื้อราไอโซเลท C23 ไม่สามารถพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุลได้

อภิปรายผล

1. ราเอนโดไฟต์จากเหียงได้หมด 79 ไอโซเลท โดยพบว่าราเอนโดไฟต์เป็นแหล่งของ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ ทางด้านการแพทย์ การเกษตร และทางอุตสาหกรรม (วรรณฤดี หิรัญรัตน์. 2552 : 90-100) บางชนิดเป็นเชื้อราที่ก่อโรคพืช ซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายต่อพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ และนอกจากนั้นยังทำให้พืชหลังการเก็บเกี่ยวเกิดการเน่าเสีย หรือมีผลกระทบต่อพืชในด้านอื่น จากทดลองสามารถคัดเลือกเฉพาะลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันพบว่าราเอนโดไฟต์ที่แยกได้สามารถแบ่งได้เป็น 6 ประเภท ได้แก่

Endophytic fungi เป็นเชื้อราที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชโดยไม่ทำให้พืชแสดงอาการของโรค บางชนิดยังมีคุณสมบัติช่วยป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคพืชและทำให้พืชอาศัยทนต่อสภาวะ แวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ราบางกลุ่มอาศัยอยู่ร่วมกับพืชแบบพึ่งพาอาศัย

Mycelia sterilia เป็นเชื้อราที่ไม่พบการสร้าง Asexual spores ที่มีลักษณะต่างไปจากเส้นใยปกติ และการอยู่ข้ามฤดูจะสร้างโครงสร้างพิเศษ เรียกว่า Sclerotia ซึ่งเกิดจากกลุ่มเส้นใยที่มาอัดตัวกันแน่นลักษณะคล้ายเมล็ดผักกาด ตัวอย่างเช่น เชื้อรา Sclerotium สาเหตุโรครากและโคนเน่าของพืชหลายชนิด เชื้อ Rhizoctonia สาเหตุโรคโคนเน่า ฯลฯ

Alternaria sp. เป็นเชื้อราที่ขยายพันธุ์โดย Asexual spores หรือโคนิเดีย (Conidia) ลักษณะ Muriform ซึ่งมีท่าย้านปลายเรียวมนคล้ายพินโบว์ลิง มีผนังกันทั้งตามยาวและตามขวางแบ่งออกเป็นเซลล์ย่อย ๆ หลายเซลล์ ส่วนปลายของสปอร์หรือส่วนคอซึ่งเป็นเซลล์อันปลายสุด เชื้อราชนิดนี้จัดเป็นเชื้อราที่ระบาดแพร่หลายมากที่สุดชนิดหนึ่ง ก่อให้เกิดโรคกับพืชต่าง ๆ หลายชนิด

Fusarium sp. เป็นเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคพืช ทำให้เกิดโรคเหี่ยว (Fusarium wilt) ในผักหลายชนิด เช่น กวางตุ้ง กะหล่ำดอก ฯลฯ ลักษณะอาการของโรคคือใบล่างของผักจะเหลืองและเริ่มเหี่ยว สังเกตได้ง่าย คือมีใบล่างเหี่ยวแห้งซีดช้ำหนึ่ง ทำให้ใบเบียดงอไปข้างที่มีใบแห้งเหี่ยว ต่อมาใบทางซิดนั้นจะเหี่ยวเพิ่มขึ้น และเหี่ยวทั่วต้นในเวลาต่อมา หรือผักเจริญแต่เพียงซีกเดียวก่อนแล้วเหี่ยวตายทั้งเถา

Phomopsis sp. เป็นเชื้อราที่พบการแพร่ระบาดอยู่ทั่วไปในประเทศไทย โดยส่วนใหญ่มีการแพร่ ระบาดในบริเวณสวนผลไม้ เนื่องจากมีสภาพอากาศร้อนชื้นเหมาะกับการเจริญของเชื้อ ก่อให้เกิดความเสียหายกับผลไม้หลายชนิด เช่น เงาะ ทุเรียน มังคุด ฯลฯ

Xylaria sp. เป็นราในชั้น Ascomycetes ซึ่งเป็นกลุ่มใหญ่ที่พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ ทั้งในสภาพที่เป็นแซพโรไฟท์และเอนโดไฟต์ ในเนื้อเยื่อพืชนอกจากนี้ยังมีความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและสร้างสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิอื่น ๆ ที่มีความสำคัญในการอุตสาหกรรมเอนไซม์

2. ศึกษาสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์ต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรค ราเอนโดไฟต์ที่แยกได้ 79 ไอโซเลท มาทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์มีราเอนโดไฟต์ 3 ไอโซเลท ที่ให้ผลการยับยั้งสูงสุด ได้แก่ B15 C23 และ A42 ตามลำดับ เชื้อแบคทีเรียที่ถูกยับยั้งได้ คือ *S. aureus*, *P. fluorescens*, *Vibrio* spp., *S. typhimurium* และ *B. megaterium* สาเหตุที่สารสกัดราเอนโดไฟต์ไม่สามารถทำลายเชื้อ *E.coli* ได้อาจเป็นเพราะสารสกัดไม่สามารถเข้าไปยับยั้งการเจริญเติบโตหรือการแพร่พันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียได้ กระบวนการที่จะทำลายแบคทีเรียได้นั้นจะมีกระบวนการดังนี้ สารสกัดจะเข้าไปทำลาย DNA มีผลทำให้แบคทีเรียไม่สามารถแบ่งเซลล์และทำให้เซลล์ตายในที่สุด

งานวิจัยนี้ได้ใช้สารควบคุมที่ให้ผลบวก เป็นสารปฏิชีวนะคือ Kanamycin ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค เมื่อเปรียบเทียบผลการยับยั้งของสารสกัดที่ได้กับแบคทีเรียก่อโรคและยาปฏิชีวนะ พบว่าสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟต์บางไอโซเลทสามารถให้ผลดีกว่า ซึ่งเป็นไปทางเดียวกันกับงานวิจัยของ สันทวี สิงห์วัฒนะ (2547 : บทคัดย่อ) ศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอนโดไฟต์ที่แยกจากกระท่อม (*Mitragyna speciosa* Korth) พบว่าสามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้ง *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* และ *C. albican* ได้

3. ศึกษาสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟต์ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ พบว่าสารสกัดหยาบส่วนของเส้นใยรา มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่าสารสกัดหยาบจากน้ำเพาะเลี้ยงรา ทำให้เห็นได้ว่าสารต้านอนุมูลอิสระส่วนใหญ่ถูกเก็บสะสมไว้ในเซลล์จึงเหมาะแก่การศึกษาเพื่อในทางการแพทย์และอุตสาหกรรม ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kim และคณะ (1999) ทำการแยก Ergosterol จากเห็ด *Armillariella mellea* และทดสอบฤทธิ์ด้านการเกิด Oxidation พบว่าสามารถยับยั้งการเกิด Lipid peroxidation ใน Microsome ในตับของหนูได้ดี และยับยั้งการเกิด Oxidation ได้ดีกว่าสารที่ใช้ในการต้านการเกิด Oxidation คือ α -Tocopherol และ Thiourea (Kim and others. 1999 : 819-823)

4. จำแนกชนิดของราเอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพโดยใช้วิธีทางชีวโมเลกุล นำราเอนโดไฟต์ทั้ง 3 ไอโซเลท ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงสุดมาทำการศึกษา ในการวิจัยในครั้งนี้ได้เลือกทำการศึกษาโดยใช้ข้อมูลจากส่วน ITS1 และ ITS4 ของยีน rRNA เนื่องจากข้อมูลจากส่วน ITS มีความแปรผันสูง (High variable region) สามารถใช้เพื่อจัดจำแนกราเอนโดไฟต์จนถึงระดับ Genus และ Species ได้เป็นอย่างดีโดยสามารถจำแนกราเอนโดไฟต์ได้ 2 ไอโซเลท และไม่สามารถแยกราเอนโดไฟต์ได้ 1 ไอโซเลท ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ (ณัฐวุฒิ รุ่งจินดามัย. 2005 : บทคัดย่อ) พบว่ามีเพียงราเอนโดไฟต์บางไอโซเลทเท่านั้นที่จำแนกได้ถึงระดับ Order หรือ Family โดยไม่สามารถระบุชี้ได้ว่าเป็น Genus หรือ Species ได้ เนื่องจากข้อมูลลำดับเบส DNA ใกล้เคียงที่นำมาเปรียบเทียบจะเป็นลำดับเบส DNA ของเชื้อราที่ไม่ทราบชื่อ (Unknown fungal sequence)

ข้อเสนอแนะ

ผลที่ได้จากงานวิจัยนี้สามารถเป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาการใช้ประโยชน์จากสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟต์ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค และยังมีข้อมูลอีกหลายด้านที่ควรจะมีการศึกษาเพิ่มเติม ดังนี้

1. ข้อเสนอแนะจากวิจัยในครั้งนี้

1.1 ศึกษาองค์ประกอบที่อยู่ในสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟต์ โดยการนำสารสกัดหยาบที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์มากขึ้น เพื่อจะได้ทราบชนิดของสารประกอบที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้

1.2 ศึกษาความสามารถคงฤทธิ์ของสารสกัดหยาบ เพื่อค้นหาวิธีการใช้สารสกัดหยาบอย่างมีประสิทธิภาพ เช่น สภาวะการเก็บรักษา ภาชนะบรรจุ การแปรรูป การสกัด ฯลฯ

2. ข้อเสนอแนะในการวิจัยครั้งต่อไป

2.1 ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟต์ต่อการยับยั้งต่อเซลล์มะเร็ง

2.2 ศึกษาความเป็นไปได้ในการนำสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟต์มาใช้แทนยาและเคมีภัณฑ์ เพื่อเป็นการรักษาแบบแพทย์ทางเลือก

บรรณานุกรม

- กนกวรรณ สว่าง และคณะ. (2547). ศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเชื้อ *Bipolaris oryzaed* ที่เป็นสาเหตุโรคพืช 12 สายพันธุ์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- กฤต เพชรสุวรรณ, วินัส สุวรรณนันทน์ และศวีร์ ดันติกุล. (2543). ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย และราเอนโดไฟต์จากสมุนไพรไทย. โครงการการเรียนการสอนเสริมประสบการณ์ สาขาวิจัยและพัฒนาเภสัชภัณฑ์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- จันทิมา อุทะกะ. (2548). สารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์จากราเอนโดไฟต์ ที่แยกจาก ใบกวาวเครือขาว *Pueraria mirifica*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ชัยวัฒน์ บุญมากาศ และคณะ. (2550). “สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอนโดไฟท์ของพืช ในวงศ์ Stemonaceae ในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในพืช.” วารสารวิทยาศาสตร์ เกษตร. ฉบับพิเศษ : 339-343.
- ณัฐภูมิ รุ่งจินดามัย. (2549). เชื้อราเอนโดไฟต์ที่ผลิตสารต้านจุลินทรีย์ในพืชสกุล *Garcinia*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- เต็ม สมิตินันท์. (2538). อนุสรณ์ ศ. ดร. เต็ม สมิตินันท์. กรุงเทพฯ : จำไทยเพรส. (พิมพ์เนื่องในโอกาสงานพระราชทานเพลิงศพศาสตราจารย์ ดร.เต็ม สมิตินันท์ 27 มิถุนายน 2538).
- ทัศนีย์ ยุทธสิทธิ์โยธิน. (2544). การศึกษาความสัมพันธ์ในระดับโมเลกุลของไม้วงศ์ยาง และเชื้อราเอนโดไมคอร์ไรซาในป่าของประเทศไทย. รายงานการวิจัยในโครงการ พัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพ ครั้งที่ 4. กรุงเทพมหานคร.
- ธวัชชัย สันติสุข. (2555). “ป่าเต็งรัง.” ป่าไม้ของประเทศไทย. [ออนไลน์]. 55(3) : 91. แหล่งที่มา : <https://drive.google.com/file/d/0B3vz5MMup-c4MDRQalMzdHQ5blk/view> [25 ตุลาคม 2559].
- นุชจิรา อ่อนนวล และคณะ. (2547). “สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพราเอนโดไฟต์ที่แยกจาก เปล้าใหญ่ (*Croton oblongifolius*) ในจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.” วารสาร มหาวิทยาลัยทักษิณ. 12(2) : 90-97.
- พรเทพ ชมชื่น. (2547). สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอนโดไฟต์ *Phomopsis* sp. จากผักหวานเมา *Urobotrya siamensis*. และไอโซเลต LRVB 20 จากกระดังงา *Leea rubra*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

- ภัทราพรรณ พรหมแก้ว, สายสมร ลำยอง และสมบุญ บุษบรรณ. (2559). “การประเมินฤทธิ์สารต้านจุลินทรีย์ก่อโรคพืชของราเอนโดไฟต์ที่แยกจากกาฝากและพืชอาศัยของกาฝาก.” **วารสารเกษตร**. แหล่งที่มา <http://www.journal.agri.cmu.ac.th/content.asp?JID=133&CID=1008> [27พฤศจิกายน 2559].
- วรรณฤดี หิรัญรัตน์. (2552). “สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอนโดไฟต์”. **วารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ**. (12) 90-100.
- วันพร เข้มมุกต์. (2552). การควบคุมโรคใบจุดดำของลำไย *Colletotrichum sp.* โดยใช้เชื้อราเอนโดไฟต์ในลำไย. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืช มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- สิตา ปรีดานนท์. (2551). การคัดเลือกและการจำแนกชนิดเชื้อราที่สร้างสารต้านจุลินทรีย์จากกล้วยงา. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- สินทวี สิงห์วัฒน์. (2547). สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอนโดไฟต์ที่แยกจากกระท่อม *Mitragyna speciosa* Korth. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สุจิตรา หาญทอง. (2552). สารต้านมะเร็งจากราเอนโดไฟต์ที่คัดเลือกจากราขี้ดัด *Brucea javanica* Marr. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สุทธิณี ลิขิตตระกูลรุ่ง. (2546). การควบคุม *Alternaria solani* สาเหตุของโรคใบไหม้ของมะเขือเทศโดยเชื้อราเอนโดไฟต์ของพืชตระกูลมะเขือ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืช มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- อรรพรรณ ปิยะบุญ. (2553). “การควบคุมเชื้อรา *Phytophthora parasitica* Dastur. สาเหตุโรคใบร่วงยางพาราโดยเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์.” **วารสารวิชาการเกษตร**. 28(2) : 120-133.
- Ames, B.N., Shigenaga, M.K. and Hagen, T.M. (1993). “Oxidants, antioxidants, and the degenerative disease of aging.” **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 90 : 7915-7922.
- Bacon, K B. and others. (1977). “Epichloetypina from toxic tall fescue grasses.” **Applied and Environmental Microbiology**. 34 : 576- 581.
- Bayman, P. and others. (1996). “Variation in endophytic fungi from roots and leaves of Leaves of *Lepanthes* sp. (Orchidaceae).” **New phytologist**. 135 : 143-149.
- Bergmann, S. and others. (2007). “Genome driven discovery of PKS-NRPS hybrid metabolites from *Aspergillus nidulans*.” **Nature Chemical Biology**. 3 : 213-217.

- Bok J.W. and others. (2006). Genomic mining for *Aspergillus* natural products. **Chemical Biology**. 13 : 31–37.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. and Berset, C. (1995). "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity." **Food Science and Technology**. 28 : 25-30.
- Clardy J. and Walsh C. (2004) Lessons from natural molecules. **Nature**. 432 : 829-837.
- Daisy, B.H. and others. (2002). "Nattthalene an insect repellent is produced by *Muscodora vitigenus* a novel endophytic fungus." **Microbiology**. 148 : 3737-3741.
- Dalziel, J.E., Finnh, S.C. and Dunlop, J. (2005). "The fungal neurotoxin Lolitrem B inhibits the function of human large conductance calcium – activated potassium channels". **Toxicology Letters Journal** 155 : 421-426.
- Dariusz, P., Malinowski. and David, P. (2000). "Adaptations of Endophyte-Infected cool-season grasses to Environmental stresses : Mechanisms of drought and mineral stress tolerance." **Crop & Pasture Science**. 4 : 923-940.
- Demain, A.L. (1999). "Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms." **Applied Microbiology and Biotechnology**. 52 : 455-463.
- Eyberger, A.L., Dondapati, R. and Proter, J.R. (2006). "Endophyte fungal isolate from *Podophyllum peltatum* produce Podophyllotoxin." **Journal of Natural Products**. 67 : 1121-1124.
- Feiwen, M. (2007). **Paclitaxel**. [Online]. Available : http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_m60190.html [2016 October 8].
- Hall, T.A. (2005). **BioEdit V.7.0.9 : a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT**. (Online). Available : <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit.html> [2008 November 10].
- Hawksworth, D.L. (1991). "The fungal dimension of diversity : magnitude , significance and conservation." **Mycology Research**. 95 : 641-655.
- Hertweck, C. (2009). "Hidden biosynthetic treasures brought to light." **Nature Chemical Biology**. 5 : 450-452.
- Hyde, K.D. and Soytong, K. (2007). "Understanding microfungi diversity a critique." **Cryptogamie Mycologie**. 28 : 281-289.

- Johnston, P.R. and Jones, D. (1997). "Relationships among *Colletotrichum* sp. Isolates from fruit-rots assessed using rDNA sequences." **Mycologia**. 89 : 420-430.
- Keller, N. and Yu, J.H. (2005). "Regulation of Secondary Metabolism in Filamentous Fungi." **Annual Review of Phytopathology**. 43 : 437-458.
- Khosla, C. (1997). Harnessing the biosynthetic potential of modular polyketide synthases. **Chemical Review**. 97 : 2577-2590.
- Kim, H.Y. and others. (2007). "Some fungal endophytes from vegetable crops and their anti-oomycete activities against tomato late blight." **Letters in Applied Microbiology**. 44 : 332-337.
- Kim, S.W. and others. (1999). "Antioxidant activities of ergosterol peroxide (5,8-epidioxy - 5 α ,8 α - ergosta-6, 22E-diene-3 β -ol) in *Armillariella mellea*." **Bulletin of the Korean Chemical Society**. 7 : 819-823.
- Knappe, T.A. and others. (2008). Isolation and structural characterization of capistruin, a lasso peptide predicted from the genome sequence of *Burkholderia thailandensis* E264. **Journal of the America Chemical Society**. 13 : 11446-11454.
- Lacap, D.C., Hyde, K.D. and Liew, E.C.Y. (2003). "An evaluation of the fungal 'morphotype' concept based on ribosomal DNA sequences." **Fungal Diversity**. 12 : 53-66.
- Lai, A. K. and others. (2007). "Colour in relation to total antioxidant capacity of beers assessed using the FRAP assay." **Alcohol and Alcoholism**. 42 : 55-57.
- Lai, K. and others. (2012). "Antifungal activity of *Paenibacillus polymyxa* strain SG-6 against *Penicillium digitatum* in a dual culture test." **Postharvest Biology and Technology**. [Online]. 69 : 40-48. Available : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925521412000506> [2016 October 19].
- Lee, S.O. and others. (2009). "Mycofumigation with *Oxyporus latemarginatus* EF069 for control of postharvest apple decay and *Rhizoctonia* root rot on moth orchid." **Applied Microbiology**. 106 : 1213-1219.
- Liu, C.H. and others. (2001). "Antifungal activity of *Artemisia annua* endophyte culture against phytopathogenic fungi." **Journal of Biotechnology**. 88 : 277-282.

- Mazzaglia, A. and others. (2001). "Sequence analysis of the 5.8S rDNA and ITS regions in evaluating genetic relationships among some species of *Hypoxylon* and related genera." **Mycological Research**. 105 : 670-675.
- McAlpine, J.B. and others. (2005). "Microbial genomics as a guide to drug discovery, structural elucidation : ECO02301, a novel antifungal agent, as an example." **Journal of Natural Products**. 68 : 493-496.
- Nakabeppu, Y. and others. (2006). "Mutagenesis and carcinogenesis caused by the oxidation of nucleic acids." **Journal of Biological Chemistry**. 387 : 373-382.
- Nick. H. (2016). Image Number K8931-2. [Online]. Available : <https://www.ars.usda.gov/oc/images/photos/jul00/k8931-2> [2016 August 13].
- O'Donnell, K. and Cigelnik, E. (1997). "Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* sp. are orthologous." **Molecular Phylogenetics and Evolution**. 7 : 103-116.
- Petrini, O., Andrews, J.H. and Hirano, S.S. (1991). "Fungal Endophyte of tree leaver." **Microbial Ecology**. New York : Springer-Verlag.
- Perkins, M. (2011). **Bacillus megaterium 1,000x 1**. [Online]. Available : <https://www.flickr.com/photos/occbio/6414376363/in/photostream> [2011 November 27].
- Paul, A.C. and others. (2012). "Microbiology of Lonar Lake and other soda lakes." **The ISME Journal**. 7 : 468-476.
- Puri, S.C. and others. (2006). "The endophytic fungi *Trametes Hirsuta* as a novel alternative source of podophyllotoxin and related aryl tetralin lignans." **Journal of Biochemistry**. 122 : 494-510.
- Porras-Alfaro A. and Bayman, P. (2011). Hidden fungi, emergent properties: endophyte and microbiomes. **Annu Review Phytopathol**. 49 : 291-315.
- Posada, F. and others. (2007). "Inoculation of coffee plants with the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota : Hypocreales)." **Mycological Research**. 111 : 748-757.
- Rubini, M.H. and others. (2005). "Diversity of endophytic fungi community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of (*Crinipellis peniciosa*) causal agent of witches' s Broom Disease." **International Journal of Biology Science**. 1 : 24-33.

- Schroeckh, V. and others. (2009). "Intimate bacterial–fungalininteraction triggers biosynthesis of archetypal polyketides in *Aspergillus nidulans*." **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State of America**. 106 : 14558–14563.
- Schulz, B. and Boyle, C. (2005). "The endophytic continuum." **Mycological Research** 109 : 661-686.
- Schwarz, M. and orthers. (2004). "3-Hydroxypropionic acid as a namaticidal principle in endophytic fungi. **Phytochemistry**. 65 : 2239-2245.
- Selvin, J. and others. (2010). Sponge-microbial interactions : Ecological implications and bioprospecting avenues. **Critical Review in Microbiology**. 36 : 82-90.
- Sieber, S.A. and Marahiel, M.A. (2005). "Molecular mechanisms underlying nonribosomal peptide synthesis : approaches to new antibiotics." **Chemical Review**. 105 : 715–738.
- Song, Y.C. and others. (2005). "Characterization of graphislactone A as the antioxidant and free radical-scavenging substance from the culture of *Cephalosporium* sp. IFB-E001 an endophytic fungus in *Trachelospermum jasminoides*." **Biology Pharmaceutical Bulletin**. 28 : 506-509.
- Sriubolmas, N. and orthers. (2551). "Endophytic fungi with anti-microbial, anti-cancer and anti-malarial activities isolated from Thai medicinal plants." **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. 20 : 265-272.
- Staley, J.T. and others. (1997). **The microbial world: foundation of the biosphere. American Academy of Microbiology**, Washington DC.
- Strobel, G.A. (1993). "Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of pacific yew." **Science**. 260 : 214-216.
- _____. (2003). "Endophytes as sources of bioactive products." **Microbes and Infaction**. 6 : 535-544.
- Strobel, G.A. and others. (1996). "Taxol from Pestalotiopsis microspora an endophytics fungus of *Taxus wallachiana*." **Microbiology**. 142 : 435-440.
- _____. (2001). "Volatile antimicrobials from *Muscodor albus* ,a novel endophytic fungus." **Microbiology**. 147 : 2943-2950.
- _____. (2004). "Natural products from endophytic microorganisms." **Journal of Natural Products**. 67 : 257-268.
- Tan, R.X. and Zou, W.X. (2001). "Endophytes a rich source of functional metabolites." **Natural Product Report**. 18 : 448-459.

- Todd, H. (2016). **The molecular formula for naphthalene is C₁₀H₈**. [Online]. Available : <http://www.chemistry.about.com/od/factsstructures/ig/Chemical-Structures---N/Naphthalene.htm> [2016 August 8].
- Urairuj, C., Khanongnuch, C. and Lumyong, S. (2003). "Ligninolytic enzymes from tropical endophytic Xylariaceae." **Fungal Diversity**. 13 : 209-219.
- Valko, M. and others. (2007). "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease." **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. 39 : 4484-4489.
- Vega, F.E. and others. (2010). "Fungal endophyte diversity in coffee plants from Colombia, Hawai'i, Mexico and Puerto Rico." **Fungal Ecology**. 3 : 122-138.
- Vichitphan, K. and Sirikhansaeng, P. (2007). "Flavonoid content and antioxidant activity of Krachai-dun (*Kaempferia parviflora*) wine." **KMITL Science and Technology**. 7 : 97-105.
- Vilgalys, R. (2003). "Taxonomic misidentification in public DNA databases." **New Phytologist**. 160 : 4-5.
- Wang, L.W. and others. (2011). "Natural products with antitumor activity from endophytic fungi." **Mini - Reviews in Medicinal Chemistry**. 11 : 1056-1074.
- White, T.J. and others. (1990). "Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics." In **PCR Protocols: a guide to methods and applications**. San Diego : Academic Press.
- Wilk, A. (2007). **Spironolactone**. [Online]. Available : http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_m77860.html [2016 October 8].
- Wiyakrutta, S. and others. (2004). "Endophytic fungi with anti-microbial, anti-cancer and anti-malarial activities isolated from Thai medicinal plants." **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 20 : 265-272.
- Zhang, H.W., Song, Y.C. and Tan, R.X. (2006). "Biology and chemistry of endophytes." **Natural Product Reports**. 23 : 753-771.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ

1. Potato dextrose agar (PDA)

มันฝรั่งปอกเปลือก	200 g
Glucose	20 g
Agar	15 g
น้ำกลั่น	1000 ml

2. Malt extract agar (MEA)

Malt extracts	200 g
Peptone	1 g
Glucose	20 g
Agar	15 g
น้ำกลั่น	1000 ml

3. Carrot agar (CA)

แครอทปอกเปลือก	200 g
Agar	15 g
น้ำกลั่น	1000 ml

4. Yeast extract agar (YEA)

Peptic digest (animal tissue)	5 g
Yeast extracts	3 g
Agar	15 g
น้ำกลั่น	1000 ml
ปรับ pH 7.2±0.2	

5. V8 agar

V-8 juice	100 ml
Yeast extracts	2 g
L-Asparagine	10 g
Calcium carbonate	2 g
Glucose	2 g
Agar	15 g
น้ำกลั่น	1000 ml
ปรับ pH 5.7±0.2	

6. Trypticase soy broth (TSB)

Pancreatic digest of casein	15 g
Enzymatic digest of soybean meal	3 g
Sodium chloride	5 g
น้ำกลั่น	1000 ml

7. Mueller Hinton agar (MHA)

Beef extract	2 g
Acid digest of casein	17.5 g
Soluble starch	1.5
Agar	15 g
น้ำกลั่น	1000 ml

ภาคผนวก ข สันฐานวิทยาของราเอนโดไฟต์ และปริมาณส่วนสกัดหยาบจาก
ราเอนโดไฟต์

1. สันฐานวิทยาของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากใบเหียง

ตารางผนวกที่ ข-1 ลักษณะของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากใบเหียงจากอำเภอเสิงสาง
ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ

ไอโซเลท	ชนิด ราเอนโดไฟต์	อาหารเลี้ยง เชื้อ	ลักษณะโคโลนีที่ปรากฏ	สีของโคโลนี
A1	Mycelia sterillia	PDA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		MEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		YEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		CA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	เทา
		V8	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
A3	Alternaria sp.	PDA	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมขอบหยัก	เทา
		MEA	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมขอบเรียบ	เทา
		YEA	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมขอบเรียบ	เทา
		CA	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมขอบหยัก	ขาว
		V8	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมขอบหยัก	ขาว
A4	Alternaria sp.	PDA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	เทา
		MEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	ขาว
		YEA	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมขอบเรียบ	เทา
		CA	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		V8	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
A7	Phomopsis sp.	PDA	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมเป็นชั้นๆ	ขาว
		MEA	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมเป็นชั้นๆ	ขาว
		YEA	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมเป็นชั้นๆ	ขาว
		CA	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมเป็นชั้นๆ	ขาว
		V8	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมเป็นชั้นๆ	ขาว
A8	Phomopsis sp.	PDA	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมเป็นชั้นๆ	ขาว
		MEA	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมเป็นชั้นๆ	ขาว
		YEA	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมเป็นชั้นๆ	ขาว
		CA	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมเป็นชั้นๆ	ขาว
		V8	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมเป็นชั้นๆ	ขาว
A9	Phomopsis sp.	PDA	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมเป็นชั้นๆ	ขาว
		MEA	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมเป็นชั้นๆ	ขาว
		YEA	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมเป็นชั้นๆ	ขาว
		CA	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมเป็นชั้นๆ	ขาว
		V8	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมเป็นชั้นๆ	ขาว
A10	Mycelia sterillia	PDA	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมขอบหยัก	ขาว
		MEA	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมขอบหยัก	ขาว
		YEA	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมขอบหยัก	ขาว
		CA	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมขอบหยัก	ขาว
		V8	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมขอบหยัก	ขาว

ตารางผนวกที่ ข-1 (ต่อ)

ไอโซเลท	ชนิด ราเอนโดไฟต์	อาหารเลี้ยง เชื้อ	ลักษณะโคโลนีที่ปรากฏ	สีของโคโลนี
A11	Endophytic fungi	PDA	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมขอบเรียบ	เทา
		MEA	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		YEA	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมขอบเรียบ	เทา
		CA	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมขอบเรียบ	เทา
		V8	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
A12	Mycelia sterillia	PDA	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมขอบหยัก	เทา
		MEA	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมขอบเรียบ	เทา
		YEA	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว-เทา
		CA	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมขอบหยัก	ขาว
		V8	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมขอบหยัก	ขาว
A13	Endophytic fungi	PDA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	เทา
		MEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	ขาว
		YEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	เทา
		CA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	ขาว
		V8	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	ขาว
A14	Mycelia sterillia	PDA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	ขาว
		MEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	ขาว
		YEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	เทา
		CA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	ขาว
		V8	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	ขาว
A15	<i>Alternaria</i> sp.	PDA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	เทา
		MEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	ขาว
		YEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	เทา
		CA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	ขาว
		V8	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	ขาว
A18	Endophytic fungi	PDA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		MEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		YEA	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		CA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		V8	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
A19	Mycelia sterillia	PDA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	เทา
		MEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	เทา
		YEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	เทา
		CA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	ขาว
		V8	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	ขาว
A20	Endophytic fungi	PDA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	เทา
		MEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		YEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	เทา
		CA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		V8	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว

ตารางผนวกที่ ข-1 (ต่อ)

ไอโซเลท	ชนิด ราเอนโดไฟต์	อาหารเลี้ยง เชื้อ	ลักษณะโคโลนีที่ปรากฏ	สีของโคโลนี
A22	Endophytic fungi	PDA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	ขาว
		MEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	เทา
		YEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	ขาว
		CA	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมขอบหยัก	ขาว
		V8	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมขอบหยัก	ขาว
A23	Endophytic fungi	PDA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	เทา
		MEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		YEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	เทา
		CA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		V8	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
A24	Endophytic fungi	PDA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		MEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		YEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		CA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		V8	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบปลายแหลม	ขาว
A26	Endophytic frungi	PDA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		MEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		YEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		CA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบปลายแหลม	ขาว
		V8	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบปลายแหลม	ขาว
A31	Endophytic fungi	PDA	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมขอบหยักปลายแหลม	น้ำตาล
		MEA	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมขอบเรียบ	เทา
		YEA	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมขอบเรียบ	เทา
		CA	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมขอบหยักปลายแหลม	ขาว
		V8	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมขอบหยักปลายแหลม	ขาว
A32	Mycelia sterillia	PDA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	เทา
		MEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	เทา
		YEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	เทา
		CA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	ขาว
		V8	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	ขาว
A33	<i>Alternaria</i> sp.	PDA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	เทา
		MEA	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมขอบเรียบ	เทา
		YEA	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมขอบเรียบ	เทา
		CA	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		V8	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
A34	<i>Phomopsis</i> sp.	PDA	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมเป็นชั้นๆ	ขาว
		MEA	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมเป็นชั้นๆ	ขาว
		YEA	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมเป็นชั้นๆ	ขาว
		CA	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมเป็นชั้นๆ	ขาว
		V8	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมเป็นชั้นๆ	ขาว

ตารางผนวกที่ ข-1 (ต่อ)

ไอโซเลท	ชนิด ราเอนโดไฟต์	อาหารเลี้ยง เชื้อ	ลักษณะโคโลนีที่ปรากฏ	สีของ โคโลนี
A35	Endophytic fungi	PDA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	เทา
		MEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	เทา
		YEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	เทา
		CA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	เทา
		V8	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	เทา
A36	Mycelia sterillia	PDA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	ขาว
		MEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	ขาว
		YEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	ขาว
		CA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	ขาว
		V8	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	ขาว
A38	Endophytic fungi	PDA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		MEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		YEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		CA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		V8	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
A39	Endophytic fungi	PDA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	ขาว
		MEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	ขาว
		YEA	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมขอบหยัก	ขาว
		CA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	ขาว
		V8	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	ขาว
A40	Mycelia sterillia	PDA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบปลายแหลม	น้ำตาล
		MEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบปลายแหลม	ขาว
		YEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบปลายแหลม	ขาว
		CA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบปลายแหลม	เทา
		V8	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบปลายแหลม	ขาว
A41	<i>Xylaria</i> sp.	PDA	เส้นใยปลายแหลมชี้ขึ้นเหนืออาหาร	ขาว-เทา
		MEA	เส้นใยปลายแหลมชี้ขึ้นเหนืออาหาร	ขาว-เทา
		YEA	เส้นใยปลายแหลมชี้ขึ้นเหนืออาหาร	ขาว-เทา
		CA	เส้นใยปลายแหลมชี้ขึ้นเหนืออาหาร	ขาว-เทา
		V8	เส้นใยปลายแหลมชี้ขึ้นเหนืออาหาร	ขาว-เทา
A42	Mycelia sterillia	PDA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	เทา
		MEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		YEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		CA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		V8	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
A45	Mycelia sterillia	PDA	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมขอบเรียบ	เทา
		MEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	เทา
		YEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	เทา
		CA	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		V8	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว

ตารางผนวกที่ ข-1 (ต่อ)

ไอโซเลท	ชนิด ราเอนโดไฟต์	อาหารเลี้ยง เชื้อ	ลักษณะโคโลนีที่ปรากฏ	สีของโคโลนี
A46	<i>Alternaria</i> sp.	PDA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	เทา
		MEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		YEA	เส้นใยฟูโคโลนีกลมขอบหยัก	เทา
		CA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	เทา
		V8	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
A55	<i>Xylaria</i> sp.	PDA	เส้นใยปลายแหลมชี้ขึ้นเหนืออาหาร	ขาว-เทา
		MEA	เส้นใยปลายแหลมชี้ขึ้นเหนืออาหาร	ขาว-เทา
		YEA	เส้นใยปลายแหลมชี้ขึ้นเหนืออาหาร	ขาว-เทา
		CA	เส้นใยปลายแหลมชี้ขึ้นเหนืออาหาร	ขาว-เทา
		V8	เส้นใยปลายแหลมชี้ขึ้นเหนืออาหาร	ขาว-เทา
A56	<i>Xylaria</i> sp.	PDA	เส้นใยปลายแหลมชี้ขึ้นเหนืออาหาร	ขาว-เทา
		MEA	เส้นใยปลายแหลมชี้ขึ้นเหนืออาหาร	ขาว-เทา
		YEA	เส้นใยปลายแหลมชี้ขึ้นเหนืออาหาร	ขาว-เทา
		CA	เส้นใยปลายแหลมชี้ขึ้นเหนืออาหาร	ขาว-เทา
		V8	เส้นใยปลายแหลมชี้ขึ้นเหนืออาหาร	ขาว-เทา
A59	<i>Alternaria</i> sp.	PDA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		MEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		YEA	เส้นใยฟูโคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		CA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		V8	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	เทา
A61	<i>Alternaria</i> sp.	PDA	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		MEA	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		YEA	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		CA	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		V8	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
A62	Endophytic fungi	PDA	เส้นใยฟูโคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		MEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		YEA	เส้นใยฟูโคโลนีกลมขอบหยัก	ขาว
		CA	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		V8	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
A63	<i>Mycelia sterillia</i>	PDA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		MEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	เทา
		YEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	เทา
		CA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		V8	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
A64	<i>Alternaria</i> sp.	PDA	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		MEA	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		YEA	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมขอบเรียบ	เทา
		CA	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		V8	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว

ตารางผนวกที่ ข-1 (ต่อ)

ไอโซเลท	ชนิด ราเอนโดไฟต์	อาหารเลี้ยงเชื้อ	ลักษณะโคโลนีที่ปรากฏ	สีของ โคโลนี
A67	Endophytic fungi	PDA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	เทา
		MEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	เทา
		YEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	เทา
		CA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		V8	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	เทา
A72	<i>Alternaria</i> sp.	PDA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	เทา
		MEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	เทา
		YEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	เทา
		CA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		V8	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	เทา

ตารางผนวกที่ ข-2 ลักษณะของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากใบเหียงจากอำเภอเมือง
ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ

ไอโซเลท	ชนิด ราเอนโดไฟต์	อาหารเลี้ยง เชื้อ	ลักษณะโคโลนีที่ปรากฏ	สีของโคโลนี
B1	Endophytic fungi	PDA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		MEA	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		YEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	เทา
		CA	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		V8	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
B2	<i>Endophytic Fungi</i> sp.	PDA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	เทา
		MEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	ขาว
		YEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	เทา
		CA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	ขาว
		V8	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	ขาว
B3	Mycelia sterillia	PDA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		MEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		YEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		CA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		V8	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	เทา
B4	Mycelia sterillia	PDA	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมขอบหยัก	เทา
		MEA	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมขอบเรียบ	เทา
		YEA	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมขอบเรียบ	เทา
		CA	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมขอบหยัก	ขาว
		V8	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมขอบหยัก	ขาว
B5	Mycelia sterillia	PDA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	เทา
		MEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	เทา
		YEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	เทา
		CA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		V8	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	เทา
B6	Endophytic fungi	PDA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	ขาว
		MEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	ขาว
		YEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	ขาว
		CA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	ขาว
		V8	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	ขาว
B7	Endophytic fungi	PDA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	ขาว
		MEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	ขาว
		YEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	ขาว
		CA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	ขาว
		V8	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	ขาว
B8	Endophytic fungi	PDA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	เทา
		MEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	ขาว
		YEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	ขาว
		CA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	ขาว
		V8	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	ขาว

ตารางผนวกที่ ข-2 (ต่อ)

ไอโซเลข	ชนิด ราเอนโดไฟต์	อาหารเลี้ยงเชื้อ	ลักษณะโคโลนีที่ปรากฏ	สีของโคโลนี
B9	<i>Fusarium</i> sp	PDA	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		MEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	ขาว
		YEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	เทา
		CA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	เทา
		V8	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	ขาว
B10	Endophytic fungi	PDA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	เทา
		MEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	เทา
		YEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	เทา
		CA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	เทา
		V8	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	เทา
B11	Endophytic fungi	PDA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	เทา
		MEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		YEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		CA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		V8	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
B12	Endophytic fungi	PDA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	เทา
		MEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	เทา
		YEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	เทา
		CA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	เทา
		V8	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
B13	Endophytic fungi	PDA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		MEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		YEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		CA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		V8	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
B14	<i>Alternaria</i> sp.	PDA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		MEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	เทา
		YEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	เทา
		CA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		V8	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
B15	Endophytic fungi	PDA	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		MEA	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		YEA	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมขอบหยัก	เทา
		CA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	ขาว
		V8	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมขอบหยัก	ขาว
B16	<i>Mycelia sterillia</i>	PDA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		MEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	เทา
		YEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	เทา
		CA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		V8	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว

ตารางผนวกที่ ข-2 (ต่อ)

ไอโซเลท	ชนิด ราเอนโดไฟต์	อาหารเลี้ยง เชื้อ	ลักษณะโคโลนีที่ปรากฏ	สีของโคโลนี
B17	<i>Alternaria</i> sp.	PDA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	เทา
		MEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	เทา
		YEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	เทา
		CA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	เทา
		V8	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	เทา
B18	<i>Fusarium</i> sp.	PDA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		MEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		YEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		CA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		V8	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว

ตารางผนวกที่ ข-3 ลักษณะของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากใบเหียงจากอำเภอกำแพงแสน-
นาง ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ

ไอโซเลต	ชนิด ราเอนโดไฟต์	อาหารเลี้ยงเชื้อ	ลักษณะโคโลนีที่ปรากฏ	สีของโคโลนี
C4	Mycelia sterillia	PDA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	เทา
		MEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	ขาว
		YEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	เทา
		CA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	เทา
		V8	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	เทา
C6	Mycelia sterillia	PDA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	ขาว
		MEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	ขาว
		YEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	ขาว
		CA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	ขาว
		V8	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	ขาว
C7	<i>Alternaria</i> sp.	PDA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		MEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		YEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		CA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	ขาว
		V8	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	ขาว
C8	<i>Fusarium</i> sp.	PDA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		MEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		YEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		CA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		V8	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
C11	Mycelia sterillia	PDA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		MEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		YEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		CA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		V8	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
C12	<i>Alternaria</i> sp.	PDA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		MEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		YEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	เทา
		CA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		V8	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
C13	Mycelia sterillia	PDA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		MEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		YEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	เทา
		CA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		V8	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว

ตารางผนวกที่ ข-3 (ต่อ)

ไอโซเลท	ชนิด ราเอนโดไฟต์	อาหารเลี้ยง เชื้อ	ลักษณะโคโลนีที่ปรากฏ	สีของ โคโลนี
C21	<i>Fusarium</i> sp.	PDA	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		MEA	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		YEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	ขาว
		CA	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		V8	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
C23	Endophytic fungi	PDA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	เทา
		MEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	เทา
		YEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	เทา
		CA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	เทา
		V8	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	ชมพู
C26	<i>Alternaria</i> sp.	PDA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		MEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		YEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	เทา
		CA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		V8	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
C27	<i>Fusarium</i> sp.	PDA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	เทา
		MEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		YEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	เทา
		CA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	ขาว
		V8	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ชมพู
C28	<i>Alternaria</i> sp.	PDA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	เทา
		MEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	ขาว
		YEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	เทา
		CA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	ขาว
		V8	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	ขาว
C39	<i>Fusarium</i> sp.	PDA	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมขอบหยักปลายแหลม	ขาว
		MEA	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมขอบหยักปลายแหลม	ขาว
		YEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยักปลายแหลม	ขาว
		CA	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมขอบหยักปลายแหลม	ขาว
		V8	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมขอบหยักปลายแหลม	ขาว
C42	<i>Alternaria</i> sp.	PDA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		MEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		YEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	เทา
		CA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		V8	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
C45	Endophytic fungi	PDA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		MEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		YEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	เทา
		CA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		V8	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว

ตารางผนวกที่ ข-3 (ต่อ)

ไอโซเลท	ชนิด ราเอนโดไฟต์	อาหารเลี้ยง เชื้อ	ลักษณะโคโลนีที่ปรากฏ	สีของโคโลนี
C50	<i>Phomopsis</i> sp.	PDA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	เทา
		MEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	ขาว
		YEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	เทา
		CA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	ขาว
		V8	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	ขาว
C54	<i>Fusarium</i> sp.	PDA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		MEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		YEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		CA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
		V8	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว
C55	Endophytic fungi	PDA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	ขาว
		MEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	ขาว
		YEA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	เทา
		CA	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	เทา
		V8	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	เทา
C59	<i>Xylaria</i> sp.	PDA	เส้นใยปลายแหลมชี้ขึ้นเหนืออาหาร	ขาว-เทา
		MEA	เส้นใยปลายแหลมชี้ขึ้นเหนืออาหาร	ขาว-เทา
		YEA	เส้นใยปลายแหลมชี้ขึ้นเหนืออาหาร	ขาว-เทา
		CA	เส้นใยปลายแหลมชี้ขึ้นเหนืออาหาร	ขาว-เทา
		V8	เส้นใยปลายแหลมชี้ขึ้นเหนืออาหาร	ขาว-เทา

2. ลักษณะและปริมาณส่วนสกัดหยาบจากราเอนโดไฟต์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MEB

ตารางผนวกที่ ข-4 ลักษณะและปริมาณส่วนสกัดหยาบจากราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จาก
ใบเหียงจากอำเภอเสิงสาง

ไอโซเลท	ส่วนสกัดหยาบเส้นใยรา		ส่วนสกัดหยาบน้ำเพาะเลี้ยงเลี้ยงรา	
	ลักษณะ	น้ำหนัก (mg)	ลักษณะ	น้ำหนัก (mg)
A1	ของเหลวหนืด สีน้ำตาลเข้ม	0.108	ของเหลวหนืด สีส้ม	0.217
A3	ของเหลวหนืด สีส้ม	0.412	ของเหลวหนืด เหลือง	1.739
A4	ของเหลวหนืด สีดำ	0.009	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม	1.625
A7	ของเหลวหนืดสี น้ำตาลเข้ม	0.275	ของเหลวหนืดสีส้ม	0.308
A8	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม	0.093	ของเหลวหนืดสีส้ม	0.290
A9	ของเหลวหนืดสีดำ	0.108	ของเหลวหนืดสีเหลือง	0.347
A10	ของเหลวหนืดสีส้ม	0.159	ของเหลวหนืดสีเหลือง	0.425
A11	ของเหลวหนืดสีดำ	0.207	ของเหลวหนืดสีเหลือง	0.216
A12	ของเหลวหนืดสีส้ม		ของเหลวหนืดสีเหลือง	1.545
A13	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม	0.041	ของเหลวหนืดสีส้ม	0.293
A14	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม	0.158	ของเหลวหนืดสีส้ม	0.060
A15	ของเหลวหนืดสีส้ม	0.279	ของเหลวหนืดสีเหลือง	0.374
A18	ของเหลวหนืดสีดำ	0.211	ของเหลวหนืดสีเหลือง	0.959
A19	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม	0.430	ของเหลวหนืดสีส้ม	0.385
A20	ของเหลวหนืดสีส้ม	0.204	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม	0.117
A21	ของเหลวหนืดสีส้ม	0.183	ของเหลวหนืดสีเหลือง	1.170
A22	ของเหลวหนืดสีส้ม	0.168	ของเหลวหนืดสีเหลือง	0.374
A23	ของเหลวหนืดสีดำ	0.337	ของเหลวหนืดสีดำ	0.209
A24	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม	0.156	ของเหลวหนืดสีส้ม	1.495
A26	ของเหลวหนืดสีส้ม	0.218	ของเหลวหนืดสีเหลือง	0.257
A31	ของเหลวหนืดสีส้ม	0.260	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม	0.245
A32	ของเหลวหนืดสีดำ	0.283	ของเหลวหนืดสีดำ	0.103
A33	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม	0.177	ของเหลวหนืดสีส้ม	0.334
A34	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม	0.138	ของเหลวหนืดสีส้ม	0.224
A35	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม	0.192	ของเหลวหนืดสีส้ม	0.310
A36	ของเหลวหนืดสีส้ม	0.102	ของเหลวหนืดสีเหลือง	0.196
A38	ของเหลวหนืดสีดำ	0.095	ของเหลวหนืดสีดำ	0.145
A39	ของเหลวหนืดสีส้ม	0.300	ของเหลวหนืดสีเหลือง	0.174
A40	ของเหลวหนืดสีดำ	0.178	ของเหลวหนืดสีดำ	0.419
A41	ของเหลวหนืดสีส้ม	0.208	ของเหลวหนืดสีเหลือง	1.496
A42	ของเหลวหนืดสีส้ม	0.040	ของเหลวหนืดสีส้ม	0.280
A45	ของเหลวหนืดสีดำ	0.201	ของเหลวหนืดสีดำ	0.211

ตารางผนวกที่ ข-4 (ต่อ)

ไอโซเลท	ส่วนสกัดหยาบเส้นใยรา		ส่วนสกัดหยาบน้ำเพาะเลี้ยงเลี้ยงรา	
	ลักษณะ	น้ำหนัก (mg)	ลักษณะ	น้ำหนัก (mg)
A46	ของเหลวหนืดสีดำ	0.203	ของเหลวหนืดสีดำ	0.223
A55	ของเหลวหนืดสีส้ม	0.316	ของเหลวหนืดสีส้ม	0.242
A56	ของเหลวหนืดสีส้ม	0.208	ของเหลวหนืดสีส้ม	0.136
A59	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม	0.146	ของเหลวหนืดสีส้ม	0.270
A61	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม	0.177	ของเหลวหนืดสีส้ม	0.195
A62	ของเหลวหนืดสีส้ม	0.035	ของเหลวหนืดสีส้ม	0.395
A63	ของเหลวหนืดสีดำ	0.254	ของเหลวหนืดสีดำ	0.394
A64	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม	0.244	ของเหลวหนืดสีส้ม	0.103
A67	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม	0.255	ของเหลวหนืดสีส้ม	0.156
A72	ของเหลวหนืดสีส้ม	0.337	ของเหลวหนืดสีส้ม	0.346

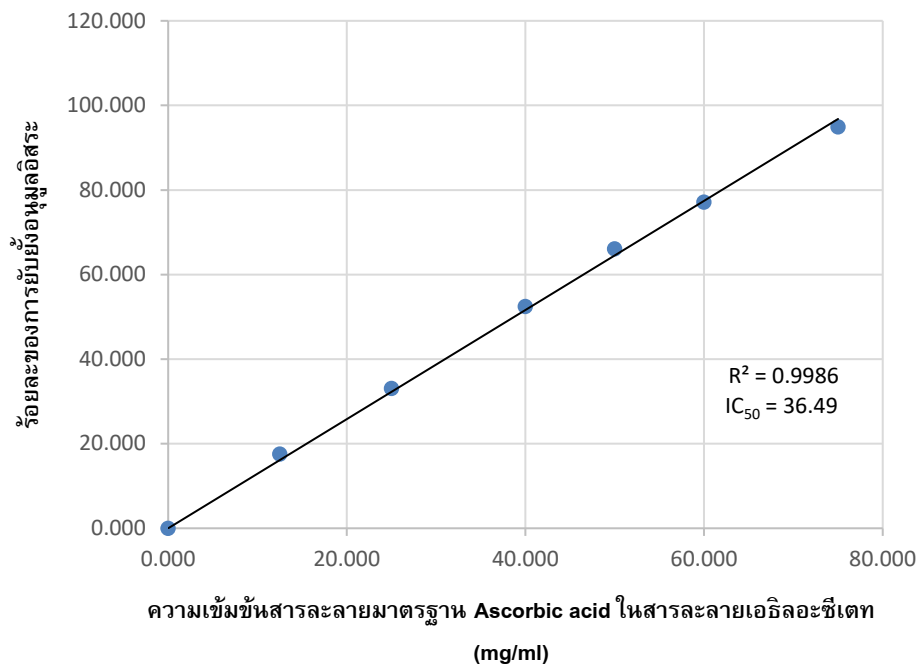
ตารางผนวกที่ ข-5 ลักษณะและปริมาณส่วนสกัดหยาบจากราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จาก
ใบเหียงจากอำเภอเมือง

ไอโซเลท	ส่วนสกัดหยาบเส้นใยรา		ส่วนสกัดหยาบน้ำเพาะเลี้ยงเลี้ยงรา	
	ลักษณะ	น้ำหนัก (mg)	ลักษณะ	น้ำหนัก (mg)
B1	ของเหลวหนืดสีดำ	0.021	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม	0.168
B2	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม	0.310	ของเหลวหนืดสีส้ม	0.149
B3	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม	0.147	ของเหลวหนืดสีส้ม	0.271
B4	ของเหลวหนืดสีดำ	0.081	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม	0.339
B5	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม	0.144	ของเหลวหนืดสีส้ม	0.320
B6	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม	0.149	ของเหลวหนืดสีส้ม	0.096
B7	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม	0.143	ของเหลวหนืดสีส้ม	0.238
B8	ของเหลวหนืดสีดำ	0.122	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม	0.251
B9	ของเหลวหนืดสีส้ม	0.043	ของเหลวหนืดสีเหลือง	0.164
B10	ของเหลวหนืดสีดำ	0.924	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม	0.221
B11	ของเหลวหนืดสีดำ	0.206	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม	0.361
B12	ของเหลวหนืดสีส้ม	0.216	ของเหลวหนืดสีเหลือง	0.430
B13	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม	0.254	ของเหลวหนืดสีส้ม	0.232
B14	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม	0.125	ของเหลวหนืดสีส้ม	0.357
B15	ของเหลวหนืดสีส้ม	0.237	ของเหลวหนืดสีเหลือง	0.422
B16	ของเหลวหนืดสีดำ	0.291	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม	0.299
B17	ของเหลวหนืดสีดำ	0.186	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม	0.262
B18	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม	0.006	ของเหลวหนืดสีส้ม	0.333

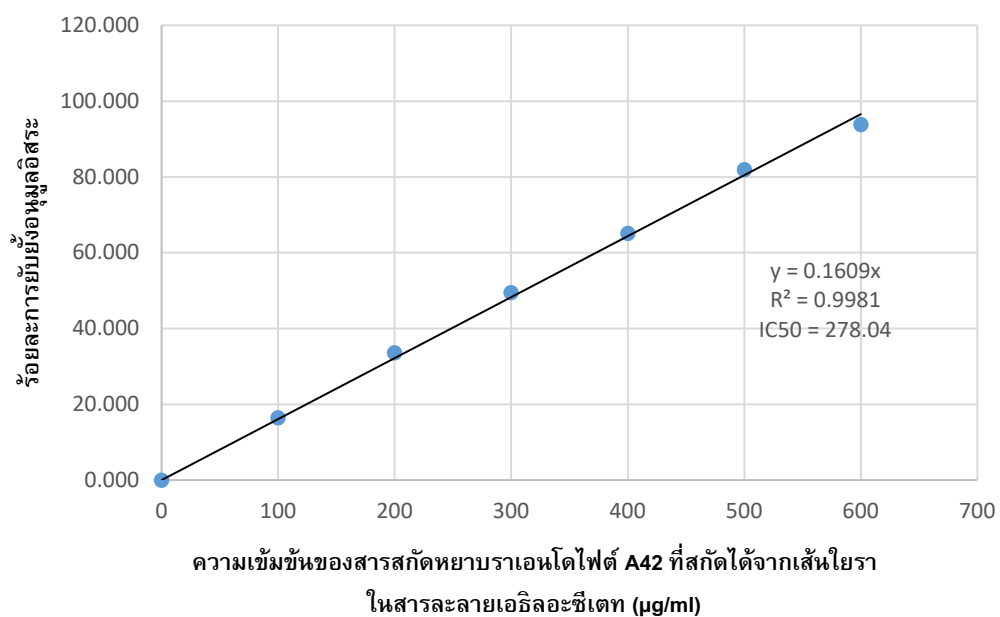
ตารางผนวกที่ ข-6 ลักษณะและปริมาณส่วนสกัดหยาบจากราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จาก
ใบเหียงจากอำเภอแก้งสนามนาง

ไอโซเลท	ส่วนสกัดหยาบเส้นใยรา		ส่วนสกัดหยาบน้ำเพาะเลี้ยงเลี้ยงรา	
	ลักษณะ	น้ำหนัก (mg)	ลักษณะ	น้ำหนัก (mg)
C4	ของเหลวหนืดสีดำ	0.186	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม	0.254
C6	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม	0.016	ของเหลวหนืดสีส้ม	0.122
C7	ของเหลวหนืดสีส้ม	0.274	ของเหลวหนืดสีเหลือง	0.125
C8	ของเหลวหนืดสีดำ	0.166	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม	0.212
C11	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม	0.165	ของเหลวหนืดสีส้ม	0.137
C12	ของเหลวหนืดสีส้ม	0.102	ของเหลวหนืดสีเหลือง	0.215
C13	ของเหลวหนืดสีดำ	0.082	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม	0.215
C21	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม	0.401	ของเหลวหนืดสีส้ม	0.452
C23	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม	0.030	ของเหลวหนืดสีส้ม	0.331
C26	ของเหลวหนืดสีส้ม	0.379	ของเหลวหนืดสีเหลือง	0.271
C27	ของเหลวหนืดสีดำ	0.025	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม	0.297
C28	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม	0.060	ของเหลวหนืดสีส้ม	0.245
C39	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม	0.008	ของเหลวหนืดสีส้ม	0.298
C42	ของเหลวหนืดสีส้ม	0.068	ของเหลวหนืดสีเหลือง	0.136
C45	ของเหลวหนืดสีดำ	0.054	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม	0.217
C50	ของเหลวหนืดสีส้ม	0.344	ของเหลวหนืดสีเหลือง	0.274
C54	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม	0.179	ของเหลวหนืดสีส้ม	0.367
C55	ของเหลวหนืดสีส้ม	0.077	ของเหลวหนืดสีเหลือง	0.123
C59	ของเหลวหนืดสีดำ	0.080	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม	0.222

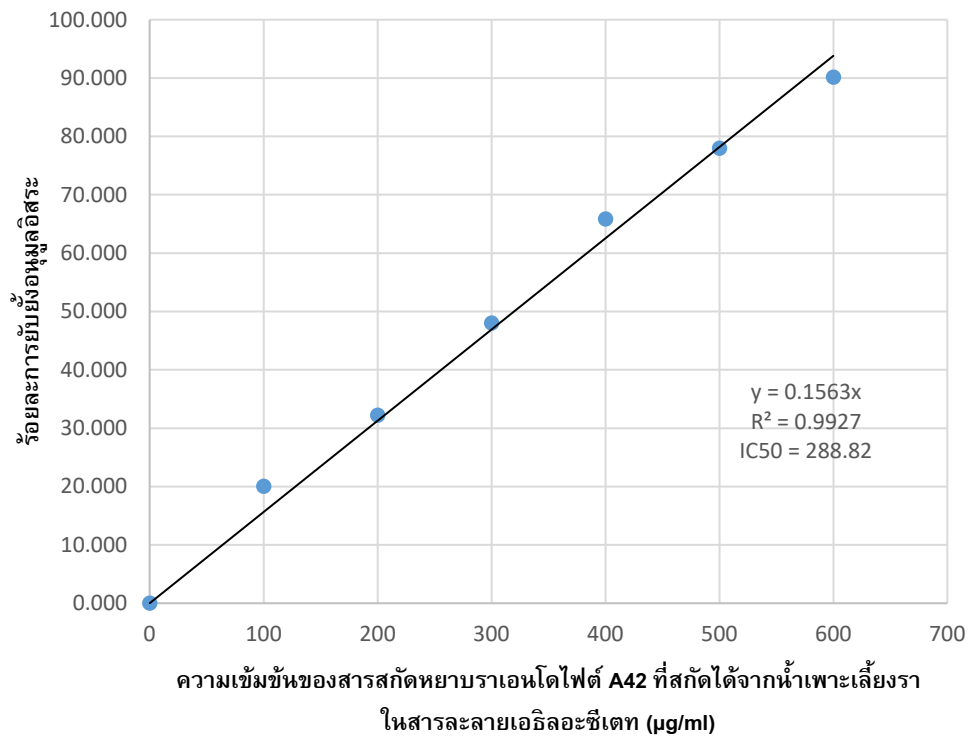
ภาคผนวก คฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟต์



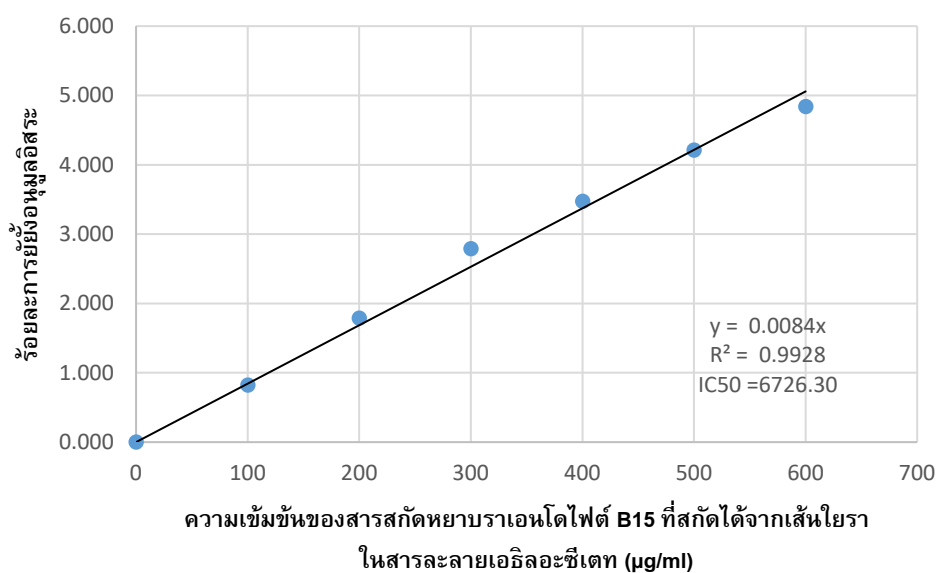
ภาพผนวกที่ ค-1 ค่าร้อยละของการยับยั้งอนุมูลอิสระ (% Inhibition) กับความเข้มข้นสารละลายมาตรฐาน Ascorbic acid ในสารละลายเอธิลอะซีเตท



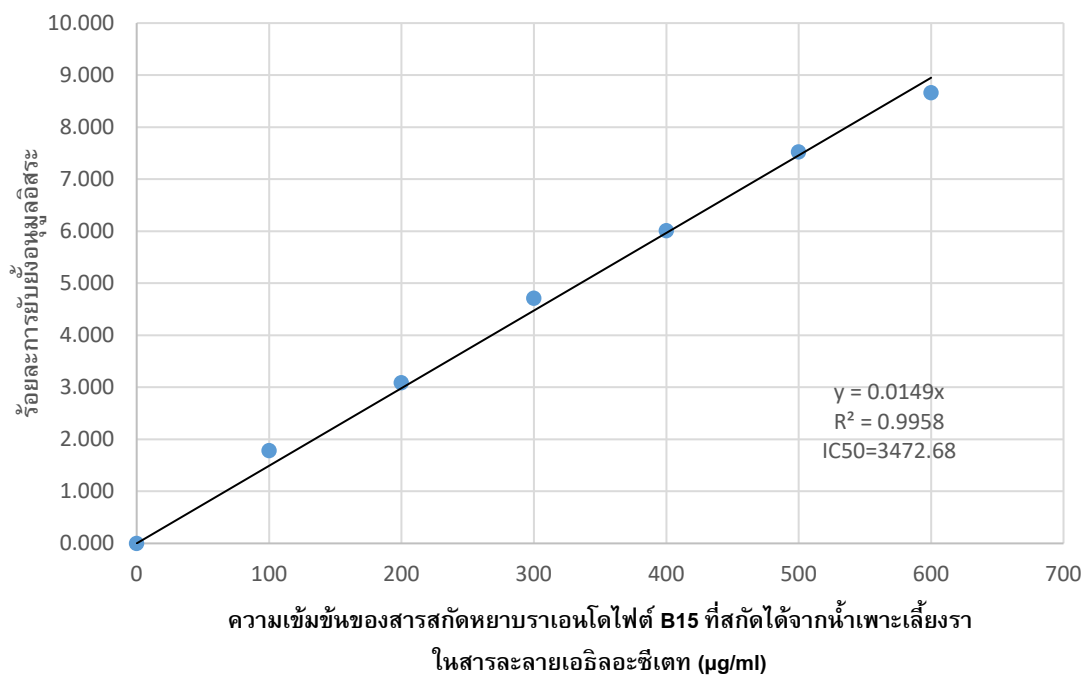
ภาพผนวกที่ ค-2 ค่าร้อยละของการยับยั้งอนุมูลอิสระ (% Inhibition) กับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟต์ A42



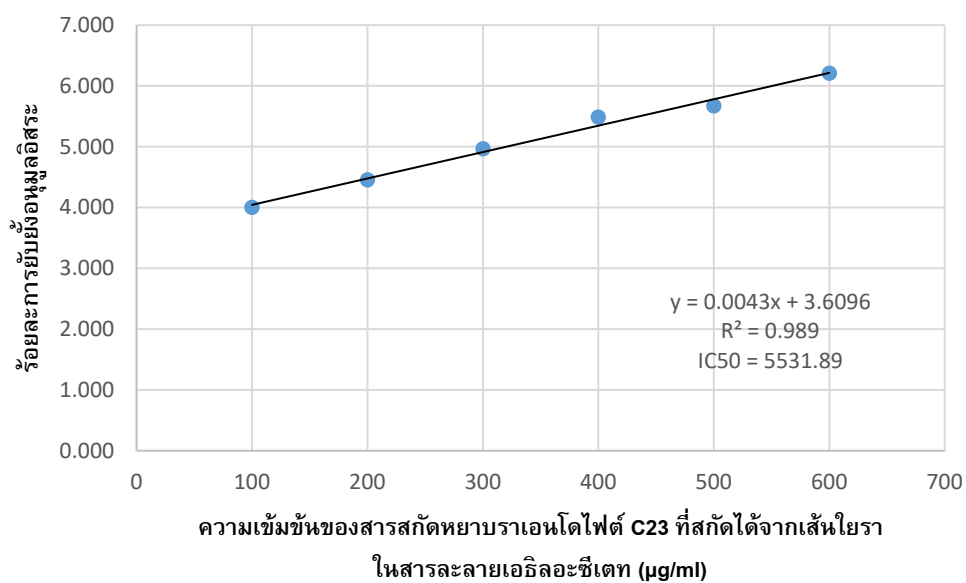
ภาพผนวกที่ ค-3 ค่าร้อยละของการยับยั้งอะมีบาไลโอสร่า (% Inhibition) กับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากน้ำเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟต์ A42



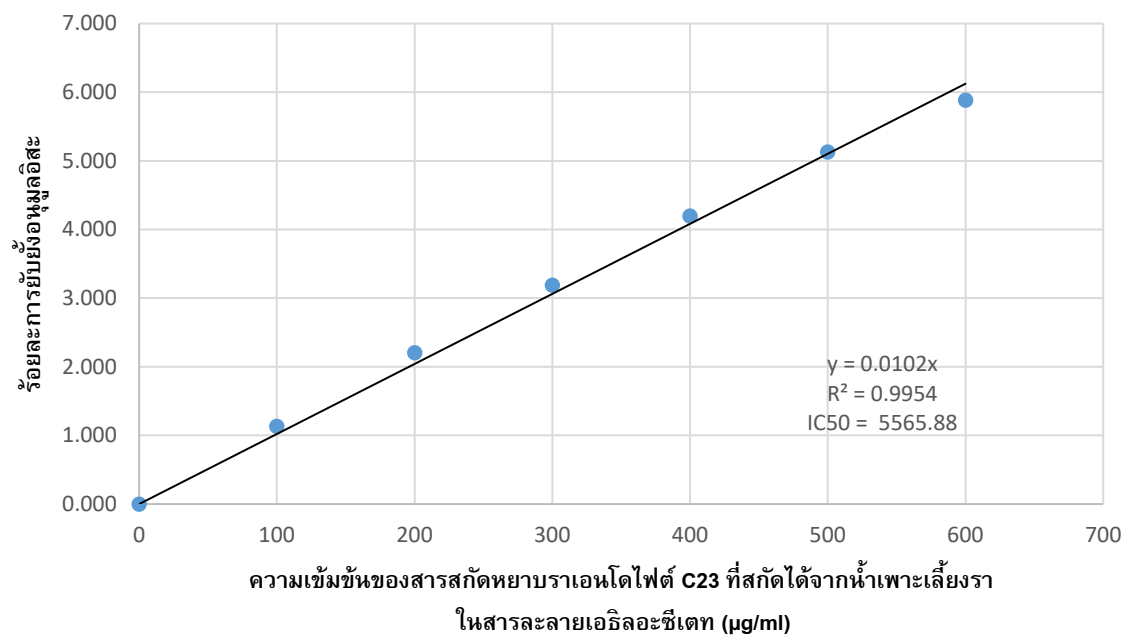
ภาพผนวกที่ ค-4 ค่าร้อยละของการยับยั้งอะมีบาไลโอสร่า (% Inhibition) กับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากเส้นใยราเอนโดไฟต์ B15



ภาพผนวกที่ ค-5 ค่าร้อยละของการยับยั้งอนุมูลิสร (% Inhibition) กับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากน้ำพะเลียงราเอนโดไฟต์ B15



ภาพผนวกที่ ค-6 ค่าร้อยละของการยับยั้งอนุมูลิสร (% Inhibition) กับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากเส้นใยราเอนโดไฟต์ C23

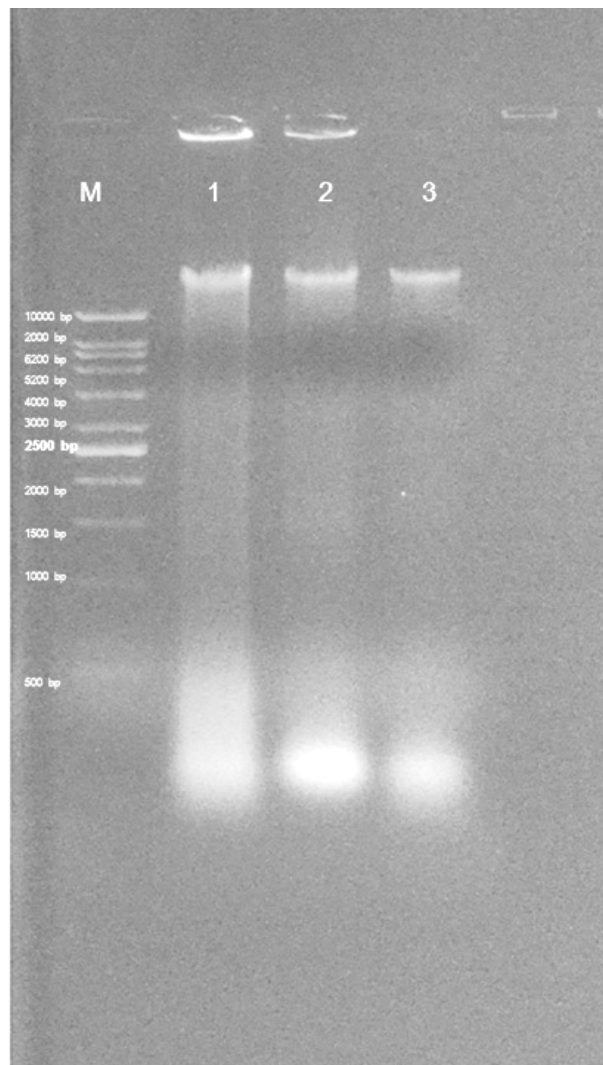


ภาพผนวกที่ ค-7 คำนวณร้อยละการยับยั้งอนุโมลีสระ (% Inhibition) กับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากน้ำเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟต์ C23

ภาคผนวก ง การตรวจสอบปริมาณของดีเอ็นเอ และ PCR product

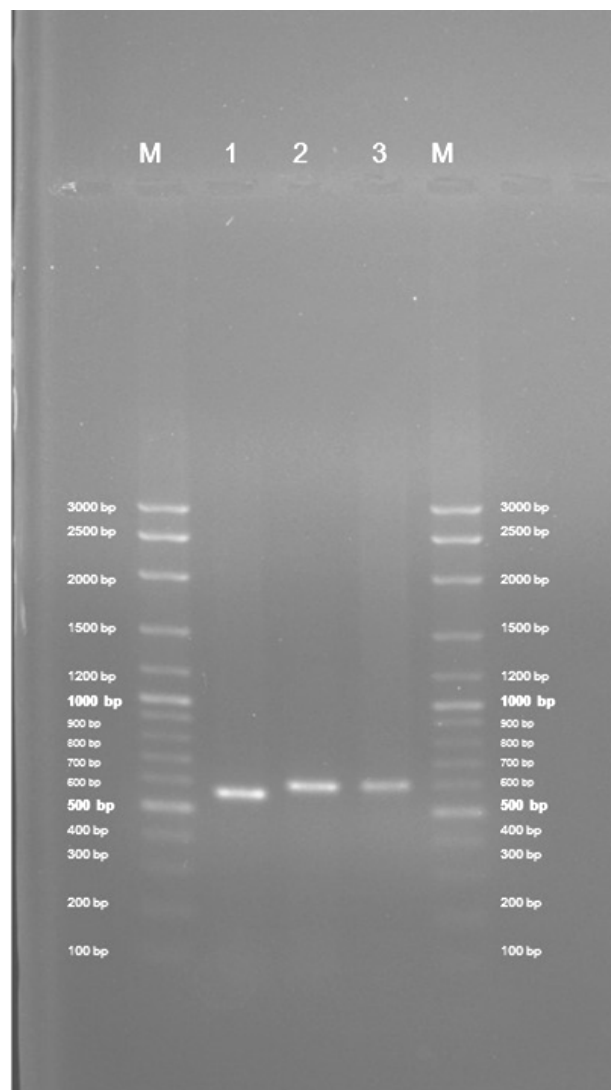
ตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอ และ PCR product จากราเอนโดไฟต์ด้วย 0.8% Agarose gel electrophoresis ในสารละลาย TBE buffer

1. ดีเอ็นเอจากราเอนโดไฟต์



ภาพผนวกที่ ง-1 คุณภาพของดีเอ็นเอจากราเอนโดไฟต์ M = Ladder ขนาด 1 kb, 1 = ราเอนโดไฟต์ไอโซเลท A42, 2 = ราเอนโดไฟต์ไอโซเลท B15 และ 3 = ราเอนโดไฟต์ไอโซเลท C23

2. PCR product ของราเอนโดไฟต์



ภาพผนวกที่ ง-2 PCR product ของราเอนโดไฟต์ M = Ladder ขนาด 1 kb,
 1 = ราเอนโดไฟต์ไอโซเลท A42, 2 = ราเอนโดไฟต์ไอโซเลท B15 และ
 3 = ราเอนโดไฟต์ไอโซเลท C23