รหัสโครงการ SUT1-104-49-12-25

รายงานการวิจัย

เชื้อราที่อยู่ในพืชป่าและความเป็นพิษของสารจากเชื้อราและพืชต่อเซลล์มะเร็ง

(Endophytic Fungi of Wild Plants and Cytotoxicity of the Fungus and Plant Metabolites to Cancer Cells)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT1-104-49-12-25

รายงานการวิจัย

เชื้อราที่อยู่ในพืชป่าและความเป็นพิษของสารจากเชื้อราและพืชต่อเซลล์มะเร็ง

(Endophytic Fungi of Wild Plants and Cytotoxicity of the Fungus and Plant Metabolites to Cancer Cells)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรีลักษณ์ รอดทอง

สาขาวิชาจุลชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

ดร.สุรางค์ เชียรหิรัญ

สำนักวิจัยการจัดการป่าไม้และผลิตผลป่าไม้

กรมป่าไม้

ดร.ผ่องพรรณ ศิริพงษ์

งานวิจัยสมุนไพร กลุ่มงานวิจัย สถาบันมะเร็งแห่งชาติ

กรมการแพทย์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2549

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

กันยายน พ.ศ. 2558

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัย “เชื้อราที่อยู่ในพืชป่าและความเป็นพิษของสารจากเชื้อราและพืชต่อเซลล์มะเร็ง” ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี สำนักวิจัยการจัดการป่าไม้และผลิตผลป่าไม้ กรมป่าไม้ และงานวิจัยสมุนไพร สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรมการแพทย์ ที่ให้การสนับสนุนด้านเครื่องมือและห้องปฏิบัติการในการดำเนินการวิจัย ขอขอบคุณ แม่ชีราตรี ตุรงควัธน์ และคณะ สำนักปฏิบัติธรรมเขาภูหลวง อำเภอปักธงชัย จังหวัดนครราชสีมา ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการสำรวจและเก็บตัวอย่างพืชป่าที่เจริญในพื้นที่ธรรมชาติบริเวณเขาภูหลวง ศาสตราจารย์ ดร.ประนอม จันทรโณทัย ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้ความอนุเคราะห์ระบุชนิดของพืชป่าที่ศึกษา โครงการวิจัยนี้มีผู้ช่วยนักวิจัย และนักศึกษาช่วยงานวิจัย ที่มีส่วนช่วยให้การดำเนินงานสำเร็จลุล่วงด้วยดี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อ

เชื้อราเอนโดไฟท์ที่อยู่ในพืชเป็นกลุ่มเชื้อราที่มีชีวิตอยู่ในพืชปกติแบบได้ประโยชน์ซึ่งกันและกัน โดยที่เชื้อราบางชนิดสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นและสารต้านเซลล์มะเร็งทำนองเดียวกับพืชหลายชนิด การศึกษานี้ได้คัดแยกเชื้อราเอนโดไฟท์จากใบ ผล ลำต้น และรากของพืชป่า 3 ชนิด ที่ไม่เป็นโรคหรือแมลงทำลายและพบเจริญในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย คือ ว่านขันหมาก (*Aglaonema simplex* (Blume) Blume ชื่อพ้อง *Aglaonema tenuipes* Engl.) ที่มีการบริโภคผลสุกกันอย่างกว้างขวางด้วยความเชื่อว่ารักษาโรคได้ครอบจักรวาล เครือสี่เหลี่ยมเป็นไม้เถาที่ยังไม่สามารถระบุชนิดด้วยข้อจำกัดของลักษณะทางสัณฐานที่พบเพียงต้นและใบในช่วงเวลาที่ศึกษา และขันทองพยาบาท (*Suregada multiflora* (A.Juss.) Baill.) ได้จำนวนเชื้อรา 103, 22 และ 58 ไอโซเลท ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ชนิดของเชื้อราโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อและลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีนของไรโบโซม พบว่าเอนโดไฟท์จากว่านขันหมากเป็นราในสกุล *Colletotrichum*, *Guignardia*, *Phomopsis* และกลุ่ม Ascomycetes ในสกุล *Daldinia* และ *Xylaria* เอนโดไฟท์จากเครือสี่เหลี่ยมเป็นราในสกุล *Glomerella* เป็นหลัก และพบ Ascomycetes ในสกุล *Rosellinia* และ *Xylaria* ส่วนราเอนโดไฟท์ที่แยกจากใบและเปลือกของต้นขันทองพยาบาทยังมิได้ระบุชนิดด้วยเวลาและงบประมาณที่จำกัด จากนั้นได้ทดสอบความเป็นพิษของสารจากการเลี้ยงราในอาหารเหลวและสารสกัดจากพืชต่อเซลล์มะเร็งของคนที่เพาะเลี้ยง โดยใช้เซลล์มะเร็งเยื่อบุช่องปาก (KB) ในการคัดกรองขั้นต้น จากนั้นจึงเลือกสารเพื่อทดสอบกับเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa) มะเร็งเต้านม (MCF-7) และมะเร็งตับ (Hep-G2) รวมถึงเซลล์ปกติ (Vero) สารสกัดหยาบที่ผลิตจากเชื้อรา *Colletotrichum* sp. และ *Xylaria* sp. (แยกจากใบและรากของว่านขันหมาก) ในอาหารเหลวที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อ มีความเป็นพิษที่สังเกตได้ต่อเซลล์มะเร็งชนิด KB (ค่า IC_{50} เป็นความเข้มข้นของสารที่ใช้ทดสอบที่สามารถฆ่าเซลล์มะเร็งได้ครึ่งหนึ่งเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม เท่ากับ 54 และ 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) และสารสกัดด้วยเอทานอลจากเส้นใยของรา *Colletotrichum* sp. และ *Xylaria* จำนวน 3 species มีฤทธิ์อย่างอ่อนต่อ KB (IC_{50} ในช่วง 45-80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เมื่อทดสอบความเป็นพิษของสารต่อเซลล์มะเร็งชนิดอื่น พบว่าสารในอาหารที่ผ่านการเลี้ยง *Colletotricum* sp. แยกได้จากใบของว่านขันหมาก มีฤทธิ์อย่างอ่อนต่อ HeLa, Hep-G2 และ Vero (IC_{50} เท่ากับ 50, 51 และ 45 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) แต่มีผลดีกับ MCF-7 (IC_{50} เท่ากับ 20.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) สารสกัดหยาบจากอาหารเลี้ยงเชื้อราจากเครือสี่เหลี่ยม มีเพียงรา *Glomerella* sp. ที่แยกจากใบ มีผลต่อ KB ที่สังเกตได้ (IC_{50} เท่ากับ 75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) สารสกัดหยาบจากอาหารเลี้ยงเชื้อและเส้นใยของราที่แยกจากพืชขันทองพยาบาททั้ง 58 ตัวอย่าง ไม่มีความเป็นพิษต่อ KB (IC_{50} >100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) สำหรับสารสกัดหยาบจากพืชทั้ง 3 ชนิด เมื่อใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดเฮกเซน คลอโรฟอร์ม และเมทานอล ที่ระเหยตัวทำละลายออก และทดสอบกับเซลล์มะเร็ง KB และ HeLa พบว่าเฉพาะสารสกัดหยาบจากรากและผลของว่านขันหมากที่สกัดด้วยตัวทำละลายทั้งสามชนิด มีฤทธิ์ต้าน KB และ HeLa ได้ดีในระดับที่น่าสนใจ

(ค่า IC_{50} ในช่วง 10-15 และ 23-34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และเฉพาะสารสกัดจากรากและผลด้วยเฮกเซนเป็นพิษต่อเซลล์ปกติที่ค่า IC_{50} 3.11 และ 7.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สารสกัดหยาบจากต้น ก้านใบ และใบของเครือสี่เหลี่ยม ด้วยคลอโรฟอร์มมีฤทธิ์ต้าน KB ที่ค่า IC_{50} 65 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสารสกัดหยาบจากใบและเปลือกของลำต้นขันทองพยาบาทไม่มีความเป็นพิษต่อ KB (IC_{50} >100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) สารสกัดที่ได้จากเชื้อราและพืชจากผลการศึกษา แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งและที่เป็นพิษและไม่เป็นพิษกับเซลล์ปกติ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารสกัดหยาบจากว่านขันหมากและเชื้อราจากพืชชนิดนี้ออกฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงได้ผลดีในระดับที่น่าสนใจ และแสดงฤทธิ์เฉพาะเจาะจงในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งแต่ละอวัยวะที่คัดเลือกมาทดสอบ จึงควรมีการศึกษาในเชิงลึกต่อไป

Endophytic fungi can symbiotically live within plant tissues. Some endophytic fungus species have been identified as sources of antimicrobial and anticancer compounds similar to some plant species. In this study, a total of 183 endophytic fungus strains were isolated from healthy leaves, mature fruits, stems and roots of 3 species of wild plants found in North-eastern Thailand, and characterized by their morphology as well as on the basis of ribosomal RNA gene sequence acquisition and analyses. These wild plant species were Wan-khan-mark (*Aglaonema simplex* (Blume) Blume, a synonym of *Aglaonema tenuipes* Engl.) in which its mature fruits have been trusted by the traditional herbal medicine culture in some specific areas as being a cure-all variety, Kreua-see-liam which was a climbing plant and waiting for identification according to its phenotype limitation, and Khan-thong-phayabat (*Suregada multiflora* (A.Juss.) Baill.). The endophytic fungi, 103 isolates from Wan-khan-mark, were identified as belonging to genera *Colletotrichum*, *Guignardia*, *Phomopsis*, and the ascomycetous fungi in genera *Daldinia* and *Xylaria*. Twenty two isolates from Kreua-see-liam mainly belonged to the genus *Glomerella* and the ascomycetous fungi in genera *Rosellinia* and *Xylaria*. And 58 isolates from Khan-thong-phayabat were not identified because of the research duration and budget limitations. Both fungal metabolite extracts from cultured broth and crude extracts from the wild plants were then tested for their toxicity to *in vitro* human cancer cells. The human epidermoid carcinoma (KB) was used for primary screening, then the selected extracts were tested against human cervical carcinoma, (HeLa), human breast adenocarcinoma (MCF-7), and human hepatocellular carcinoma (Hep-G2) cell lines, as well as a normal cell, African green monkey kidney (Vero). The cultured medium extracts of *Colletotrichum* sp. and *Xylaria* sp. isolated from leaf and root of Wan-khan-mark, respectively, showed inhibiting effects on cell lines of KB (IC_{50} values of 54 and 60 µg/ml, repectively), and the ethanol extracts of mycelia from *Colletotrichum* sp. and 3 species of *Xylaria* exhibited weak

activity on KB (IC_{50} values of 45-80 µg/ml). Then, the cultured medium extract of an isolate of *Colletotrichum* sp. was selected for further testing. It was found to perform low cytotoxicity on HeLa, Hep-G2, and Vero (IC_{50} values of 50, 51 and 45 µg/ml, repectively), but showed interesting cytotoxic activity against human breast adenocarcinoma cell line, MCF-7 (IC_{50} value of 20.5 µg/ml). The culture medium of *Glomerella* sp. isolated from Kreua-see-liam leaf contained compounds exhibited weak activity on KB (IC_{50} value of 75 µg/ml). None of extracts from fungal cultures isolated from Khan-thong-phayabat showed inhibiting effect on KB (IC_{50} >100 µg/ml). Crude extracts prepared from the 3 healthy plants using 3 organic solvents, hexane, chloroform, and methanol exhibited a variety of inhibitory effects. All extracts from roots and fruits of Wan-khan-mark showed interesting inhibiting effects on KB and HeLa (IC_{50} values of 10-15 and 23-34 µg/ml, respectively). And only hexane extracts from roots and fruits performed high toxicity to Vero at IC_{50} values of 3.11 and 7.25 µg/ml, respectively. Crude chloroform extracts from stems, petioles, and leaves of Kreua-see-liam showed low cytotoxic effects on KB at IC_{50} of 65 µg/ml. No cytotoxic activity was observed from all crude extracts from leaves and barks of Khan-thong-phayabat on KB (IC_{50} >100 µg/ml). In conclusion, crude extracts from the studied endophytic fungi and wild plants exhibited both non-toxicity and interesting inhibiting effects on both cancer and normal cell lines, particularly, extracts for Wan-khan-mark and its endophytes. The cytotoxic compounds obtained from these endophytes and wild plants should be further investigated for their application evaluation. Also, further studies on the selected endophytes may lead to the isolation of novel natural products

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ..... ก
บทคัดย่อภาษาไทย..... ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... ค
สารบัญ..... จ
บทที่ 1 บทนำ
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย..... 1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย..... 3
1.4 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย..... 3
1.5 ทฤษฎีและกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย..... 4
1.6 ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 5
1.6.1 เชื้อราที่อยู่ในพืชป่า (Endophytic fungi หรือ Endophytes)..... 5
1.6.2 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อราบางชนิดที่อยู่ในพืช..... 7
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย
2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัย..... 11
2.1.1 ครุภัณฑ์..... 11
2.1.2 วัสดุ..... 12
2.2 วิธีดำเนินการวิจัย..... 13
2.2.1 การวิจัยในส่วนของพืชป่า..... 13
2.2.1.1 การรวบรวมตัวอย่างพืชป่าเป้าหมาย..... 13
2.2.1.2 การวิเคราะห์ชนิดของพืชในเบื้องต้นตามลักษณะทางสัณฐาน..... 13
2.2.1.3 การทดลองสกัดสารจากพืชเพื่อทดสอบฤทธิ์ของสารต่อเซลล์มะเร็ง..... 14
2.2.2 การวิจัยในส่วนของเชื้อราที่อยู่ในพืชป่า..... 15
2.2.2.1 การแยก เพาะเลี้ยง และจัดจำแนกชนิดของเชื้อรา..... 15
2.2.2.2 การจัดเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เชื้อรา..... 18
2.2.2.3 การทดลองผลิตสารออกฤทธิ์จากเชื้อรา..... 19
2.2.3 การศึกษาความเป็นพิษของสารที่ผลิตจากเชื้อราและจากพืชต่อเซลล์มะเร็ง..... 19
2.2.4 สรุปผลการวิจัย..... 20

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 3 ผลและอภิปรายผลการวิจัย

3.1 การวิจัยในส่วนของพืชป่า..... 21

3.1.1 การรวบรวมตัวอย่างพืชป่าเป้าหมาย..... 21

3.1.2 การวิเคราะห์ชนิดของพืชในเบื้องต้นตามลักษณะทางสัณฐาน..... 21

3.1.3 การทดลองสกัดสารจากพืชเพื่อทดสอบฤทธิ์ของสารต่อเซลล์มะเร็ง..... 33

3.2 การวิจัยในส่วนของเชื้อราที่อยู่ในพืชป่า..... 35

3.2.1 การแยก เพาะเลี้ยง และจัดจำแนกชนิดของเชื้อรา..... 35

3.2.2 การจัดเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เชื้อรา..... 51

3.2.3 การทดลองผลิตสารออกฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง..... 51

3.2.4 การศึกษาความเป็นพิษของสารที่ผลิตจากเชื้อราและจากพืชต่อเซลล์มะเร็ง..... 57

3.2.4.1 ความเป็นพิษของสารที่ผลิตจากเชื้อราต่อเซลล์มะเร็ง..... 58

3.2.4.2 ความเป็นพิษของสารจากพืชต่อเซลล์มะเร็ง..... 66

บทที่ 4 สรุปและข้อเสนอแนะ

4.1 สรุปผลการวิจัย..... 71

4.2 ข้อเสนอแนะ..... 77

บรรณานุกรม..... 78

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก สารละลายและน้ำยาเคมี..... 83

ภาคผนวก ข อาหารเลี้ยงจุลินทรีย์..... 84

ภาคผนวก ค รูปผนวก..... 86

ประวัติผู้วิจัย.....119

เอกสารแนบ.....120

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PCR Primers ที่ใช้เพิ่มปริมาณ 18S rRNA gene ของเชื้อรา..... 17
ตารางที่ 3.1 ตัวอย่างว่านขันหมากที่แยกเก็บตามส่วนของพืชเพื่อศึกษาจำนวน 42 ตัวอย่าง..... 23
ตารางที่ 3.2 ปริมาณของสารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดสารจากใบ ต้น ราก และผลของว่านขันหมากที่มีขนาดลำต้นใหญ่และเล็ก..... 34
ตารางที่ 3.3 ปริมาณของสารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดจากเถา (ต้น) ก้านใบ และใบของเครือสี่เหลี่ยม..... 34
ตารางที่ 3.4 ปริมาณของสารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดใบและเปลือกของขันทองพยาบาท..... 35
ตารางที่ 3.5 รหัสเชื้อรา Endophytes ที่แยกจากส่วนใบ ก้านใบ ผล ต้น โคนต้น และรากของว่านขันหมากที่มีขนาดต้นเล็กและขนาดต้นใหญ่..... 35
ตารางที่ 3.6 เชื้อรา Endophytes แยกจากว่านขันหมากที่มีขนาดต้นเล็ก 3 ตัวอย่าง และขนาดต้นใหญ่ 2 ตัวอย่าง..... 36
ตารางที่ 3.7 ชนิดของเชื้อราที่แยกจากใบ ก้าน ลำต้น และรากของว่านขันหมากที่วิเคราะห์ด้วยลักษณะทางสัณฐานของเชื้อราที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อและลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rRNA gene..... 47
ตารางที่ 3.8 ชนิดของเชื้อรา Endophytes ที่แยกได้จากใบ ก้านใบ ลำต้น โคนต้น และรากของว่านขันหมากต้นเล็กและต้นใหญ่..... 48
ตารางที่ 3.9 ชนิดของเชื้อราที่แยกจากใบและเถา (ลำต้น) ของเครือสี่เหลี่ยมที่วิเคราะห์ด้วยลักษณะทางสัณฐานของเชื้อราที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อและลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rRNA gene..... 50
ตารางที่ 3.10 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากอาหารเลี้ยงเชื้อรา Endophytes จำนวน 49 ไอโซเลท ที่แยกจากว่านขันหมาก ต่อเซลล์มะเร็งเยื่อบุช่องปาก (KB, Human epidermoid carcinoma cell line)…..... 58
ตารางที่ 3.11 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเชื้อรา Endophytes จำนวน 17 ไอโซเลท ที่แยกจากว่านขันหมากต่อเซลล์มะเร็งเยื่อบุช่องปาก (KB)..... 61
ตารางที่ 3.12 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากอาหารเลี้ยงเชื้อรา Endophytes จำนวน 8 ไอโซเลท ที่แยกได้จากว่านขันหมาก ต่อเซลล์มะเร็งของคน 4 ชนิด และเซลล์ปกติที่ได้จากไตของลิง..... 62

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

ตารางที่ 3.13 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผลิตจากเชื้อรา Endophytes ที่แยกจากเครือสี่เหลี่ยมจำนวน 21 ไอโซเลท ต่อเซลล์มะเร็งเยื่อบุช่องปาก (KB)..... 63
ตารางที่ 3.14 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากอาหารเลี้ยงเชื้อและเส้นใยของเชื้อรา Endophytes จากขันทองพยาบาทจำนวน 58 ไอโซเลท ต่อเซลล์มะเร็งเยื่อบุช่องปาก (KB) 64
ตารางที่ 3.15 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากพืชป่าว่านขันหมากด้วย Hexane, Chloroform และ Methanol ต่อเซลล์มะเร็ง 2 ชนิด และเซลล์ปกติ..... 67
ตารางที่ 3.16 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากเถา (ลำต้น) ก้านใบ และใบของเครือสี่เหลี่ยม ต่อเซลล์มะเร็งเยื่อบุช่องปาก (KB)..... 68
ตารางที่ 3.17 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากใบและเปลือกของต้นขันทองพยาบาท ต่อเซลล์มะเร็งเยื่อบุช่องปาก (KB)..... 69

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 2.1 แผนผังทิศทางของ Primers สำหรับการเพิ่มปริมาณ DNA ของเชื้อราในส่วน 18S rRNA gene โดยหัวลูกศรแสดงทิศทางที่ปลาย 3’..... 15

รูปที่ 3.1 ลักษณะทางสัณฐานของพืชป่าในวงศ์ Araceae ชนิดที่มีชื่อทั่วไปว่า ว่านขันหมาก ตัวอย่างที่มีขนาดต้นเล็ก เจริญในพื้นที่ธรรมชาติ จังหวัดนครราชสีมา..... 24

รูปที่ 3.2 ลักษณะทางสัณฐานของผลว่านขันหมาก ตัวอย่างที่มีขนาดต้นเล็ก 3 ตัวอย่าง..... 25

รูปที่ 3.3 ลักษณะทางสัณฐานของว่านขันหมาก ตัวอย่างที่มีขนาดต้นใหญ่ ที่มีการเจริญในพื้นที่ธรรมชาติ จังหวัดนครราชสีมา..... 26

รูปที่ 3.4 ลักษณะทางสัณฐานของรากและผลว่านขันหมากที่มีขนาดต้นใหญ่ เก็บจากที่มีการเจริญของพืชในพื้นที่ธรรมชาติ จังหวัดนครราชสีมา..... 27

รูปที่ 3.5 ลักษณะทางสัณฐานของพืชป่าที่เป็นไม้เถาชนิดที่มีชื่อทั่วไปว่า เครือสี่เหลี่ยม..... 28

รูปที่ 3.6 ลักษณะทางสัณฐานของพืชป่าในวงศ์ Euphorbiaceae ชนิดที่มีชื่อทั่วไปว่า ขันทองพยาบาท ที่เจริญในพื้นที่ธรรมชาติ จังหวัดนครราชสีมา..... 30

รูปที่ 3.7 ลักษณะทางสัณฐานของพืชป่าในวงศ์ Leguminosae ชนิดที่มีชื่อทั่วไปว่า ถ่อนหรือทิ้งถ่อน ที่เจริญตามธรรมชาติในพื้นที่จังหวัดนครราชสีมา..... 32

รูปที่ 3.8 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของเชื้อราต่างไอโซเลทที่แยกได้จากใบของว่านขันหมาก ที่มีขนาดต้นเล็ก..... 41

รูปที่ 3.9 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของเชื้อราต่างไอโซเลทที่แยกได้จากก้านใบของว่านขันหมาก ที่มีขนาดต้นเล็ก..... 41

รูปที่ 3.10 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของเชื้อราต่างไอโซเลทที่แยกได้จากลำต้นของว่านขันหมาก ที่มีขนาดต้นเล็ก..... 42

รูปที่ 3.11 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของเชื้อราต่างไอโซเลทที่แยกได้จากโคนต้นของว่านขันหมากที่มีขนาดต้นเล็ก..... 42

รูปที่ 3.12 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของเชื้อราต่างไอโซเลทที่แยกได้จากรากของว่านขันหมาก ที่มีขนาดต้นเล็ก..... 43

รูปที่ 3.13 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของเชื้อราต่างไอโซเลทที่แยกได้จากใบของว่านขันหมาก ที่มีขนาดต้นใหญ่..... 43

รูปที่ 3.14 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของเชื้อราต่างไอโซเลทที่แยกได้จากก้านใบของว่านขันหมาก ที่มีขนาดต้นใหญ่..... 44

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 3.15 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของเชื้อราต่างไอโซเลทที่แยกได้จากลำต้นของว่านขันหมาก ที่มีขนาดต้นใหญ่..... 44
รูปที่ 3.16 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของเชื้อราต่างไอโซเลทที่แยกได้จากโคนต้นของว่านขันหมาก ที่มีขนาดต้นใหญ่..... 45
รูปที่ 3.17 ตัวอย่างลักษณะทางสัณฐานของเชื้อราที่แยกได้จากรากของว่านขันหมากที่มีขนาด ต้นใหญ่..... 45
รูปที่ 3.18 ตัวอย่างลักษณะการเจริญของเชื้อราต่างไอโซเลทที่แยกได้จากใบของว่านขันหมาก ที่มีขนาดต้นเล็ก ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Malt extract broth 52
รูปที่ 3.19 ตัวอย่างลักษณะการเจริญของเชื้อราต่างไอโซเลทที่แยกได้จากก้านใบของ ว่านขันหมากที่มีขนาดต้นเล็ก ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Malt extract broth..... 53
รูปที่ 3.20 ตัวอย่างลักษณะการเจริญของเชื้อราต่างไอโซเลทที่แยกได้จากลำต้นของว่าน ขันหมากที่มีขนาดต้นเล็ก ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Malt extract broth..... 53
รูปที่ 3.21 ตัวอย่างลักษณะการเจริญของเชื้อราต่างไอโซเลทที่แยกได้จากโคนต้นของว่าน ขันหมากที่มีขนาดต้นเล็กในอาหารเลี้ยงเชื้อ Malt extract broth…..... 54
รูปที่ 3.22 ตัวอย่างลักษณะการเจริญของเชื้อราต่างไอโซเลทที่แยกได้จากรากของว่าน ขันหมากที่มีขนาดต้นเล็ก ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Malt extract broth..... 54
รูปที่ 3.23 ตัวอย่างลักษณะการเจริญของเชื้อราต่างไอโซเลทที่แยกได้จากใบของว่านขันหมาก ที่มีขนาดต้นใหญ่ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Malt extract broth..... 55
รูปที่ 3.24 ตัวอย่างลักษณะการเจริญของเชื้อราต่างไอโซเลทที่แยกได้จากก้านใบของว่าน ขันหมากที่มีขนาดต้นใหญ่ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Malt extract broth……..... 56
รูปที่ 3.25 ตัวอย่างลักษณะการเจริญของเชื้อราต่างไอโซเลทที่แยกได้จากลำต้นของว่าน ขันหมากที่มีขนาดต้นใหญ่ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Malt extract broth..... 56
รูปที่ 3.26 ตัวอย่างลักษณะการเจริญของเชื้อราต่างไอโซเลทที่แยกได้จากโคนต้นของว่าน ขันหมากที่มีขนาดต้นใหญ่ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Malt extract broth……..... 57
รูปที่ 3.27 ตัวอย่างลักษณะการเจริญของเชื้อราต่างไอโซเลทที่แยกได้จากรากของว่านขันหมาก ที่มีขนาดต้นใหญ่ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Malt extract broth ที่……..... 57

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

เชื้อราที่อยู่ในพืช (Endophytic fungi หรือ Endophytes) เป็นกลุ่มเชื้อราที่มีชีวิตอยู่ในพืชปกติโดยไม่ก่อโรคแก่พืช ขณะเดียวกันการดำรงชีวิตระหว่างเชื้อรากับพืชอาศัยเป็นแบบได้ประโยชน์ซึ่งกันและกัน โดยที่เชื้อราได้รับสารอาหารจากพืชและพืชได้รับสารจากเชื้อราซึ่งที่พบเป็นสารทุติยภูมิ (Secondary metabolites) มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคในพืชได้ (Brunner and Petrini, 1992) มีรายงานว่า Endophytes บางชนิดเป็นเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้จากพืชอาศัย และเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อรา สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นและสารต้านเซลล์มะเร็งทำนองเดียวกับที่พืชหลายชนิดสร้างสารออกฤทธิ์ทั้งที่ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์หลายชนิดและสารต้านเซลล์มะเร็ง ตัวอย่างเช่น เชื้อรา *Taxomyces andreanae* พบเป็น Endophyte อยู่ในพืช Pacific yew (*Taxus brevifolia*) เมื่อแยกราจากพืชมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อรา สามารถผลิต Taxol ได้เช่นเดียวกับในพืช Pacific yew สาร Taxol เป็นยารักษาโรคมะเร็งที่มีราคาสูงที่สกัดได้จากส่วนในของเปลือกลำต้นพืชดังกล่าว ในระดับอุตสาหกรรม สาร Taxol ที่ผลิตจากเชื้อรานี้มีต้นทุนต่ำกว่าที่ได้จากพืช (Li *et al*., 1998a; Li *et al*., 1998b; Stierle *et al*., 1993) และยังมีการรายงานเกี่ยวกับเชื้อรา *Pestalotiopsis microspora* ที่แยกได้จากเปลือกและใบของต้นสน *Taxus wallachiana* สามารถสร้างสาร Taxol ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านมและมะเร็งรังไข่ได้ (Strobel *et al*., 1996)

กรณีพืชที่สร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ พืชบางชนิดจัดเป็นสมุนไพรที่ได้รับความสนใจในปัจจุบันทั้งเพื่อการรักษาโรคและเป็นอาหารเสริมสุขภาพ จนมีการผลิตเป็นสินค้า ทำให้สมุนไพรหลายชนิดกลายเป็นพืชเศรษฐกิจ แต่เมื่อใดก็ตามที่พบจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้เทียบเท่าพืช ความสำคัญของพืชในแง่การผลิตสารเฉพาะชนิดนั้นอาจจะลดลงเนื่องจากความสามารถในการเจริญและการผลิตสารของจุลินทรีย์นั้นเร็วกว่าพืชมาก และถ้ามีการผลิตและปลดปล่อยสารออกนอกเซลล์ทำให้การเก็บเกี่ยวสารผลผลิตง่ายขึ้นอีกด้วย อย่างไรก็ตามมีคำถามในวงการวิชาการของการประชุมวิชาการด้านเชื้อราซึ่งยังไม่สามารถระบุคำตอบที่แน่นอนได้คือ พืชสมุนไพรที่มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพนั้นน่าจะมี Endophytes อยู่หรือไม่ และถ้ามีเชื้อราอยู่ร่วมด้วย สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพนั้นเกิดจากกิจกรรมของพืชเอง หรือเกิดจากเชื้อราที่อยู่ในพืช หรือเกิดจากการอยู่รวมกันของสิ่งมีชีวิตสองชนิดนี้ พืชสมุนไพรชนิดเดียวกันแต่เจริญต่างถิ่นกันสามารถให้ผลของสารออกฤทธิ์ที่แตกต่างกันได้ สิ่งแวดล้อมที่พืชเจริญอาจเป็นปัจจัยสำคัญในการสะสมสารของพืชที่แตกต่างกัน ซึ่งเป็นเพียงสมมติฐานที่เป็นไปได้ และถ้าเป็นบทบาทของเชื้อราที่อยู่ในพืชจะทำให้การผลิตและควบคุมสารของพืชสมุนไพรง่ายขึ้นเนื่องจากมีความเป็นไปได้ที่จะควบคุมให้พืชนั้นๆ ได้รับเชื้อราสายพันธุ์เฉพาะที่มีบทบาทต่อการผลิตสาร หรือแยกเชื้อรามาผลิตสารโดยตรงในกรณีที่ไม่มีอิทธิพลของการอยู่

ร่วมกันต่อความสามารถในการผลิตสารของเชื้อรา โครงการวิจัยนี้จึงมุ่งที่จะศึกษาเชื้อรา Endophytes ที่อยู่ในพืชป่าของประเทศไทยซึ่งเป็นพืชชนิดที่มีการนำมาใช้ประโยชน์ในการรักษาโรคโดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคมะเร็งตามภูมิปัญญาพื้นบ้านอยู่แล้ว พร้อมทั้งศึกษาความเป็นพิษของสารที่ผลิตจากทั้งเชื้อราและพืชอาศัย (เช่น ส่วนใบ ลำต้น และราก) ต่อเซลล์มะเร็งของคน ด้วยความร่วมมือและความพร้อมในการวิจัยของบุคลากรในสังกัดของ 3 หน่วยงานคือ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (สาขาวิชาจุลชีววิทยา) กรมป่าไม้ (สำนักวิจัยการจัดการป่าไม้และผลิตผลป่าไม้) และสถาบันมะเร็งแห่งชาติ (งานวิจัยสมุนไพร) เพื่อศึกษาเชื้อรา Endophytes ของพืชป่าบางชนิดที่มีสารออกฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็งที่พบในประเทศไทย เพื่อการใช้ประโยชน์ทรัพยากรพืชและจุลินทรีย์อย่างคุ้มค่าในอนาคต อีกทั้งสามารถใช้ประโยชน์ของผลการวิจัยให้ความรู้ทางวิชาการกับประชาชนผู้ใช้ประโยชน์พืช

เมื่อคำนึงถึงโรคมะเร็งในปัจจุบันนับว่าเป็นโรคสำคัญที่เป็นปัญหาสาธารณสุขระดับโลก เนื่องจากเป็นสาเหตุการตายของประชากรของโลกที่มีแนวโน้มของผู้ป่วยเป็นโรคมะเร็งใหม่ในปีหนึ่งๆ อีกประมาณ 9 ล้านคน องค์การอนามัยโลกได้คาดการณ์ไว้ว่า ในปี พ.ศ. 2563 (ค.ศ. 2020) ประชากรโลกจะตายด้วยโรคมะเร็งมากกว่า 11 ล้านคน สำหรับประเทศไทยโรคมะเร็งเป็นสาเหตุการตายอันดับหนึ่งของประเทศถ้าไม่นับการตายเนื่องจากอุบัติเหตุและมีจำนวนผู้ป่วยด้วยโรคมะเร็งเพิ่มขึ้นทุกปี (Wibulpolprasert, 2002) การรักษาโรคมะเร็งตามแพทย์แผนปัจจุบันคือการผ่าตัดและต้องได้รับการรักษาเสริม ได้แก่ การให้ยาเคมีบำบัด และ การฉายรังสี เป็นต้น การให้ยาเคมีบำบัดเป็นวิธีการรักษาเสริมที่สะดวกสำหรับผู้ป่วยและเนื่องจากมะเร็งเป็นกลุ่มโรคที่มีความหลากหลายที่สาเหตุ ตำแหน่งของโรค ขนาดของการกระจายตัว ตลอดจนอัตราการเจริญของเซลล์มะเร็ง จึงเป็นการยากที่จะหายาที่สามารถต้านมะเร็งได้ทุกชนิด และยาเคมีที่ใช้ก็มีราคาแพงเนื่องจากการนำเข้าจากต่างประเทศและมักมีผลข้างเคียงของยา จากข้อจำกัดดังกล่าว จึงมีความต้องการสารหรือตัวยาใหม่ๆ ที่มีประสิทธิภาพในการรักษาโรคมะเร็งได้มากขึ้นและมีผลข้างเคียงต่ำกว่ายารักษามะเร็งที่ใช้ในปัจจุบัน บทบาทของสารออกฤทธิ์จากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากพืชสมุนไพรจึงอยู่ในความสนใจ และหากจุลินทรีย์สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ได้เช่นเดียวกับพืช จะสามารถผลิตได้ในปริมาณมาก ใช้เวลาสั้นกว่าพืช ต้นทุนการผลิตต่ำและนำไปสู่การใช้ประโยชน์ได้กว้างขวางขึ้น ประกอบกับประเทศไทยเป็นประเทศที่อุดมไปด้วยทรัพยากรพืชและจุลินทรีย์ จึงยังมีพืชป่าอีกหลายชนิดที่ชาวบ้านนำมาใช้ประโยชน์หรือบริโภคแต่ยังไม่มีข้อมูลทางวิชาการเพื่อการใช้ประโยชน์อย่างถูกต้องและคุ้มค่า โครงการวิจัยเชื้อราที่อยู่ในพืชป่าและความเป็นพิษของสารจากเชื้อราและพืชต่อเซลล์มะเร็งนี้จึงมุ่งหวังให้ได้ข้อมูลที่ช่วยเพิ่มการใช้ประโยชน์พืชและเชื้อรา

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย เพื่อ

1) ให้ได้ชนิดหรือสายพันธุ์ของเชื้อราที่อยู่ในพืชป่า (Endophytic fungi หรือ Endophytes) บางชนิดที่

พบในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ที่มีความเป็นไปได้สูงในการผลิตสารต้านเซลล์มะเร็ง

2) ให้ได้ข้อมูลของสารที่ผลิตจากเชื้อราบางชนิดที่อยู่ในพืชป่าและจากพืชนั้นๆ ที่เป็นพิษกับเซลล์มะเร็ง และฤทธิ์ของสารนั้นต่อเซลล์ปกติของคน

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

โครงการวิจัยนี้เป็นโครงการเริ่มต้นเพื่อพัฒนาไปสู่การวิจัยในเชิงลึก โครงการนี้จะดำเนินการภายใต้ความร่วมมือของบุคลากรในสังกัดของ 3 หน่วยงาน คือ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี กรมป่าไม้ และสถาบันมะเร็งแห่งชาติ โดยเน้นศึกษาเชื้อรากลุ่ม Endophytes ที่อยู่ในพืชป่าบางชนิดที่พบการเจริญในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยและชาวชนบทหรือชาวบ้านนำมาใช้ประโยชน์ในแง่ยารักษาโรคมะเร็งและโรคอื่นๆ ตามภูมิปัญญาพื้นบ้านอยู่แล้ว เพื่อการใช้ประโยชน์ทั้งพืชและจุลินทรีย์ในด้านการผลิตสารต้านเซลล์มะเร็งของคน การดำเนินงานเริ่มจากการรวบรวมตัวอย่างพืชป่าเป้าหมายจากที่ได้มีการสำรวจพื้นที่ที่มีการเจริญของพืชในเบื้องต้น ระบุชนิดในเบื้องต้นของพืช และทดลองสกัดสารจากพืชที่มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งที่เลี้ยงไว้ในหลอดทดลอง (*in vitro*) ในขณะเดียวกันดำเนินการแยกเชื้อรากลุ่ม Endophytes ที่อยู่ในส่วน (เช่น ใบและลำต้น) ของพืชป่าที่ไม่เป็นโรคหรือแมลงทำลาย คัดแยกเชื้อราและเพาะเลี้ยงให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ ตรวจสอบและจัดจำแนกชนิดของเชื้อรา จัดเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เชื้อรา และทดลองผลิตสารออกฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งโดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำอาหารที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อมาสกัดและทดสอบสารออกฤทธิ์

การทดสอบสารออกฤทธิ์ทั้งที่สกัดจากพืชและจากการเลี้ยงเชื้อราต่อเซลล์มะเร็งจะกระทำกับเซลล์ที่เลี้ยงไว้ในหลอดทดลอง (*in vitro*) โดยเริ่มทดลองกับเซลล์มะเร็ง 2 ชนิด จากเซลล์มะเร็ง 6 ชนิดที่พบมากและกำลังเป็นปัญหาต่อการรักษาผู้ป่วยในประเทศไทย คือ มะเร็งเยื่อบุช่องปาก (Human epidermoid carcinoma) มะเร็งเต้านม (Human breast adenocarcinoma) มะเร็งปอด (Human lung carcinoma) มะเร็งตับ (Human hepatocellular carcinoma) มะเร็งปากมดลูก (Human cervical carcinoma) และมะเร็งลำไส้ (Human colon carcinoma) พร้อมทั้งศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากเชื้อราที่มีต่อเซลล์ปกติของคน วิเคราะห์ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งเป็นค่า IC_{50} (ค่าความเข้มข้นของสารที่ใช้ทดสอบที่สามารถฆ่าเซลล์มะเร็งได้ครึ่งหนึ่งเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม)

สรุปผลการวิจัยทั้งในส่วนของเชื้อรา Endophytes พืชอาศัย และผลของสารสกัดที่ได้จากเชื้อราและพืชที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งและที่เป็นพิษและไม่เป็นพิษกับเซลล์ปกติของคน และเผยแพร่ผลงานวิจัยเบื้องต้นนี้ในวงการวิชาการและประชาชนผู้ใช้ประโยชน์

1.4 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย มีดังนี้

1) สายพันธุ์ของเชื้อราที่อยู่ในพืชป่า (Endophytic fungi) ซึ่งสามารถนำไปสู่การค้นพบทางวิชาการระดับสูงและส่งผลถึงการใช้ประโยชน์ในการผลิตเมแทบอไลท์เพื่อใช้ประโยชน์ได้

2) พืชป่าที่มีเชื้อราอยู่อาศัย ซึ่งเป็นพืชที่คนไทยในชนบทนำมาใช้ในการรักษาโรคมะเร็งและโรคอื่นๆ ตามภูมิปัญญาพื้นบ้านอยู่แล้ว แต่ขาดความรู้และข้อมูลทางวิชาการ

3) ข้อมูลด้านศักยภาพในการผลิตสารออกฤทธิ์ที่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้งจากเชื้อราและพืช เพื่อการศึกษาในเชิงลึกต่อไป เพื่อการใช้ประโยชน์ทรัพยากรจุลินทรีย์และพืชได้สูงสุดในการผลิตและใช้ประโยชน์ของสารออกฤทธิ์อย่างมีศักยภาพ ซึ่งสถาบันมะเร็งแห่งชาติที่มีส่วนรับผิดชอบการวิจัยนี้ มีการใช้ประโยชน์สารโดยตรง อาจช่วยลดการเสียชีวิตของประชากรไทยด้วยโรคมะเร็ง

4) องค์ความรู้ด้านเชื้อราที่อยู่ในพืชป่าที่มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของประเทศไทย องค์ความรู้นี้ช่วยส่งเสริมการอนุรักษ์และใช้ประโยชน์ทรัพยากรพืชและทรัพยากรจุลินทรีย์ที่คุ้มค่า ซึ่งยังมีพืชป่าอีกหลายชนิดที่ชาวบ้านนำมาใช้ประโยชน์หรือบริโภคแต่ขาดข้อมูลทางวิชาการเพื่อการใช้ประโยชน์อย่างถูกต้อง

5) ผลงานวิจัยที่ถ่ายทอดยังนักวิชาการ ประชาชนผู้สนใจและผู้ใช้ประโยชน์พืช ในรูปแบบการเผยแพร่ (ตามรายการเอกสารแนบท้ายเล่มรายงานนี้) สิ่งพิมพ์ การนำเสนอในที่ประชุมวิชาการ และการให้ข้อมูลโดยตรง พร้อมการฝึกเทคนิคการศึกษาและถ่ายทอดโดยตรงแก่ผู้ช่วยนักวิจัยเพื่อให้ได้นักวิจัยรุ่นใหม่

1.5 ทฤษฎีและกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

เชื้อราที่อยู่ในพืช (Endophytic fungi) อาศัยอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัย ไม่ก่อให้เกิดโรค ราได้รับสารอาหารจากพืช ช่วยส่งเสริมทำให้พืชดูดซับธาตุอาหารได้มากขึ้น ส่งเสริมการเจริญของพืช และบางชนิดสามารถทำให้พืชอาศัยต้านทานต่อโรคและแมลง (Petrini, 1986; Brunner and Petrini, 1992) Endophytic fungi หลายชนิดมีศักยภาพในการสร้างสารออกฤทธิ์ที่ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นและต้านเซลล์มะเร็ง อีกทั้งเชื้อราในกลุ่มดังกล่าวบางชนิดสร้างสารออกฤทธิ์ได้เช่นเดียวกับพืชอาศัย คือรายงานในต่างประเทศที่พบว่า รา *Taxomyces andreanae* ผลิต Taxol ได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่นเดียวกับสาร Taxol ที่สกัดได้จากส่วนในของเปลือกลำต้นของพืชอาศัย (*Taxus brevifolia*) ซึ่งสาร Taxol นี้ใช้เป็นยารักษาโรคมะเร็ง และการผลิตสารในระดับอุตสาหกรรมสามารถใช้เชื้อราผลิตด้วยต้นทุนการผลิตที่ต่ำกว่าการสกัดสารจากพืช (Li *et al*., 1998a; Li *et al*., 1998b; Stierle *et al*., 1993)

ประเทศไทยมีทรัพยากรพืช/พืชสมุนไพรและทรัพยากรจุลินทรีย์ที่มีความหลากหลายของชนิดและจำนวนมาก ปัจจุบันนักวิจัยไทยสนใจที่จะศึกษาพืชสมุนไพรกันอย่างกว้างขวางและมากกว่าการศึกษาเชื้อราที่อยู่ในพืช ด้วยเหตุที่พืชสมุนไพรหลายชนิดกลายเป็นพืชเศรษฐกิจแล้ว ถ้าคำนึงด้านเชื้อรา ทั้งนักวิชาการที่ศึกษา Endophytes ในประเทศและรายงานผลการศึกษายังจัดได้ว่ามีน้อย และมีความเป็นไปได้ที่เชื้อราจะมีบทบาทในการผลิตสารได้เช่นเดียวกับพืชสมุนไพร ซึ่งถ้าเป็นจริง เชื้อราอาจมีความสำคัญในแง่การผลิตสารเฉพาะชนิดเพื่อใช้ประโยชน์โดยตรงมากกว่าพืช ดังนั้นการศึกษาถึงเชื้อราที่อยู่ในพืชป่าที่มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและ/หรือพืชสมุนไพรควบคู่ไปกับการศึกษาพืชจึงเป็นองค์ความรู้ใหม่ที่ช่วยส่งเสริมการใช้ประโยชน์ทรัพยากรพืชและทรัพยากรจุลินทรีย์ที่คุ้มค่า ประกอบกับการที่ยังมี

พืชป่าอีกหลายชนิดที่ชาวบ้านนำมาใช้ประโยชน์หรือบริโภคแต่ขาดข้อมูลทางวิชาการในการใช้ประโยชน์อย่างถูกต้อง ผลการวิจัยทางด้านสารที่พบซึ่งเน้นความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งยังเป็นประโยชน์ในการเสาะหาสารธรรมชาติเพื่อการรักษาโรคมะเร็งในประเทศไทย

1.6 ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1.6.1 เชื้อราที่อยู่ในพืชป่า (Endophytic fungi หรือ Endophytes)

เชื้อราที่อยู่ในพืช (Endophytic fungi หรือ Endophytes) หมายถึง กลุ่มเชื้อราที่มีชีวิตอยู่ในพืชปกติ โดยอาศัยอยู่ในเซลล์เนื้อเยื่อของส่วนต่างๆ ของพืช ได้แก่ ใบ กิ่ง ลำต้น ราก ดอก ผล เมล็ด เป็นต้น ส่วนใหญ่เชื้อราที่อยู่ในพืชที่พบในปัจจุบันนี้จัดอยู่ในกลุ่ม Deuteromycotina, Ascomycotina และ Basidiomycotina (Bacon and White, 2000; Mekkamol, 1998) การดำรงชีวิตระหว่างเชื้อรากับพืชอาศัยเป็นแบบได้ประโยชน์ซึ่งกันและกัน โดยที่ราได้รับสารอาหารจากพืช และในขณะเดียวกันพืชได้รับสารบางชนิดจากราที่เรียกว่าสารทุติยภูมิ (Secondary metabolites) เช่น สารปฏิชีวนะหรือสารซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคในพืช (Brunner and Petrini, 1992)

เชื้อราที่อยู่ในพืชเป็นจุลินทรีย์กลุ่มเด่นกลุ่มหนึ่งที่เมื่อแยกจากพืชอาศัยมาศึกษาแล้วพบว่าบางชนิดมีบทบาทในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและเมแทบอไลท์ที่เป็นประโยชน์กับคน ซึ่งปัจจุบันมีการตื่นตัวกันมากในกลุ่มประเทศที่พัฒนาและกำลังพัฒนา รวมถึงในประเทศไทยเห็นได้จากแหล่งเก็บเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์ของศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติมุ่งเน้นการเก็บรวบรวมเชื้อราที่อยู่ในพืช (Endophytes) เพื่อใช้ประโยชน์ทางเทคโนโลยีชีวภาพเป็นประเด็นสำคัญ (Lumyong *et al*., 2004) Lumyong *et al*. (2004) ยังระบุถึงความหลากหลายของเชื้อราที่อยู่ในพืชในเขตร้อน ซึ่งที่มีการศึกษากันแล้วโดยส่วนใหญ่เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว จำพวกปาล์มและกล้วย อย่างไรก็ตามในพืชใบเลี้ยงคู่ก็มีรายงานดังเช่น ต้นสัก (Mekkamol, 1998) ตัวอย่างการศึกษา Endophytic fungi ได้แก่ เลขามาโนช และคณะ (2544) ศึกษารา Endophytes บนใบกล้วยไม้ดิน 3 ชนิด ราที่พบได้แก่ *Colletotrichum*, *Nodulosporium* และ Xylariaceae การศึกษาราดิน บริเวณรอบรากกล้วยไม้จำนวน 5 ชนิด โดยวิธี Soil plate และใช้เมล็ดข้าวเป็นเหยื่อล่อ พบราในสกุลและชนิด ดังนี้ *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Cunninghamella echinulata*, *C. elegans*, *Eupenicillium*, *Fusarium*, *Gelasinospora*, *Gongronella*, *Hamigera*, *Monodictys*, *Mucor*, *Myrothecium verrucaria*, *Neurospora*, *Paecilomyces lilacinus*, *Papulospora immersa*, *P. irregularis*, *Penicillium rubrum*, *Phomopsis*, *Rhizopus stolonifer*, *Syncephalastrum*, *Talaromyces*, *Thielaviopsis* และ *Trichoderma polysporum*

Ditpan (2007) คัดแยกเชื้อราจากกิ่ง ใบ และเปลือก ต้นขันทองพยาบาท *Suregada multiflora* (A.Juss.) Baill. ศึกษาชนิดตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน ITS1-5.8S-ITS2 ของ rDNA พบราอยู่ในส่วนของเปลือกต้นขันทองพยาบาทคือ *Lasiodiplodia* sp. ซึ่งคาดว่าเป็น Anamorph ของรา *Botryosphaeria rhodina* เนื่องจากมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน 100%

จิตรา เกาะแก้ว และคณะ (2550) ศึกษาชนิดของ Endophytic fungi ที่อยู่ร่วมกับพืชสมุนไพร จำนวน 13 วงศ์ 15 ชนิด คือ กระวาน กระชายขาว ราชพฤกษ์ โคลงเคลง ค้อนตีหมา เตยหนาม นาวน้ำ โกฐจุฬาลำพา ทับทิม ตะขาบปีน กล้วย ผักหวานใหญ่ ฝางส้ม ชะเอมเถา เถาตดหมูตดหมา ส้มกุ้ง จาก อุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ จังหวัดนครราชสีมา และสวนสิรีรุกขชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา จังหวัดนครปฐม และวิทยาเขตไทรโยค จังหวัดกาญจนบุรี ระหว่างเดือนมีนาคมถึงสิงหาคม พ.ศ. 2549 แยกเชื้อโดยวิธี Sodium hypochlorite - ethanol surface sterilization บนอาหาร Water agar (WA) และ Potato dextose agar (PDA) พบ Endophytic fungi 210 สายพันธุ์ (Isolate) จัดเป็นรา *Hyphomycetes* 25 สายพันธุ์ จำแนกได้ 7 สกุล 6 ชนิด Coelomycetes 135 สายพันธุ์ 5 สกุล 3 ชนิด Ascomycetes จำนวน 20 สายพันธุ์ และราที่ไม่สร้างส่วนขยายพันธุ์หรือสปอร์ จำนวน 55 สายพันธุ์ ราที่พบมากที่สุดคือ *Colletotrichum*, *Pestalotiopsis*, *Phyllosticta*, *Phoma* และ *Phomopsis* ตามลำดับ เมื่อนำ Endophytic fungi ที่แยกได้จำนวน 7 ชนิด มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคพืช 10 ชนิด บนอาหาร PDA พบว่า Endophytic fungi ที่เจริญช้าและไม่สร้างสปอร์ 5 สายพันธุ์ และรา *Pestalotiopsis* sp. 1 สายพันธุ์ สามารถยับยั้งการเจริญของรา *Alternaria alternate*, *Bipolaris maydis*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Phytophthora palmivora*, และ *Sclerotium rolfsii* ในห้องปฏิบัติการ

วสันณ์ เพชรรัตน์ และ นพวรรณ นิลสุวรรณ (2550) แยกเชื้อราจากใบพืชหน้าวัวที่มีลักษณะปกติ ในวงศ์ Araceae จำนวน 125 ตัวอย่าง ได้เชื้อราจำนวน 62 ไอโซเลท จำแนกเป็นเชื้อรา ดังนี้ *Colletotrichum* sp. จำนวน 8 ไอโซเลท *Aspergillus* sp. จำนวน 1 ไอโซเลท *Penicillium* sp. จำนวน 1 ไอโซเลท *Trichoderma* sp. จำนวน 1 ไอโซเลท และในกลุ่มของเชื้อราที่ไม่สร้างโครงสร้างการสืบพันธุ์หรือไม่สร้างสปอร์ จำนวน 51 ไอโซเลท

เลขา มาโนช และคณะ (2552) ได้คัดเลือกราดินและ Endophytic fungi เพื่อใช้ในการควบคุมการเจริญของรา *Rhizoctonia* สาเหตุโรคกาบใบแห้งของข้าว ข้าวโพด และทุเรียนบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar ราดินที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของรา *Rhizoctonia* spp. ได้แก่ *Humicola fuscoatra*, *Chaetomium globosum*, *C. cupreum* และ *Trichoderma* sp. ส่วนรา *Sordaria fimicola* และ *Talaromyces flavus* ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของรา *Rhizoctonia* แต่ยับยั้งการเจริญของรา *Alternaria alternata*, *Colletotrichum capsici*, *C. gloeosporioides*, *Curvularia lunata*, *Fusarium oxysporum*, *Helminthosporium maydis*, *H. oryzae*, *Peronophythora litchii*, *Pestalotiopsis guepinii*, *Phyllosticta* sp., *Phytophthora palmivora* และ *P. parasitica* และพบว่า Endophytic fungi ซึ่งเจริญช้าและไม่สร้างสปอร์ที่แยกได้จากใบอุตพิต (*Typhomium trilobatum*, วงศ์ Araceae) จากจังหวัดสุพรรณบุรี สามารถยับยั้งการเจริญของรา *Rhizoctonia* spp. สาเหตุโรคใบไหม้ของข้าว ข้าวโพด และทุเรียน *Pythium utimum* และ *Phytophthora cinnamomi*

Maehara *et al.* (2010) คัดแยกราจำนวน 21 ไอโซเลท จากต้นอ่อนของควินิน *Cinchona ledgeriana*

(Rubiaceae) ที่เจริญในเขตชวาตะวันตก ประเทศอินโดนีเซีย และจัดจำแนกชนิดของราด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ Internal transcribed spacers (ITS1 และ ITS2) ซึ่งมีบริเวณ 5.8S Ribosomal DNA region ได้ว่าเป็นรา *Phomopsis* spp., *Diaporthe* spp., *Penicillium* spp. และ *Arthrinium* sp.

Hilarino *et al.* (2011) ศึกษาความหลากชนิดและการกระจายของเชื้อราที่อาศัยอยู่ในใบของพืช *Bauhinia brevipes* ในวงศ์ Fabaceae จากลักษณะทางสัณฐานวิทยา จำแนกเชื้อราได้ 126 taxa ตามลักษณะการเจริญของใบ โดยแยกได้จากใบแก่จำนวน 102 texa ใบเจริญจำนวน 93 texa และใบที่เริ่มแผ่ออก 79 texa พบสกุลเด่นคือ *Phomopsis*, *Dothiorella*, *Pestalotiopsis* และ *Acremonium* บริเวณของใบไม่มีผลต่อความหลากชนิดและจำนวนไอโซเลทของเชื้อราอย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตาม บาง taxa พบเฉพาะบริเวณขอบใบ ซึ่งจำแนกเป็น 6 taxa คัดแยกจากใบที่เริ่มแผ่ออก 9 taxa จากใบเจริญและ 17 taxa จากใบแก่ องค์ประกอบของกลุ่มเชื้อรามีความแตกต่างกันตามบริเวณของใบ ซึ่งมีความแปรปรวนทางพื้นที่สูงภายในใบพืช ความหลากชนิดของเชื้อราสูงซึ่งแสดงถึงการกระจายของเชื้อราให้เกิดความหลากหลายในบริเวณเขตร้อนชื้น

Gazis *et al.* (2012) ได้ศึกษาเชื้อรา Endophytes ในกระพี้และใบของยางพารา พบเชื้อราชนิดใหม่ในกลุ่ม Ascomycota จากการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในหลายตำแหน่งของ Genes (Multilocus phylogenetic analyses) อยู่ในกลุ่ม Leotiomyceta ซึ่งประกอบด้วย Arthoniomycetes, Dothideomycetes, Eurotiomycetes, Geoglossomycetes, Lecanoromycetes, Leotiomycetes, Lichinomycetes และ Sordariomycetes รวมทั้งกลุ่มเชื้อราที่อาศัยอยู่ในใบพืช จึงจัดจำแนกเชื้อราชนิดนี้ใน Class ใหม่คือ Xylonomycetes

Mingma *et al.* (2014) พบเชื้อรา Actinomycetes จำนวน 77 และ 240 ไอโซเลท จากรากพืชวงศ์ถั่ว ที่มีปริมาณของ Diaminopimelic acid (LL-isomer) มากในเซลล์ จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene สามารถจำแนกเชื้อราในระดับสกุลได้ดังนี้ *Amycolatopsis*, *Isoptericola*, *Micromonospora*, *Microbispora*, *Nocardia*, *Nonomuraea*, *Promicromonospora* และ *Pseudonocardia*

Sutjaritvorkul (2015) คัดแยกเชื้อราจากใบสะทอนสด (*Millettia utilis* Dunn) จัดจำแนกเชื้อราตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้ดังนี้ *Absidia* spp., *Aspergillus niger*, *Aspergillus* sp., *Fusarium* spp., *Penicillum* sp., *Pestalotiopsis* spp., *Phomopsis* spp. และ *Phyllosticta* spp.

1.6.2 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อราบางชนิดที่อยู่ในพืช

รายงานการศึกษาเชื้อราที่อยู่ในพืชที่มีการสร้าง Secondary metabolites ได้แก่ *Fusarium oxysporum* ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อต้นมะเขือเทศปกติ สามารถสร้างสารทุติยภูมิที่เป็นพิษต่อไส้เดือนฝอยศัตรูพืช (Hallmann and Sikora, 1998) เชื้อรา *Fusarium subglutinans* ที่แยกจากต้น *Triterygium wilfordii* สามารถสร้างสาร Subglutinol ที่มีฤทธิ์กดภูมิต้านทาน และสามารถนำมาใช้ในผู้ป่วยที่มีการผ่าตัดเปลี่ยนถ่ายอวัยวะได้ (Lee *et al*., 1995)

สำหรับสารออกฤทธิ์จากจุลินทรีย์นั้น ได้มีการศึกษากันมากขึ้น จากรายงานประจำปี ค.ศ. 2000 ของมหาวิทยาลัย Bradford ประเทศอังกฤษ ระบุว่าขณะนี้บริษัทผลิตยากำลังวิจัยหาตัวยาชนิดใหม่ที่ได้จากพืชและจุลินทรีย์ ซึ่งจากผลงานวิจัยของมหาวิทยาลัยเองพบว่า เชื้อราในวงศ์ Xylariaceae สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพใหม่ๆ หลายชนิด และสามารถเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ และยังมีรายงานว่าเชื้อราวงศ์นี้สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ในกลุ่ม Cytochalasins ที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งในห้องปฏิบัติการ ซึ่งจากที่คณะผู้วิจัยมีประสบการณ์เกี่ยวกับการศึกษาเชื้อราในวงศ์ Xylariaceae ก็พบความหลากหลายของชนิดของราในกลุ่มนี้มากและมักเป็นชนิดที่มีรายงานว่าเป็น Endophytes (Rodtong *et al*., 2000; Thienhirun *et al*., 2003)

ในด้านความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพทั้งจากพืชและจุลินทรีย์ที่มีการสกัดแยกสารมาทดลองใช้ประโยชน์เพื่อรักษาโรคนั้น สารบางชนิดที่สกัดได้ก็ให้ผลดีในการต้านเซลล์มะเร็งดังตัวอย่างที่กล่าวในข้างต้น ซึ่งปัจจุบันโรคมะเร็งนับเป็นโรคที่เป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญทั้งของประเทศไทยและของโลก ดังได้กล่าวในข้างต้นอีกเช่นกันว่าโรคมะเร็งเป็นสาเหตุการตายอันดับหนึ่งของประเทศไทย ถ้าไม่นับการตายเนื่องจากอุบัติเหตุ และมีจำนวนผู้ป่วยด้วยโรคมะเร็งเพิ่มขึ้นทุกปี (Wibulpolprasert, 2002) ซึ่งชนิดของมะเร็งที่พบบ่อยในประชากรไทย ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2551-2555 (กระทรวงสาธารณสุข, 2556) นั้นมีราว 10 ชนิด ได้แก่ มะเร็งตับ มะเร็งปอด มะเร็งลำไส้ มะเร็งช่องปาก มะเร็งต่อมลูกหมาก มะเร็งกระเพาะอาหาร มะเร็งผิวหนัง มะเร็งเม็ดเลือด มะเร็งปากมดลูก และมะเร็งเต้านม การรักษาให้หายจากโรคมะเร็ง สามารถทำได้โดยการฉายรังสี (และต้องได้รับการรักษาเสริม ได้แก่ การให้ยาเคมีบำบัด) หรือการผ่าตัด (และต้องได้รับการรักษาเสริม ได้แก่ การให้ยาเคมีบำบัดและการฉายรังสี) เป็นต้น เนื่องจากมะเร็งเป็นกลุ่มโรคที่มีความหลากหลายที่สาเหตุ ตำแหน่งของโรค ขนาดของการกระจายตัว ตลอดจนอัตราการเจริญของเซลล์มะเร็ง จึงเป็นการยากที่จะหายาที่สามารถต้านมะเร็งได้ทุกชนิด จากปัญหาข้อและจำกัดดังกล่าว ในการรักษาเสริมด้วยยาเคมีบำบัดนั้นยังมีความต้องการหาสารใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการรักษาโรคมะเร็งมากขึ้นและที่สำคัญควรมีผลข้างเคียงต่ำกว่ายารักษามะเร็งที่ใช้ในปัจจุบัน พืชสมุนไพรเป็นทางเลือกหนึ่งของแหล่งผลิตสารต้านเซลล์มะเร็ง นอกเหนือจากความนิยมใช้สมุนไพรในการรักษาโรคอื่นๆ และเป็นอาหารเสริมสุขภาพ

ด้วยเหตุที่ประเทศไทยอุดมด้วยทรัพยากรพืช จึงยังมีพืชป่าอีกหลายชนิดที่มีการนำมาใช้ประโยชน์ในการรักษาโรคมะเร็งด้วยภูมิปัญญาพื้นบ้าน เช่น พืชบางชนิดในวงศ์ *Euphorbiaceae* ซึ่งพบทั้งที่เป็นไม้พุ่มขนาดใหญ่และไม้ยืนต้นขนาดย่อม (เกียรติ สัจจลักษณ์, 2541) และพืชป่าบางชนิดในวงศ์ *Leguminosae* (Bhakuni *et al*., 1971; นันทวัน บุณยะประภัศร และ อรนุช โชคชัยเจริญพร, 2541) และยังขาดข้อมูลทางวิชาการเพื่อการใช้ประโยชน์อย่างคุ้มค่า

Tanamatayarat *et al.* (2003) สกัดสารออกฤทธิ์จากใบของพืชกลุ่มไม้เนื้อแข็งวงศ์ *Rubiaceae* ที่พบในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ด้วย Ethyl alcohol 95% และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด Human cervix carcinoma cell line (KB-3-1) พบสารสกัดจากใบกระมอบ

(*Gardenia obtusifolia*) และใบคำมอกหลวง (*Gardenia sootepensis*) มีความเป็นพิษสูงต่อเซลล์มะเร็ง (IC_{50} ≤4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ในขณะที่สารสกัดจากใบเข็มป่า (*Ixora cibdela*) ใบแก้มนุ่ม (*Mussaenda pava*) และใบตาเป็ดใบยอ (*Psychotria ophioxyloides*) มีความเป็นพิษปานกลางต่อเซลล์มะเร็ง (20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร <IC_{50}<100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

สุวัชชัย มิสุนา และคณะ (2552) ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัดธรรมชาติที่มีสมบัติเป็น Histone deacetylase (HDAC) inhibitor ของเปลือกต้นขันทองพยาบาทที่สกัดด้วยเอธิลแอลกอฮอล์ ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 200 ไมโครกรัมต่อปฏิกิริยา มีสมบัติเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Histone deacetylase และมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa cells) โดยมีค่า Cytoxicity เท่ากับ 80% ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร Exposure time เท่ากับ 24 ชั่วโมง สารสกัดสมุนไพรขันทองพยาบาทมีความเป็นพิษน้อยต่อเซลล์ปกติ ทั้งเซลล์ Human embryonic kidney (HEK293) cell และ เซลล์ Mouse fibroblast (NIH3T3) cell จากการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดต่อทั้งเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติในเบื้องต้นจากการทดลองที่บ่มสารสกัดกับเซลล์ต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อย่างไรก็ตาม ยังคงต้องทำการทดลองที่เวลา 48 ชั่วโมง และ 72 ชั่วโมง ซึ่งคาดว่าจะสามารถหาค่า IC_{50} ได้ชัดเจนขึ้น

Tewtrakul *et al*. (2011) ศึกษาฤทธิ์ Anti-inflammatory ด้วยตัวทำละลาย Hexane และ CH_2Cl_2 ของสารสกัดจากเปลือกส่วนลำต้น(Stem bark) ของขันทองพยาบาท (*Suregada multiflora*) พบว่าสารสกัดที่ได้มีฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมของ Nitric oxide (NO) ที่ระดับ IC_{50} เท่ากับ 8.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสารสกัดในกลุ่ม Helioscopinolide A มีศักยภาพสูงสุดในการยับยั้งกิจกรรมของ NO ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 9.1 ไมโครโมล (μM) รองลงมาเป็นสารกลุ่ม Helioscopinolide C และ Suremulol D ที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 24.5 และ 29.3 ไมโครโมล ตามลำดับ และพบว่า Helioscopinolide A ยับยั้งกิจกรรมของ prostraglandin E2 (PGE_2) ที่ระดับ IC_{50} เท่ากับ 46.3 ไมโครโมล ผลการศึกษาสนับสนุนภูมิปัญญาชาวบ้านที่ใช้เปลือกของขันทองพยาบาทในการรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (Inflammatory-related diseases)

Bara *et al.* (2013) ศึกษาสารที่ผลิตโดยเชื้อรา *Botryosphaeria australis* ที่แยกได้จากต้นแสมทะเล *Avicennia marina* ในมลฑลไห่หนาน ประเทศจีน พบสารชนิดใหม่คือ Botryosphaenin และพบสาร Botryosterpene และ 5-Hydroxy-2,7-dimethoxynaphthalene-1,4-dione รวมถึงอนุพันธ์อีก 4 ชนิด คือ 6-Ethyl-5-hydroxy-2,7-dimethoxynaphthalene-1,4-dione, O-Methylaspmenone, O-methylasparvenone และ 5-(carboxymethyl)-7-Hydroxy-1,4a-dimethyl-6-methylene decahydron aphthalene-1-carboxylic acid พบว่าสาร Botryosphaenin มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง THP-1 (Human leukemia monocyte) และ BALB/3T3 (Mouse embryonic fibroblast)

Chakravarthi *et al.* (2013) ศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนและการชักนำให้เกิดการตายของ Cancer cell lines โดยสาร Taxol และ Baccatin III ที่สกัดได้จากเชื้อรา *Fusarium solani* ซึ่ง

คัดแยกจากต้น *Taxus celebica* ที่เป็นพืชในกลุ่มสน พบสาร Taxol และ Baccatin III สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง ด้วยค่า IC_{50} ที่อยู่ในช่วง 0.005 ถึง 0.2 ไมโครโมล สำหรับสาร Taxol และ 2 ถึง 5 ไมโครโมล สำหรับสาร Baccatin III และยังพบการชักนำให้เซลล์ตายแบบ Apoptosis ในเซลล์ JR4-Jurkat cells ซึ่งเกี่ยวข้องกับโปรตีน Anti-apoptotic Bcl2 เอนไซม์ Caspase-10 ทำให้เซลล์สูญเสีย Mitochondrial membrane นอกจากนี้ยังตรวจพบ DNA fragmentation ของเซลล์มะเร็งด้วย

Zhang *et al.* (2013) พบสารสกัดจากแก่นนนทรี (*Peltophorum pterocarpum*; Fabaceae) มีฤทธิ์ยับยั้งการกระตุ้น *Epstein-Barr* virus early antigen (EBV-EA) ซึ่งเกิดจากการเหนี่ยวนำของ 12-*O*-Tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) ใน *Raji* cells และยับยั้งการเกิด Melanogenesis ใน α-Melanocyte-stimulating hormone (α-MSH)-stimulated B16 melanoma cells และต้านอนุมูลอิสระ สารอนุพันธ์ฟีนอลิก Bergenin และ Gallic acid ที่ได้จากสารสกัดในส่วน Ethyl acetate (AcOEt)-soluble fraction สามารถยับยั้ง Melanogenesis ในเซลล์ α-Melanocyte-stimulating hormone (α-MSH)-stimulated B16 melanoma cells สาร Bergenin ยังสามารถยับยั้งการกระตุ้น EBV-EA activation และยับยั้งการเกิดมะเร็งผิวหนังของหนูทดลอง สาร Gallic acid ยังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอีกด้วย

Sowemimo *et al.* (2015) ศึกษาฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดจากใบหูช้าง (*Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb) ด้วยเมธิลแอลกอฮอล์ โดยวิธี Brine shrimps lethality assay พบมีความเป็นพิษต่อเซลล์ มีค่า LC_{50} เท่ากับ 31.63 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์ Cervical (HeLa) และ Breast (MCF7) cancer cell lines ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.07±1.30 และ 11.84±1.18 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์วัฏจักรเซลล์พบว่า HeLa cells เกิดการหยุดวงวัฏจักรของเซลล์ในระยะ G2/M phase ขณะที่ MCF7 cells หยุดที่ระยะ G1/G0 phase เมื่อวิเคราะห์ Annexin V-FITC/PI assay พบว่ามีการลำเลียงสาร Phosphatidylserine เกิดขึ้นในเซลล์มะเร็งทั้งสองชนิด แสดงให้เห็นถึงการตายของเซลล์แบบ Apoptosis ในตัวอย่างที่เติมสารสกัดของพืชดังกล่าวข้างต้น

บทที่ 2
วิธีดำเนินการวิจัย

การดำเนินงานของโครงการ 'เชื้อราที่อยู่ในพืชป่าและความเป็นพิษของสารจากเชื้อราและพืชต่อเซลล์มะเร็ง' นี้ใช้สถานที่ปฏิบัติงาน 3 หน่วยงาน ดังนี้

ก. อาคารเครื่องมือ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สถานที่ปฏิบัติงานหลักของโครงการที่ดำเนินการประสานงานทั้งโครงการ ดำเนินการขั้นตอนการแยกเชื้อราที่อยู่ในพืชป่าร่วมกับผู้ร่วมวิจัยสังกัดกรมป่าไม้ การวิเคราะห์ชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อราชนิดเด่นที่พบด้วยการศึกษาสารพันธุกรรมจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Ribosomal RNA gene การทดลองผลิตสารออกฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งจากเชื้อราที่คัดแยกได้ การสกัดสารที่ผลิตจากเชื้อราเพื่อส่งทดสอบความเป็นพิษกับเซลล์มะเร็ง ณ สถาบันมะเร็งแห่งชาติ การสรุปผลการวิจัยทั้งเชื้อรา Endophytes พืชอาศัย และผลของสารสกัดที่ได้จากเชื้อราและพืชที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งและที่เป็นพิษและไม่เป็นพิษกับเซลล์ปกติ

ข. สำนักวิจัยการจัดการป่าไม้และผลิตผลป่าไม้ กรมป่าไม้

ดร.สุรางค์ เธียรหิรัญ ผู้ร่วมวิจัยสังกัดสำนักวิจัยการจัดการป่าไม้และผลิตผลป่าไม้ กรมป่าไม้ รับผิดชอบการดำเนินงานในขั้นตอนการวิเคราะห์ชนิดของพืชในเบื้องต้น การแยกเชื้อราที่อยู่ในพืช (แบ่งภาระงานโดยแยกชนิดของตัวอย่างพืชหรือพืชชนิดเดียวกันแต่ได้จากต่างแหล่งกัน กับผู้ร่วมวิจัยสังกัดมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี) การวิเคราะห์ชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อราโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (รวมทั้งไอโซเลทของเชื้อราที่ได้จากคณะผู้วิจัยสังกัดมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี) และช่วยทดลองผลิตสารออกฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งจากเชื้อราที่แยกได้

ค. งานวิจัยสมุนไพร กลุ่มงานวิจัย สถาบันมะเร็งแห่งชาติ

ดร.ผ่องพรรณ ศิริพงษ์ ผู้ร่วมวิจัยสังกัดงานวิจัยสมุนไพร กลุ่มงานวิจัย สถาบันมะเร็งแห่งชาติ ปฏิบัติงานในขั้นตอนการวิเคราะห์ชนิดของพืชในเบื้องต้น การสกัดและทดสอบความเป็นพิษของสารที่ผลิตทั้งจากพืชและเชื้อราต่อเซลล์มะเร็ง และการวิเคราะห์ผลของสารสกัดที่ได้จากเชื้อราและพืชที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งและที่เป็นพิษและไม่เป็นพิษกับเซลล์ปกติ

โดยภาพรวมการดำเนินงานของโครงการใช้ครุภัณฑ์และวัสดุ-อุปกรณ์หลัก และมีวิธีดำเนินการดังนี้

2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัย

2.1.1 ครุภัณฑ์

ครุภัณฑ์หลักที่ใช้มีดังนี้ หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave; Hirayama, Hirayama Manufacturing Corp., Japan) ตู้อบไอร้อน (Hot air oven; 1375FX Shel Lab, Sheldon Manufacturing, Inc., U.S.A.) ตู้เขี่ย

จุลินทรีย์ (Laminar flow hood, Caireb Clen Air, The Netherlands) ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 25 และ 30 องศาเซลเซียส (Shel Lab, Sheldon Manufacturing, Inc., U.S.A.) ตู้ควบคุมอุณหภูมิต่ำ 4-12 องศาเซลเซียส (FOC225I Velp® Scientific, Progen Scientific Ltd., U.K.) ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส (HLLE-370 Heto, Heto-Holten, Denmark) เครื่องชั่งละเอียด (Analytical balance, TC-205, Denver Instrument Company, Japan) เครื่องชั่งหยาบ (Pan balance, LB3200D Sartorius, Sartorius AG Göttingen, Germany) เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (CCMD 510 pH and conductivity meter, WPA, England) เครื่องระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporator, Büchi, Labortechnik AG, Switzerland) กล้องจุลทรรศน์ชนิดที่ใช้แสง (Light microscope, Olympus BX51, Olympus Optical Co., Ltd., Japan) กล้องถ่ายภาพภาคสนาม (Olympus, Camedia, Olympus Optical Co., Ltd., Japan) อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath, 1245PC Shel Lab, Sheldon Manufacturing Inc., U.S.A.) เครื่องกวนแม่เหล็ก (Magnetic stirrer, C-MAG HS 7 IKAMAG®, IKA®-WERKE GMBH & CO. KG, Germany) เครื่องควบคุมอุณหภูมิเพื่อเพิ่มจำนวน DNA (GeneAmp PCR System; Px2 Thermal Cycler, Thermo Electron Corporation, U.S.A.), Electrophoresis apparatus (MiNi SUB™DNA Cell, BIO-RAD, Italy), Freeze Dryer (Heto Dry winner:DW 3, Denmark), Microcentrifuge (Strip-Fuge™, Clover Labs, Taiwan), Micropipette sets (Nichipet EX, Nichiryo, Japan), High speed refrigerated centrifuge (Avanti 26 XPI, Beckman Coulter, Beckman Coulter, Inc., U.S.A.), Spectrophotometer UV/VISIBLE GBC 916, Scientific Equipment Ltd., Australia), Vortex mixer (Finevortex, FinePCR®, Korea) และ UV transilluminator พร้อมกล้องถ่ายรูป (SynGene, Synopics Ltd., U.S.A.) เครื่องมือที่ใช้เลี้ยงและทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากเซลล์ราและพืชต่อเซลล์มะเร็งที่ติดตั้ง ณ งานสมุนไพร สถาบันมะเร็งแห่งชาติ ขั้นตอนการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Ribosomal RNA gene ของจุลินทรีย์ด้วยการจ้างเหมาบริการวิเคราะห์ ณ ห้องปฏิบัติการ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร จังหวัดปทุมธานี และ Macrogen Inc. (Seoul, Korea)

2.1.2 วัสดุ

วัสดุที่ใช้มีดังต่อไปนี้ เครื่องแก้วพื้นฐานสำหรับปฏิบัติการจุลชีววิทยา หลอดแก้วและพลาสติกชนิดทนต่อการแช่แข็งสำหรับเก็บเซลล์จุลินทรีย์ ขวดฝาเกลียวขนาดบรรจุ 250 และ 500 มิลลิลิตร ที่ทนความร้อนในการนึ่งฆ่าเชื้อ Centrifuge tubes ขนาดบรรจุ 50 มิลลิลิตร Microcentrifuge tubes, Micropipette tips สารที่ใช้เตรียมอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ ได้แก่ Malt extract (Himedia, HiMedia Laboratories, India), Glucose (Carlo Erba Reagenti, Italy), Proteose peptone (Himedia), Glycerol (MERCK, Merck KGaA, Germany), Potato dextrose agar (PDA, Himedia) และ Yeast extract (Himedia) สารเคมีระดับคุณภาพวิเคราะห์ (Analytical grade) ได้แก่ Tri-ammonium citrate (Carlo Erba Reagenti), Ammonium sulphate (Carlo Erba Reagenti), Bromophenol blue (USB™, Amersham Life Science, England), Calcium carbonate (Carlo Erba Reagenti), Magnesium sulphate monohydrate (Fluka BioChemika, Germany), Manganese sulphate monohydrate (Carlo Erba Reagenti), Di-potassium

hydrogen phosphate (Carlo Erba Reagenti), Sodium acetate (Carlo Erba Reagenti), Sodium chloride (MERCK), Sucrose (Carlo Erba Reagenti) และ Urea (Carlo Erba Reagenti) สารที่ใช้เตรียมเซลล์มะเร็งและทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อเซลล์มะเร็ง สารเพื่อการสกัดและเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม (DNA) ของจุลินทรีย์ด้วยเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลได้แก่ Agarose (SeaKem® LE Agarose for gel electrophoresis, Lonza Rockland, Inc., U.S.A.), 10X PCR buffer (Invitrogen, Invitrogen Life Technologies, U.S.A.), Ethidium bromide (ACROS ORGANICS), Ethylenediamine tetra-acetic acid (EDTA, Sigma®, Sigma Chemical Co., U.S.A.), Ethanol (MERCK, E. Merck, Germany), Isopropyl alcohol (MERCK, E. Merck), Magnesium chloride (Carlo Erba Reagenti), และสารชีวภาพ เช่น Pronase (Invitrogen), Proteinase K (Invitrogen), Ribonuclease (Invitrogen), *Taq* DNA polymerase (Invitrogen), Oligonucleotide primers (The Science Pacific Company Ltd., Thailand) และ Nucleoside triphosphates (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; Perkin Elmer, Applied Biosystems Inc., U.S.A.)

2.2 วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษาเชื้อรากลุ่ม Endophytes ที่อยู่ในพืชป่าของโครงการวิจัยนี้ วางแผนเลือกศึกษาพืชที่พบการเจริญในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยและที่ชาวชนบทหรือชาวบ้านนำมาใช้ประโยชน์ในแง่ยารักษาโรคมะเร็งและโรคอื่นๆ ตามภูมิปัญญาพื้นบ้านอยู่แล้ว และเนื่องจากประชาชนส่วนหนึ่งอยู่ห่างไกลจากตัวเมืองหรือมีรายได้ไม่เพียงพอกับการรักษาด้วยแพทย์แผนปัจจุบัน ประกอบกับความศรัทธาในหมอชาวบ้านและหมอพระซึ่งให้ผลการรักษาที่น่าเชื่อถือแล้วกับผู้ป่วยหลายๆ ราย พืชป่าหลายชนิดจึงมีความสำคัญมาก โดยการศึกษานี้จะแยกหาเชื้อราที่อยู่ในพืชอาศัย ระบุชนิดของเชื้อราที่พบ และทดสอบความเป็นพิษของสารที่ผลิตทั้งจากพืชและเชื้อราต่อเซลล์มะเร็ง วิธีดำเนินการวิจัยของโครงการนี้ประกอบด้วยขั้นตอนหลัก ดังต่อไปนี้

2.2.1 การวิจัยในส่วนของพืชป่า

2.2.1.1 การรวบรวมตัวอย่างพืชป่าเป้าหมาย

รวบรวมตัวอย่างพืชป่าเป้าหมาย 2 ชนิดจากพืช 4 กลุ่มหลัก จากที่ได้มีการสำรวจพื้นที่ที่มีการเจริญของพืชป่าในจังหวัดนครราชสีมาและจังหวัดใกล้เคียงในภาคตะวันออกเฉียงเหนือในเบื้องต้นแล้ว ซึ่งตัวอย่างพืชจะเป็นพืชชนิดใดนั้นขึ้นกับตัวอย่างที่สามารถพบได้ในช่วงเวลาของการดำเนินการวิจัย และในพืชชนิดเดียวกันจะรวบรวมจากต่างพื้นที่ที่พบ จำนวนชนิดละ 3 ซ้ำ

2.2.1.2 การวิเคราะห์ชนิดของพืชในเบื้องต้นตามลักษณะทางสัณฐาน

พืช 4 กลุ่มหลัก เพื่อเลือกศึกษาจำนวน 2 ชนิด มีดังนี้

ก) พืชในวงศ์ Araceae ซึ่งชนิดที่อยู่ในความสนใจเป็นพืชที่พบการเจริญเด่นในป่า

ของพื้นที่เขตอำเภอปักธงชัยและวังน้ำเขียว จังหวัดนครราชสีมา ที่ชาวบ้านเรียกว่า วานขันหมาก และนำผลมาบริโภคกันอย่างกว้างขวางด้วยความเชื่อว่ารักษาโรคได้ครอบจักรวาล แต่ขาดข้อมูลทางวิชาการ

ข) พืชประเภทไม้เถา เป็นไม้เถาชนิดที่ชาวบ้านเรียกว่า เครือสี่เหลี่ยม พบได้ทั่วไปในป่าเบญจพรรณแถบจังหวัดนครราชสีมาและบุรีรัมย์ จากที่ได้สนทนากับหมอพระที่อยู่ในพื้นที่ป่าในเขตอำเภอปักธงชัยและวังน้ำเขียว จังหวัดนครราชสีมา พบว่าพืชดังกล่าวใช้รักษาโรคมะเร็งโดยตรง และใช้เพียงชนิดเดียวก็รักษาโรคได้ ทั้งนี้ได้เก็บตัวอย่างพืชและส่งตัวอย่างเพื่อขอความอนุเคราะห์ผู้เชี่ยวชาญทางด้านพฤกษศาสตร์ในการระบุชนิด ซึ่งได้ผลการระบุชนิดในเบื้องต้นเพียงเป็นพืชที่มีลักษณะแปลกไปกว่าที่มีการรายงาน ถ้าได้ติดตามการเจริญของพืชต่อเนื่องจะช่วยให้การระบุชนิดได้ถูกต้อง

ค) พืชในวงศ์ Euphorbiaceae โดยเลือกชนิดที่มีชื่อเรียกทั่วไปว่า ขันทองพยาบาท (หมากดูกหรือยางปรอก) พบทั้งที่เป็นไม้พุ่มขนาดใหญ่และไม้ยืนต้นขนาดย่อม และมีรายงานว่าเปลือกต้นมีรสเบื่อเมา มีสรรพคุณแก้โรคมะเร็ง เรื้อน คุดทะราด กลากและเกลื้อน ทำให้ฟันทน รักษาโรคตับพิการ แก้ประดง แก้พิษในกระดูก แก้โรคผิวหนัง ฆ่าพยาธิ ส่วนเนื้อไม้มีรสเบื่อเมา มีสรรพคุณแก้ลมพิษ แก้ไข้ แก้กามโรค (เกียรติ สัจจลักษณ์, 2541)

ง) พืชในวงศ์ Leguminosae เลือกศึกษาชนิดที่มีชื่อเรียกทั่วไปว่า ถ่อน หรือ ทิ้งถ่อน ซึ่งเป็นไม้ยืนต้น มีรายงานการตรวจหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในขั้นต้นจากพืชของอินเดียชนิดเดียวกับถ่อนพบว่ามีฤทธิ์ต้านมะเร็ง (Bhakuni *et al*., 1971) ส่วนสรรพคุณซึ่งเป็นข้อมูลของประเทศไทยระบุว่า รากและแก่น แก้เจ็บเอว แก้เจ็บหลัง แก้เส้นตึง แก้ท้องอืด และเปลือกต้นทำให้เจริญอาหาร แก้ธาตุพิการ (นันทวัน บุณยะประภัศร และ อรนุช โชคชัยเจริญพร, 2541)

2.2.1.3 การทดลองสกัดสารจากพืชเพื่อทดสอบฤทธิ์ของสารต่อเซลล์มะเร็ง

สกัดสารสกัดหยาบ (Crude extract) จากส่วนต่างๆ ของพืช ได้แก่ ใบ ลำต้น (แยกส่วนเปลือก) และราก โดยล้างทำความสะอาดตัวอย่างพืชผึ่งให้แห้ง จากนั้นหั่นเป็นชิ้นเล็กให้มีขนาดความยาวประมาณ 0.5-1.0 เซนติเมตร แล้วบดให้ละเอียดด้วยเครื่องตีป่น (Blender) จากนั้นสกัดสารออกฤทธิ์จากตัวอย่างสดที่บดแล้วด้วยวิธีหมัก (Maceration) ใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด เรียงลำดับความมีขั้วน้อยและมากขึ้นเป็นลำดับ คือ เฮกเซน (Hexane) เอทานอล (Ethanol) 95% และเมทานอล (Methanol) โดยชั่งตัวอย่างที่บดแล้ว 5-25 กรัม ใส่ลงใน Erlenmeyer flask (ขนาดบรรจุ 250 มิลลิลิตร) เติมตัวทำละลายแต่ละชนิดในปริมาตร 100 มิลลิลิตร (อัตราส่วนของ ตัวอย่างต่อตัวทำละลายเท่ากับ 1 ต่อ 4) ลงในแต่ละ Flask แล้วนำมากรองเอาส่วนของเหลวออกจากกาก ด้วยผ้าขาวบาง และกรองซ้ำด้วยกระดาษกรอง (Whatman No.1) นำสารสกัดที่ได้ เข้าเครื่องระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporator, Büchi, Labortechnik AG, Switzerland) เพื่อแยกตัวทำละลายออก ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส แล้วจึงละลายด้วยน้ำหรือ Dimethylsulphoxied (DMSO) ได้สารในรูปแบบของสารสกัดหยาบ (Crude extract) เพื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งในเบื้องต้น

2.2.2 การวิจัยในส่วนของเชื้อราที่อยู่ในพืชป่า

2.2.2.1 การแยก เพาะเลี้ยง และจัดจำแนกชนิดของเชื้อรา

แยกเชื้อราที่อยู่ในส่วนต่างๆ เช่น ใบ ผล ลำต้น หรือราก ของพืชป่าที่ไม่เป็นโรคหรือแมลงทำลาย โดยวิธี Triple surface sterilization ด้วยการตัดชิ้นส่วนของพืชให้ได้ยาวประมาณ 1 เซนติเมตร แช่ส่วนของพืชในแอลกอฮอล์ (Ethanol) 70% นาน 1 นาที จากนั้นนำไปแช่ Sodium hypochlorite (NaOCl, 2%) นาน 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง และแอลกอฮอล์ (95%) นาน 30 วินาที ตัดชิ้นส่วนของพืชให้ได้ขนาด 4 ตารางมิลลิเมตร วางชิ้นส่วนบนอาหาร Potato dextrose agar (PDA) (ภาคผนวก ข1) ที่มี ส่วนผสมของ Roes bengal 30 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มให้เชื้อราเจริญที่อุณหภูมิห้อง 25 องศาเซลเซียส เมื่อเส้นใยของเชื้อราเจริญออกมาจากเนื้อเยื่อของพืช แยกให้ได้เชื้อราบริสุทธิ์โดยวิธี Hyphal tip isolation และเก็บรา Endophytes ที่แยกได้ (ข้อ 2.2.2.2) วิเคราะห์ชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อราโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานและการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Arnold *et al*., 2000) และการศึกษาสารพันธุกรรมโดยหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Ribosomal RNA gene ของเชื้อราไอโซเลทเด่นและที่ยากต่อการระบุชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐาน รวมถึงไอโซเลทที่ให้ผลการทดสอบของสารสกัดที่มีแนวโน้มในการใช้ประโยชน์ในอนาคต ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์จะดำเนินการตามขั้นตอนที่ระบุใน White *et al*. (1990), Dunham *et al.* (2003), Gardes and Bruns (1993) และ Moncalvo *et al*. (2000a, 2000b) ดังนี้

1) การสกัดแยก Genomic DNA จากเส้นใยเชื้อรา

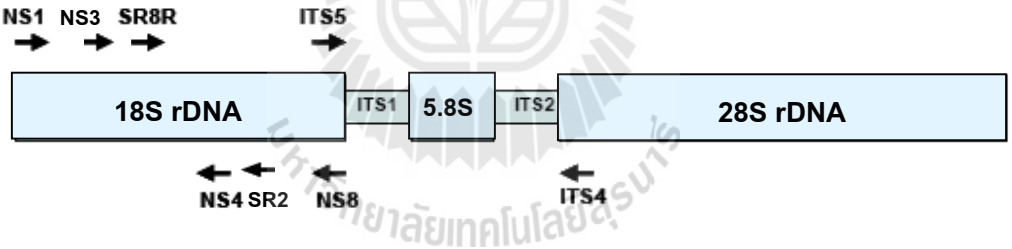
นำเส้นใยของเชื้อราบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้ประมาณ 0.5 กรัม ลงในหลอดขนาดบรรจุ 1.5 มิลลิลิตร บดตัวอย่างเยือกแข็ง (แช่ในไนโตรเจนเหลว) ให้แตกด้วยแท่งแก้ว เติม Lysis buffer (ภาคผนวก ก4) 500 ไมโครลิตร เติม Chloroform:Isoamyl alcohol (24:1) 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้ว ปั่นแยกที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนใสด้านบนปริมาตรประมาณ 400 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดบรรจุหลอดใหม่ เติม 0.6 เท่าของ Isopropanol พลิกกลับหลอดผสมกันเบาๆ ปั่นแยกที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอน DNA ด้วย Ethanol (70%) 500 ไมโครลิตร ทำให้ตะกอนแห้งที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 30 นาที ละลายตะกอนด้วย TE buffer (ภาคผนวก ก7) หรือ Milli-Q water 50 ไมโครลิตร ทำความสะอาด DNA 100 ไมโครลิตร ด้วย RNase A solution (2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) 3 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดขึ้นลง บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เติม Proteinase K solution (2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดขึ้นลง บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เติม Chloroform:Isoamyl alcohol (24:1) 100 ไมโครลิตร ปั่นแยกที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนใสด้านบนใส่หลอดบรรจุใหม่ เติม 3M Sodium acetate (pH 5.2) 4 ไมโครลิตร และ Absolute ethanol (-20 องศาเซลเซียส) 150 ไมโครลิตร ต่อปริมาตรส่วนใสที่เก็บได้ 30 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดขึ้นลงเบาๆ สังเกตการจับกลุ่มของ

เส้นตะกอนสีขาวในหลอดซึ่งเป็นตะกอน DNA จากนั้นนำไปปั่นแยกที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส ล้างและละลายตะกอนด้วยวิธีการเช่นเดียวกับที่ระบุข้างต้น

ตรวจสอบ DNA ด้วย Agarose gel electrophoresis (Electrophoresis ใช้ 0.8% Agarose (SeaKem® LE Agarose, Lonza Rockland, Inc.) ใช้ของเหลวที่มี DNA ปริมาณ 2ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วย TE buffer ให้ได้ 10 ไมโครลิตร ผสมกับ Loading buffer (ภาคผนวก ก2) 2 ไมโครลิตร บรรจุส่วนผสมลงในช่อง (Well) ของ Agarose gel ในสารละลาย Tris-Borate buffer (TBE, ภาคผนวก ก9) แยกชิ้นของ DNA ตามขนาดด้วยกระแสไฟฟ้าขนาด 100 โวลท์ ตรวจหาตำแหน่งของแถบ (band) DNA โดยย้อม Agarose gel ด้วย Ethidium bromide (เข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นเวลา 15 นาที ตรวจดูการเรืองแสงของแถบ DNA ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ที่ความยาวช่วงคลื่น 295 นาโนเมตร ของ UV Transilluminator บันทึกภาพผลที่ได้

2) การเพิ่มปริมาณจีน (Gene) เป้าหมายและการแยก PCR product ให้บริสุทธิ์

จีนเป้าหมายที่ต้องการเพิ่มปริมาณคือ Ribosomal RNA gene เน้น 18S Ribosomal RNA gene โดยใช้ Primers ที่จำเพาะตาม White *et al*. (1990), Gardes and Bruns (1993), Moncalvo *et al*. (2000a, 2000b), Vilgalys and Hester (1990) และกระบวนการ Polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ Primers NS1, NS3 และ SR2 (รูปที่ 2.1 และตารางที่ 2.1)



รูปที่ 2.1 แผนผังทิศทางของ Primers สำหรับการเพิ่มปริมาณ DNA ของเชื้อราในส่วน 18S Ribosomal RNA gene โดยหัวลูกศรแสดงทิศทางที่ปลาย 3'
ที่มา: ดัดแปลงจาก Kwang and Kim (1999) และ Vilgalys and Hester (1990)

ตารางที่ 2.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PCR Primers ที่ใช้เพิ่มปริมาณ 18S Ribosomal RNA gene ของเชื้อรา

Name	Sequence (5'-3')	Target region[a]	Reference
NS1	GTAGTCATATGCTTGTCTC	SSU 20-38	White *et al*. 1990
SR2	CGGCCATGCACCACC	SSU 1277-1263	Vilgalys and Hester (1990)
SR8R	GAACCAGGACTTTTACCTT	SSU 732-749	Vilgalys and Hester (1990)
NS3	GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC	SSU 637-617	White *et al*. (1990)
NS4	CTTCCGTCAATTCCTTTAAG	SSU 1150-1131	White *et al*. (1990)
NS8	TCCGCAGGTTCACCTACGGA	SSU 1788-1768	White *et al*. (1990)

หมายเหตุ: [a] *Saccharomyces cerevisiae* numbering; SSU, Small-subunit ribosomal RNA gene

เตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยา (Reaction mix) ปริมาตรสุดท้าย 50 ไมโครลิตร ใน PCR tube ประกอบด้วย 10X PCR buffer (Invitrogen) 2.5 ไมโครลิตร 50mM $MgCl_2$ 2 ไมโครลิตร 2mM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP และ dTTP) 0.5 ไมโครลิตร 10μM Forward primer 0.5 ไมโครลิตร 10μM Revers primer 0.5 ไมโครลิตร *Taq* polymerase (0.75 unit, Invitrogen) 0.15 ไมโครลิตร และ Genomic DNA 100 นาโนกรัม ปรับปริมาตรให้ได้ 50 ไมโครลิตร ด้วย Milli Q water เพิ่มจำนวน DNA ในเครื่อง Programmable DNA Thermal Cycler ที่อุณหภูมิและเวลา ดังนี้ ขั้นตอนที่ 1 อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 1 รอบ ขั้นตอนที่ 2 อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที Annealing ที่อุณหภูมิเท่ากันด้วย PCR primers (NS1/SR2 และ NS3/SR2) คือที่ 53 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.30 นาที และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที รวม 35 รอบ เมื่อครบรอบสุดท้ายตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที วิเคราะห์ผลิตผล (PCR products) ที่ได้ด้วย Agarose gel electrophoresis (1% Agarose) ตามวิธีการเช่นเดียวกับที่ระบุข้างต้น

3) การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Ribosomal RNA gene

หาลำดับนิวคลิโอไทด์ของ Ribosomal RNA gene เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อราที่มีอยู่ในฐานข้อมูล Nueleotide sequence database ของ GenBank หรือ National Center for Biotechnological Information (NCBI) ประเทศสหรัฐอเมริกา http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi โดยใช้ Blast version 2.2.9 program และตรวจสอบเพื่อให้ได้ Alignment ของ DNA sequence ที่เหมาะสมด้วย BioEdit Program (North Carolina State University, U.S.A.)

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Ribosomal RNA gene ของเชื้อรา Endophytes ชนิดเด่นที่คัดเลือกด้วยการจ้างเหมาบริการวิเคราะห์ ณ ห้องปฏิบัติการ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร จังหวัดปทุมธานี และ Macrogen Inc. (Seoul, Korea)

2.2.2.2 การจัดเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เชื้อรา

จัดเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เชื้อรา (Culture collection) ด้วยวิธีมาตรฐานของการเก็บเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์ให้มีชีวิตรอดได้นาน โดยยังมีความบริสุทธิ์และไม่เปลี่ยนแปลงลักษณะทางพันธุกรรม การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์โดยเก็บรักษาด้วย 2 วิธี คือ เก็บในสภาพแห้งบนกระดาษกรองและการเก็บรักษาในกลีเซอรอล 10% ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นวิธีการเก็บรักษาที่ดี (Smith, 1988; Fong et al., 2000) ดังนี้

1) การเก็บรักษาเชื้อราในสภาพแห้งบนกระดาษกรอง

เก็บรักษาเชื้อราในสภาพแห้งบนกระดาษกรองปลอดเชื้อ โดยตัดกระดาษกรอง Whatman No.1 ให้เป็นชิ้นขนาดประมาณ 2×0.5 เซนติเมตร บรรจุในจานเลี้ยงเชื้อ หุ้มด้วย Aluminum foil และเตรียม Microcentrifuge tube (1.5 มิลลิลิตร) ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ เลี้ยงเชื้อราอายุ 5-7 วัน บนอาหาร PDA ใช้เข็มเขี่ยลนไฟฆ่าเชื้อ เขี่ยชิ้นวุ้นที่มีราเจริญวางตรงกลางจานอาหาร PDA จากนั้นใช้ ปากคีบลนไฟฆ่าเชื้อคีบกระดาษกรองวางรอบๆ ชิ้นวุ้นที่มีเชื้อเจริญอยู่ ประมาณ 8-10 ชิ้น บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จนราสร้างเส้นใยคลุมชิ้นกระดาษกรองและมีการสร้างกลุ่มสปอร์ ใช้ปากคีบลนไฟฆ่าเชื้อลอกเฉพาะชิ้นกระดาษกรองที่มีราปกคลุมไปวางในจาน ปิดฝาจาน นำไปวางไว้ในโถดูดความชื้น (Desiccator) ให้กระดาษกรองแห้งเป็นเวลาประมาณ 2 วัน แล้วใช้ปากคีบที่ฆ่าเชื้อแล้วคีบกระดาษกรองใส่ลงใน Microcentrifuge tube เก็บที่อุณหภูมิ 12 องศาเซลเซียส ตรวจสอบการมีชีวิตหลังเก็บรักษาทุก 6 เดือน โดยใช้ปากคีบที่ฆ่าเชื้อแล้วคีบกระดาษกรองย้ายจาก Microcentrifuge tube ที่เก็บรักษาไว้ไปเลี้ยงบน อาหาร PDA ในจานเลี้ยงเชื้อ

2) การเก็บรักษาเชื้อราในกลีเซอรอล 10% ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

เตรียมกลีเซอรอล 10% นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 20 นาที ใช้ Cork borer No.2 ลนไฟฆ่าเชื้อ เจาะเชื้อราที่เจริญบน PDA อายุ 7 วัน ย้ายชิ้นวุ้นที่เจาะแล้วใส่ลงใน Cryotube ใส่กลีเซอรอล 10% จนท่วมชิ้นวุ้น เก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ตรวจสอบการมีชีวิตหลังเก็บรักษาทุก 6 เดือน โดยนำหลอด Cryotube ที่เก็บรักษาไว้ออกจากตู้แช่แข็ง แช่ในน้ำอุ่น 37 องศาเซลเซียส แกว่งให้น้ำแข็งในหลอดละลายอย่างรวดเร็ว ใช้สำลีจุ่มแอลกอฮอล์ 70% เช็ดหลอด เปิดฝาหลอด นำชิ้นวุ้นออกมาวางบนกระดาษกรองปลอดเชื้อ แล้ววางบนอาหาร PDA ในจานเลี้ยงเชื้อ ตรวจดูการเจริญของเชื้อรา

2.2.2.3 การทดลองผลิตสารออกฤทธิ์จากเชื้อรา

ทดลองผลิตสารออกฤทธิ์จากเชื้อรา ตามขั้นตอนดังนี้

1) เลี้ยงเชื้อราอายุ 3-5 วัน บนอาหาร PDA ใช้ Cork borer No.2 ลนไฟฆ่าเชื้อ เจาะเชื้อราที่เจริญบน PDA ย้ายชิ้นวุ้นที่เจาะแล้ว 2 ชิ้น ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว Malt extract broth (ภาคผนวก ข3) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใน Erlenmeyer flask ขนาดบรรจุ 250 มิลลิลิตร จำนวนเชื้อละ 4 ซ้ำ แบบ Batch culture ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-5 สัปดาห์ โดยสังเกตจากลักษณะและความสามารถในการเจริญ เชื้อราบางสายพันธุ์มีความสามารถในการเจริญได้เร็ว เมื่อเลี้ยงในลักษณะ Batch culture ไประยะเวลาหนึ่ง อาหารเริ่มหมดหรือมีการสะสมเมแทบอไลท์มากขึ้น เซลล์จะเริ่มตาย ดังนั้นจึงควรเก็บเกี่ยวผลผลิตเร็วกว่าเชื้อราบางสายพันธุ์ที่เจริญได้ช้า

2) เก็บเกี่ยวแยกส่วนเส้นใยและอาหารเหลวภายหลังการเลี้ยงเชื้อด้วยการกรองและปั่นแยกเซลล์หรือเส้นใยออกจากอาหาร

3) เตรียมผงแห้งของเส้นใยและอาหารเหลวด้วยเทคนิคการทำแห้งเยือกแข็ง (Lyophilization) นำสารผงแห้งของเส้นใยนั้นไปทดสอบสารออกฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง โดยบดและชั่งตัวอย่างที่บดแล้ว 5-25 กรัม ใส่ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมตัวทำละลายเอทานอล (Ethanol) 95% ในปริมาตร 100 มิลลิลิตร (อัตราส่วนของ ตัวอย่างต่อตัวทำละลายเท่ากับ 1 ต่อ 4) ลงในแต่ละ Flask นำไปเข้าเครื่องเขย่า ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 วัน กรองเอาส่วนของเหลวออกจากกาก ด้วยผ้าขาวบาง และกรองซ้ำด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 นำสารสกัดที่ได้ เข้าเครื่องระเหยตัวทำละลาย (Rotary evaporator, Büchi) เพื่อทำการแยกตัวทำละลายออก โดยใช้อุณหภูมิการระเหย 45 องศาเซลเซียส แล้วจึงละลายด้วย Deionized water หรือ Dimethylsulphoxied (DMSO) สำหรับผงแห้งจากอาหารเลี้ยงเชื้อ ละลายใน Deionized water หรือ DMSO ได้สารในรูปแบบของสารสกัดหยาบ (Crude extract) เพื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งในเบื้องต้น

2.2.3 การศึกษาความเป็นพิษของสารที่ผลิตจากเชื้อราและจากพืชต่อเซลล์มะเร็ง

ทดสอบความเป็นพิษของสารเล็กตินต่อเซลล์มะเร็งที่เลี้ยงไว้ในหลอดทดลอง (*in vitro*) ด้วยวิธี MTT colorimetric assay ตาม Mosmann (1983) และ Wilson (2000) ที่อาศัยปฏิกิริยาในไมโตคอนเดรียรีดิวซ์สาร MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) ซึ่งเป็น Tetrazole ชนิดหนึ่งที่มีสีเหลือง เมื่อถูกรีดิวซ์เกิดเป็นสีม่วงของ Formazan ในไมโตคอนเดรียของเซลล์สิ่งมีชีวิต เติม Solubilization solution (ใช้ Dimethyl sulfoxide ในสารละลาย Hydrochloric acid) เพื่อละลายสารสีม่วงที่ไม่ละลายที่เกิดขึ้น วัดค่าการดูดกลืนแสงของสีในสารละลายนี้ที่ความยาวแสง 500 และ 600 นาโนเมตร โดยใช้ Spectrophotometer

เซลล์มะเร็งที่ใช้ในการทดสอบเป็นเซลล์มะเร็งของคนที่พบได้ง่ายในประเทศไทย 2 ชนิด คือ เซลล์มะเร็งปากมดลูก (Human cervical carcinoma cell line, HeLa) และเซลล์มะเร็งเยื่อบุช่องปาก

(Human epidermoid carcinoma cell line, KB) จากเซลล์มะเร็ง 6 ชนิด ซึ่งเป็นเซลล์จากมะเร็งที่พบมากและกำลังเป็นปัญหาต่อการรักษาผู้ป่วยในประเทศไทย คือ (1) มะเร็งเยื่อบุช่องปาก (Human epidermoid carcinoma, KB) (2) มะเร็งเต้านม (Human breast adenocarcinoma, MCF-7) (3) มะเร็งปอด (Human lung carcinoma, A549) (4) มะเร็งตับ (Human hepatocellular carcinoma, Hep-G2) (5) มะเร็งปากมดลูก (Human cervical carcinoma, HeLa) และ (6) มะเร็งลำไส้ (Human colon carcinoma, HT-29) พร้อมทั้งเซลล์ปกติ 1 ชนิด คือ เซลล์ไตของลิง (African green monkey kidney epithelial cell line, Vero) แทนเซลล์ปกติของคน (Normal human fibroblast cell) โดยเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการ Trypsinized แล้วต่อใน Microtiter plate (130×85×15 มิลลิเมตร) ที่ประกอบด้วย 8×12 wells ลักษณะ Flat bottom ในตู้คาร์บอนไดออกไซด์ (5% CO_2) ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในแต่ละหลุม (well) ของ Microtiter plate มีความหนาแน่นของเซลล์ประมาณ 3,000 เซลล์ ต่อ 90 ไมโครลิตรต่อหลุม ปิเปตสารสกัดที่เจือจางเป็นลำดับแบบ Ten-fold ด้วย Phosphate buffer saline (PBS pH 7.4; ภาคผนวก ก8) สารสกัดละ 10 ไมโครลิตร ลงในหลุมของ Microtiter plate ที่เลี้ยงเซลล์ไว้ ทำการทดลองหกซ้ำ บ่มในตู้ที่มี 5% CO_2 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ถ่ายอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ออก เติมสารละลาย MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปบ่มในตู้ 5% CO_2 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นดูดสารละลาย MTT ออก แล้วเติมสารละลาย DMSO (Dimethyl sulfoxide) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microtiter plate reader ชุดควบคุมที่ไม่มีสารสกัดใช้เป็น Negative control และชุดควบคุมที่มี Adriamycin 100 ไมโครโมลาร์ เป็น Positive control โดยค่า IC_{50} (50% Inhibition concentration) คือ ค่าความเข้มข้นของสารที่ใช้ทดสอบที่สามารถทำลายเซลล์มะเร็งได้ครึ่งหนึ่งเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งค่า IC_{50} มาตรฐานของสารสกัดหยาบที่สามารถทำลาย/ยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็งต้องมีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า IC_{50} มาตรฐานของสารบริสุทธิ์ที่สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็งต้องมีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2.2.4 สรุปผลการวิจัย

สรุปผลการวิจัยทั้งเชื้อรา Endophytes พืชอาศัย และผลของสารสกัดที่ได้จากเชื้อราและพืชที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งและที่เป็นพิษและไม่เป็นพิษกับเซลล์ปกติของคน และเผยแพร่ผลงานวิจัยเบื้องต้นนี้ในวงการวิชาการและประชาชนผู้ใช้ประโยชน์

บทที่ 3
ผลและอภิปรายผลการวิจัย

การดำเนินงานของโครงการวิจัย เชื้อราที่อยู่ในพืชป่าและความเป็นพิษของสารจากเชื้อราและพืชต่อเซลล์มะเร็ง ได้ผลดังนี้

3.1 การวิจัยในส่วนของพืชป่า

3.1.1 การรวบรวมตัวอย่างพืชป่าเป้าหมาย

จากแผนการดำเนินงานต้องการตัวอย่างพืชป่าเป้าหมาย 2 ชนิด จากพืช 4 กลุ่มหลัก ที่ได้สำรวจพื้นที่จังหวัดนครราชสีมาและจังหวัดใกล้เคียงในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยที่มีการเจริญของพืชป่าในเบื้องต้น พืชเหล่านี้พบการเจริญทั้งในและนอกเขตป่าสงวน ช่วงเวลาของการดำเนินการวิจัย รวบรวมพืชได้ 4 ชนิด คือ ว่านขันหมาก (พืชวงศ์ Araceae) เครือสี่เหลี่ยม (พืชประเภทไม้เถา) ขันทองพยาบาท (พืชในวงศ์ Euphorbiaceae) และถ่อนหรือทิ้งถ่อน (พืชในวงศ์ Leguminosae) ตามระยะการเจริญ ณ ช่วงนั้น และดำเนินการวิเคราะห์ชนิดของพืชตามลักษณะทางสัณฐานดังระบุในขั้นตอนต่อไป เพื่อเลือกพืช 2 ชนิด ศึกษาเชื้อรา Endophytes และความเข้มข้นของสารจากเชื้อราและพืชต่อเซลล์มะเร็ง

3.1.2 การวิเคราะห์ชนิดของพืชในเบื้องต้นตามลักษณะทางสัณฐาน

วิเคราะห์ชนิดของตัวอย่างพืชที่เก็บได้ในเบื้องต้นตามลักษณะทางสัณฐาน จากการเปรียบเทียบกับเอกสารอ้างอิงโดยเฉพาะอย่างยิ่ง พันธุ์ไม้ป่าเมืองไทย (เต็ม สมิตินันทน์, 2518) สมุนไพรไม้พื้นบ้าน (นันทวัน บุณยะประภัศร และ อรนุช โชคชัยเจริญพรม, 2541) และฐานข้อมูลพรรณไม้ องค์การสวนพฤกษศาสตร์ กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม ประเทศไทย และขอความอนุเคราะห์ตรวจวินิจฉัยชื่อพืชป่าที่ศึกษาจากผู้เชี่ยวชาญ คือ ศาสตราจารย์ ดร.ประนอม จันทรโณทัย ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ได้ผลการศึกษาดังนี้

1) ตัวอย่างว่านขันหมาก

พืชในวงศ์ Araceae ชนิดที่อยู่ในความสนใจเป็นพืชที่พบการเจริญเด่นในป่าเบญจพรรณพื้นที่จังหวัดนครราชสีมา ที่ชาวบ้านเรียกว่า ว่านขันหมาก มีการบริโภคผลสุกกันอย่างกว้างขวางด้วยความเชื่อว่ารักษาโรคได้ครอบจักรวาล แต่ขาดข้อมูลทางวิชาการ ตัวอย่างพืชที่เก็บรวบรวมได้มี 2 ขนาดของต้นที่เจริญเต็มวัย (ตารางที่ 3.1) คือ

ก. พืชที่มีขนาดต้นเล็ก มีความสูงโดยเฉลี่ย 45 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลางของลำต้นประมาณ 1 เซนติเมตร (รูปที่ 3.1 และ 3.2)

ข. พืชที่มีขนาดต้นใหญ่ มีความสูงโดยเฉลี่ย 60-120 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลางของลำต้น 1-2 เซนติเมตร (รูปที่ 3.3 และ 3.4)

ว่านขันหมากทั้งพืชต้นเล็กและต้นใหญ่ที่พบเป็นพืชดอกมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Aglaonema simplex* (Blume) Blume ชื่อพ้อง *Aglaonema tenuipes* Engl. ข้อมูลจากกรมป่าไม้ ระบุชื่อทั่วไปว่า พรหมตีนสูง เป็นไม้ล้มลุก **ลำต้น**ตั้งตรง สูง 35-40 เซนติเมตร กว้าง 1-1.5 เซนติเมตร **ใบ**เดี่ยว รูปไข่หรือรูปไข่แกมรูปรี กว้าง 5-7 เซนติเมตร ยาว 15-20 เซนติเมตร ปลายใบแหลม โคนใบแหลม กลม หรือเป็นรูปหัวใจ เส้นใบมองเห็นได้ชัดเจน ก้านใบกลม ยาว 5-10 เซนติเมตร โคนก้านใบแผ่แบน โอบหุ้มลำต้นไว้ **ดอก**ออกเป็นช่อ ที่ยอดหรือออกด้านข้าง มีกาบหุ้มช่อดอกรูปขอบขนาน ปลายแหลม ยาว 3.5-5.5 เซนติเมตร ประกอบด้วยจุดเล็กๆ สีขาว ช่อดอกลักษณะเป็นแท่งกลมยาว ยาวประมาณ 3.5 เซนติเมตร แบ่งเป็น 3 ส่วน ส่วนบนประกอบด้วยดอกเพศผู้ ตรงกลางเป็นดอกเพศผู้ไม่สมบูรณ์ ส่วนล่างสุดเป็นดอกเพศเมีย จำนวนดอกเพศเมียมีน้อยกว่าดอกเพศผู้ **ผล**รูปขอบขนาน ปลายแหลม กว้าง 7-10 มิลลิเมตร ยาว 12-18 มิลลิเมตร

ได้เก็บตัวอย่างพืชที่มีขนาดต้นเล็กจำนวน 4 ซ้ำ และต้นใหญ่จำนวน 3 ซ้ำ (ตารางที่ 3.1) เพื่อเลือกศึกษาเชื้อรา Endophytes และความเป็นพิษของสารจากเชื้อราและจากพืชต่อเซลล์มะเร็งของคน

2) ตัวอย่างเครือสี่เหลี่ยม

พืชประเภทไม้เถาชนิดที่ชาวบ้านเรียกว่า เครือสี่เหลี่ยม (รูปที่ 3.5) พบได้ทั่วไปในป่าเบญจพรรณแถบจังหวัดนครราชสีมาและบุรีรัมย์ ได้เก็บตัวอย่างเถา (ลำต้น) ก้านใบ และใบของเครือสี่เหลี่ยมที่พบในจังหวัดนครราชสีมาหนึ่งพื้นที่ ยังไม่สามารถระบุชนิดได้เนื่องจากพบเฉพาะระยะเป็นใบและลำต้น (เถา) ซึ่งเถามีลักษณะเป็นสี่เหลี่ยม เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.3-0.5 เซนติเมตร ใบเดี่ยวออกตรงข้ามเป็นคู่ กว้างประมาณ 4-5 เซนติเมตร ยาวประมาณ 10-12 เซนติเมตร

'เครือสี่เหลี่ยม' ที่เป็นชื่อท้องถิ่นของพืชที่พบในประเทศไทยก็มีรายงาน แต่มีลักษณะทางสัณฐานของพืชแตกต่างจากลักษณะของตัวอย่างพืชที่ทางโครงการได้เก็บมาศึกษา โดยลักษณะของพืชตามระบุในหนังสือสมุนไพรมีชื่อทั่วไปว่า เครือโงบ

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Uncaria homomalla* Miq. จัดอยู่ในวงศ์เข็ม (Rubiaceae) ชื่อท้องถิ่น เขาควายไม่ว้อง เขาควายไม่หลูบ (ลำปาง) พญาท้าวเอว (สุโขทัย) โงบ อีโงบ (ประจวบคีรีขันธ์) เกียวโซ้ (ปัตตานี) ยอน้ำ อีโงบ (ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ) เครือสี่เหลี่ยม งบ เป็นต้น **ลำต้น**จัดเป็นไม้เถาขนาดกลาง มีรูระบายอากาศตามกิ่งอ่อน **ใบ**เป็นใบเดี่ยว ออกตรงข้ามเป็นคู่สลับกัน รูปรีกว้าง รูปไข่ หรือรูปไข่แกมใบหอก ปลายใบแหลม โคนใบมน ใบมีขนาดกว้าง 5-7 เซนติเมตร และยาว 8-11 เซนติเมตร หลังใบเป็นสีเขียวเข้มเหลือบมัน ส่วนท้องใบเป็นสีขาวมีขนนุ่มแน่น เส้นใบมี 6-8 คู่ หูใบมีลักษณะแผ่มน มักพบรยางค์ที่มีลักษณะคล้ายงอออกเป็นคู่ตามข้อ **ดอก**ออกเป็นช่อกลมแน่น โดยจะออกตาม

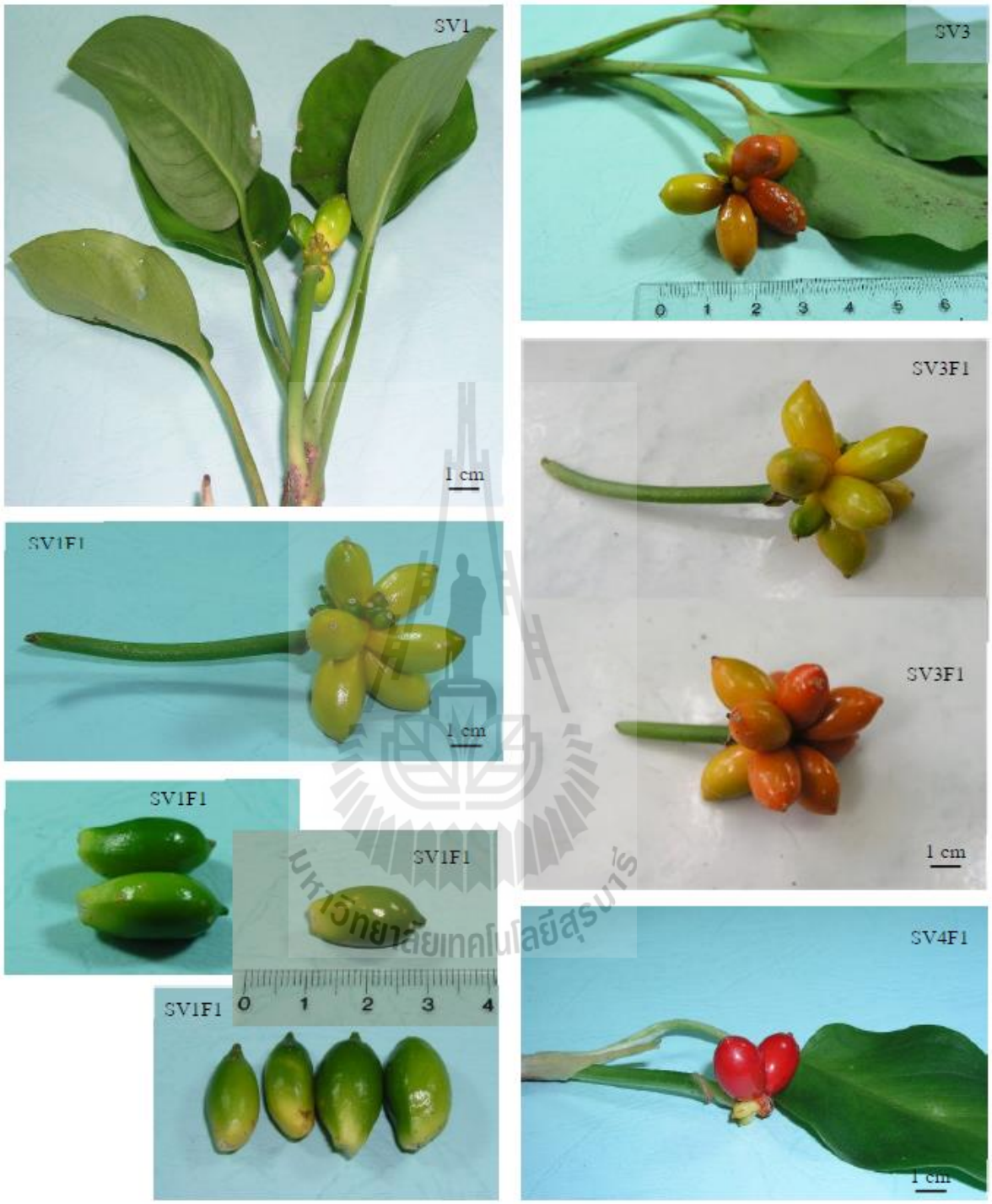
ซอกใบ ดอกย่อยมีสีขาวนวลหรืออ่อน ดอกย่อยมีลักษณะเป็นหลอดยาว ส่วนปลายแยกเป็น 5 กลีบ **ผล**เป็นกระจุกแน่น ลักษณะของผลเป็นรูปทรงกลม มีขนาด 4 เซนติเมตร

ตารางที่ 3.1 ตัวอย่างว่านขันหมากที่แยกเก็บตามส่วนของพืชเพื่อศึกษาจำนวน 42 ตัวอย่าง

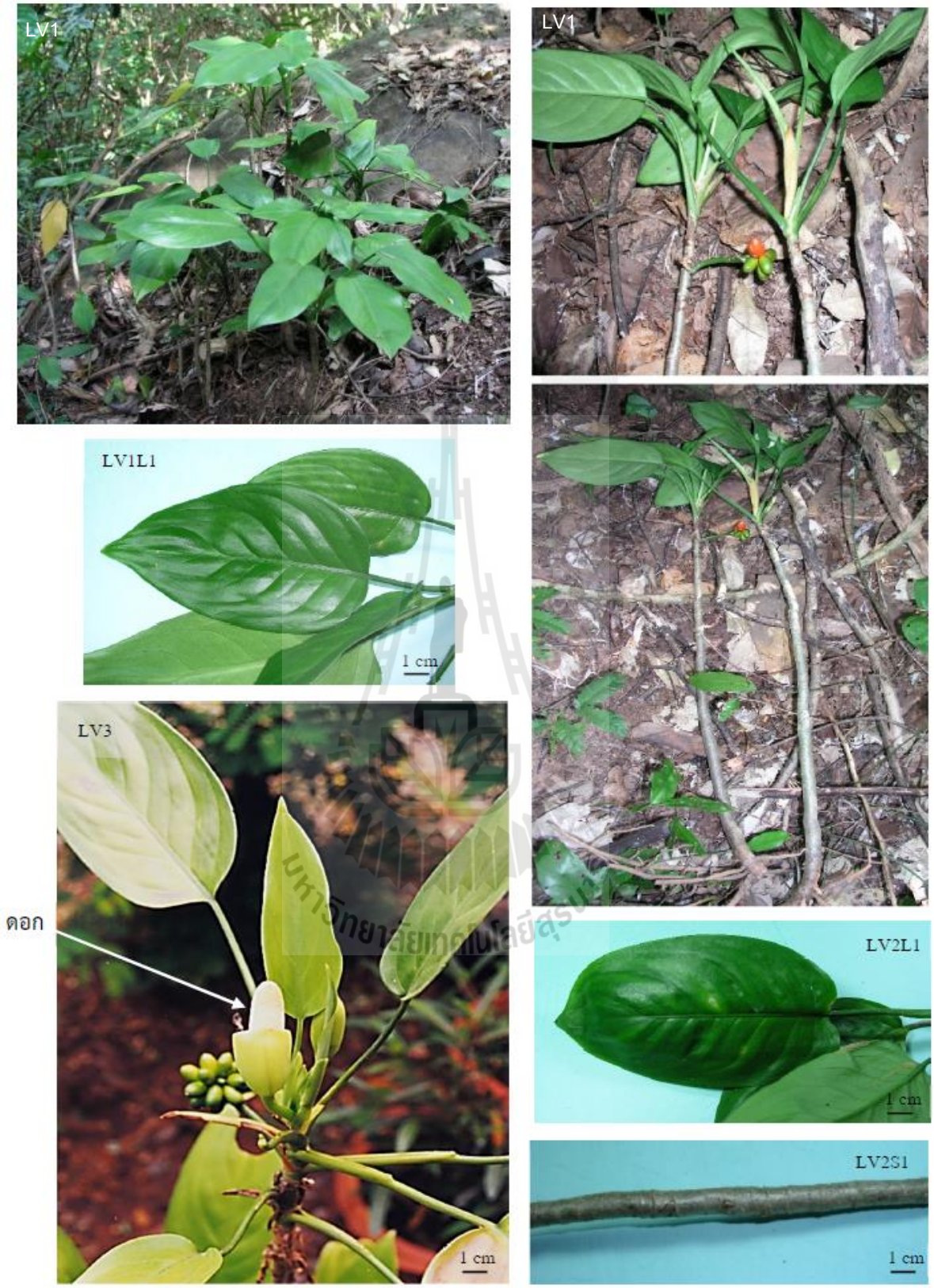
ลำดับที่	รหัส	ส่วนของพืช	ลำดับที่	รหัส	ส่วนของพืช
		ต้นเล็ก 1			**ต้นเล็ก 4** (ต่อ)
1	SV1L1	ใบ ต้นเล็ก 1	22	SV4S1	ลำต้น ต้นเล็ก 4
2	SV1F1	ผล ต้นเล็ก 1	23	SV4S1	ลำต้น ต้นเล็ก 4
3	SV1F1	ผล ต้นเล็ก 1	24	SV4R1	ราก ต้นเล็ก 4
4	SV1S1	ลำต้น ต้นเล็ก 1	25	SV4R1	ราก ต้นเล็ก 4
5	SV1S1	ลำต้น ต้นเล็ก 1			**ต้นใหญ่ 1**
6	SV1R1	ราก ต้นเล็ก 1	26	LV1L1	ใบ ต้นใหญ่ 1
		ต้นเล็ก 2	27	LV1F1	ผล ต้นใหญ่ 1
7	SV2L1	ใบ ต้นเล็ก 2	28	LV1S1	ลำต้น ต้นใหญ่ 1
8	SV2L1	ใบ ต้นเล็ก 2	29	LV1S2	ลำต้น ต้นใหญ่ 1
9	SV2S1	ลำต้น ต้นเล็ก 2	30	LV1R1	ราก ต้นใหญ่ 1
10	SV2S1	ลำต้น ต้นเล็ก 2			**ต้นใหญ่ 2**
11	SV2R1	ราก ต้นเล็ก 2	31	LV2L1	ใบ ต้นใหญ่ 2
		ต้นเล็ก 3	32	LV2F1	ผล ต้นใหญ่ 2
12	SV3L1	ใบ ต้นเล็ก 3	33	LV2S1	ลำต้น ต้นใหญ่ 2
13	SV3L1	ใบ ต้นเล็ก 3	34	LV2S2	ลำต้น ต้นใหญ่ 2
14	SV3F1	ผล ต้นเล็ก 3	35	LV2S3	ลำต้น ต้นใหญ่ 2
15	SV3F1	ผล ต้นเล็ก 3	36	LV2R1	ราก ต้นใหญ่ 2
16	SV3S1	ลำต้น ต้นเล็ก 3	37	LV2R2	ราก ต้นใหญ่ 2
17	SV3S1	ลำต้น ต้นเล็ก 3			**ต้นใหญ่ 3**
18	SV3R1	ราก ต้นเล็ก 3	38	LV3L1	ใบ ต้นใหญ่ 3
		ต้นเล็ก 4	39	LV3F1	ผล ต้นใหญ่ 3
19	SV4L1	ใบ ต้นเล็ก 4	40	LV3S1	ต้น ต้นใหญ่ 3
20	SV4L1	ใบ ต้นเล็ก 4	41	LV3R1	ราก ต้นใหญ่ 3
21	SV4F1	ผล ต้นเล็ก 4	42	LV3R2	ราก ต้นใหญ่ 3

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

รูปที่ 3.1 ลักษณะทางสัณฐานของพืชป่าในวงศ์ Araceae ชนิดที่มีชื่อทั่วไปว่า ว่านขันหมาก ตัวอย่างที่มีขนาดต้นเล็ก เจริญในพื้นที่ธรรมชาติ จังหวัดนครราชสีมา เก็บตัวอย่างจำนวน 4 ซ้ำ (SV1-SV4) พร้อมราก 2 ตัวอย่าง (SV1R1 และ SV2R1)



รูปที่ 3.2 ลักษณะทางสัณฐานของผลว่านขันหมาก ตัวอย่างที่มีขนาดต้นเล็กจำนวน 3 ตัวอย่าง (SV1F1, SV3F1 และ SV4F1)



รูปที่ 3.3 ลักษณะทางสัณฐานของพืชป่าในวงศ์ Araceae ชนิดที่มีชื่อทั่วไปว่า ว่านขันหมาก ตัวอย่างที่มีขนาดต้นใหญ่ 3 ตัวอย่าง (LV1-LV3) เก็บจากที่มีการเจริญของพืชในพื้นที่ธรรมชาติจังหวัดนครราชสีมา

รูปที่ 3.4 ลักษณะทางสัณฐานของรากและผลว่านขันหมาก ตัวอย่างที่มีขนาดต้นใหญ่ 3 และ 2 ตัวอย่าง ตามลำดับ เก็บจากที่มีการเจริญของพืชในพื้นที่ธรรมชาติ จังหวัดนครราชสีมา

รูปที่ 3.5 ลักษณะทางสัณฐานของพืชป่าที่เป็นไม้เถาชนิดที่มีชื่อทั่วไปว่า เครือสี่เหลี่ยม 2 ตัวอย่างที่เก็บจากที่มีการเจริญของพืชในพื้นที่ธรรมชาติ จังหวัดนครราชสีมา (A) และจังหวัดบุรีรัมย์ (B) ตามลำดับ

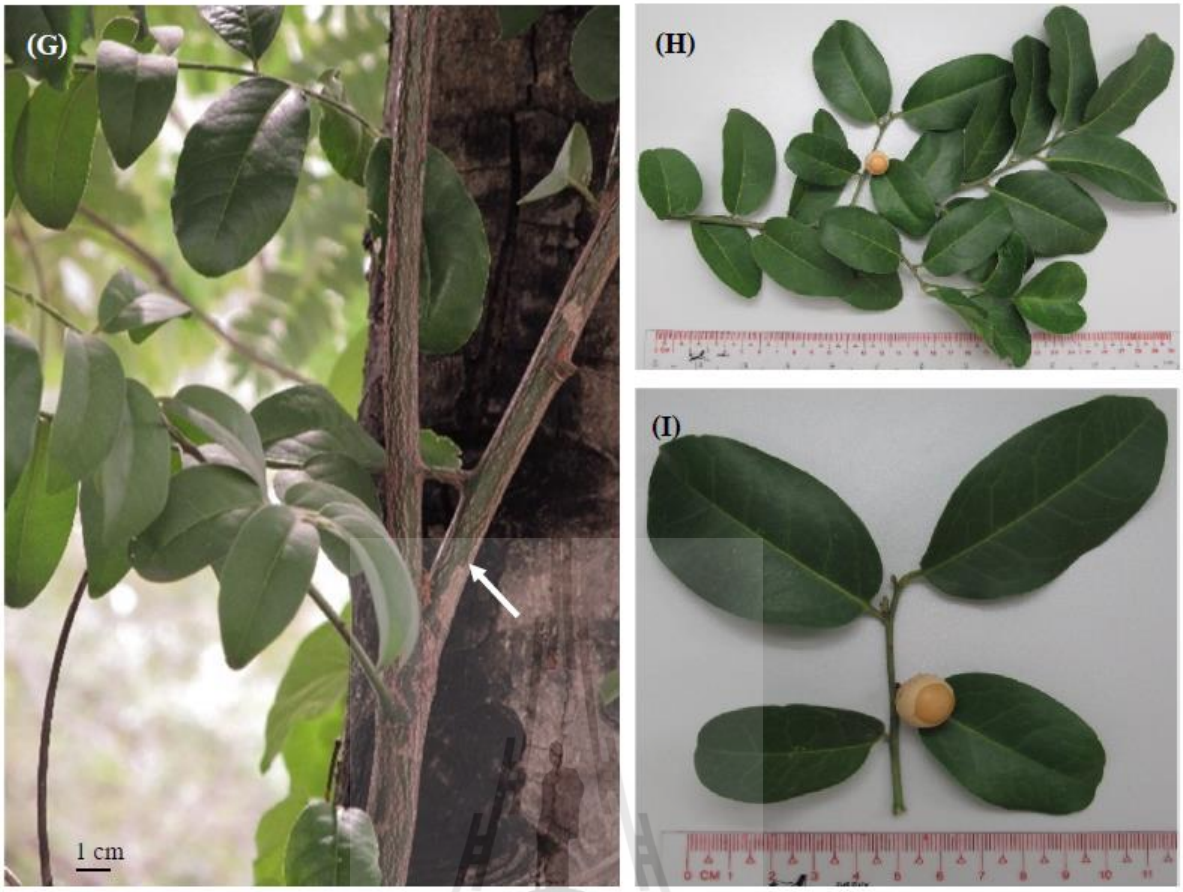
3) ตัวอย่างขันทองพยาบาท

ตัวอย่างพืชในวงศ์ Euphorbiaceae ชนิดที่มีชื่อเรียกทั่วไปว่า **ขันทองพยาบาท** พบทั้งที่เป็นไม้พุ่มขนาดใหญ่และไม้ยืนต้นขนาดย่อม มีรายงานว่าเปลือกต้นมีรสเบื่อเมา มีสรรพคุณแก้โรคมะเร็ง เรื้อน คุดทะราด กลากและเกลื้อน ทำให้ฟันทน รักษาโรคตับพิการ แก้ประดง แก้พิษในกระดูก แก้โรคผิวหนัง ฆ่าพยาธิ ส่วนเนื้อไม้มีรสเบื่อเมา มีสรรพคุณแก้ลมพิษ แก้ไข้ แก้กามโรค (เกียรติ สัจจลักษณ์, 2541) Khuntong and Sudprasert (2008) ระบุว่าพบขันทองพยาบาทเจริญอยู่ในป่าฝนเขตร้อนแถบภาคกลาง ภาคตะวันออก และภาคใต้ของประเทศไทย เก็บจากพื้นที่ธรรมชาติในจังหวัดนครราชสีมาจำนวน 3 ตัวอย่าง (รูปที่ 3.6)

ตามข้อมูลจากกรมป่าไม้ ขันทองพยาบาทมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Suregada multiflora* (A.Juss.) Baill. ชื่อพ้อง *Gelonium multiflorum* และชื่อท้องถิ่น คือ กระดูก ยายปลวก (ภาคใต้) ขนุนดง (เพชรบูรณ์) ขอบนางนั่ง (ตรัง) ขัณฑสกร ช้องรำพัน สลอดน้ำ (จันทบุรี) ขันทอง (พิจิตร) มะดูก หมากดูก (ภาคกลาง) ข้าวตาก ขุนทอง คุณทอง (ประจวบคีรีขันธ์) โจ่ง (สุรินทร์) ดูกไทร ดูกไม้ เหมือดโลด (เลย) ดูกหิน (สระบุรี) ดูกไหล เป็นไม้พุ่มหรือไม้ต้นขนาดเล็ก สูง 8-10 เมตร ไม่ผลัดใบ เปลือกต้นสีน้ำตาล ไม่มีน้ำยาง ใบเดี่ยว เรียงสลับ ก้านใบสั้น รูปขอบขนานหรือรูปขอบขนานแกมรูปรียาว 3-5 มิลลิเมตร ขอบใบเรียบ ปลายใบแหลมหรือมน ฐานใบสอบหรือเบี้ยว ผิวใบเกลี้ยง หูใบกว้าง 6-8 เซนติเมตร ยาว 10-13 เซนติเมตร มีช่อดอกสั้นเป็นกระจุกแน่น ดอกไม่สมบูรณ์เพศ เป็นแบบแยกเพศต่างต้น ดอกเพศผู้มีกลีบเลี้ยง 5 กลีบ กว้าง 2-3 มิลลิเมตร ยาวประมาณ 3 มิลลิเมตร ไม่มีกลีบดอก เกสรเพศผู้จำนวนมาก ดอกเพศเมียมีกลีบเลี้ยง 5-6 กลีบ แยก 2 แฉก รังไข่ 3 ช่อง เหนือวงกลีบดอก ยอดเกสรเพศเมีย มีผลกลมเกลี้ยง เป็น 3 พู เส้นผ่าศูนย์กลาง 2-3 เซนติเมตร เมื่อแก่มีสีเหลือง เมล็ดกลม เส้นผ่าศูนย์กลาง 6-8 มิลลิเมตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

รูปที่ 3.6 ลักษณะทางสัณฐานของพืชป่าในวงศ์ Euphorbiaceae ชนิดที่มีชื่อทั่วไปว่า ขันทองพยาบาท ตัวอย่างที่ 1 (A-D) ตัวอย่างที่ 2 (E และ F) และตัวอย่างที่ 3 (G-I) ที่เจริญในพื้นที่ธรรมชาติ จังหวัดนครราชสีมา

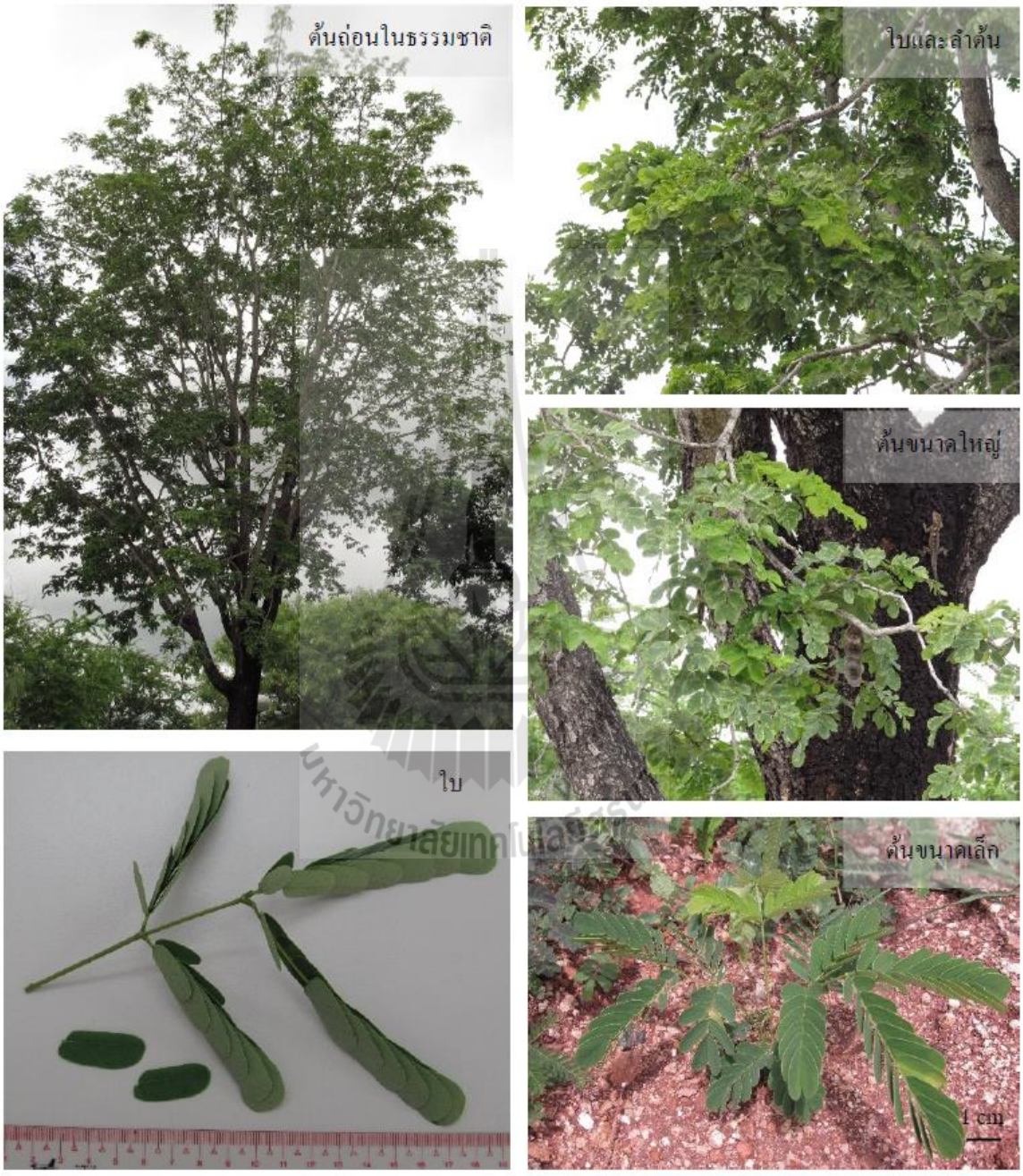


รูปที่ 3.6 (ต่อ) ลักษณะทางสัณฐานของพืชป่าในวงศ์ Euphorbiaceae ชนิดที่มีชื่อทั่วไปว่า ขันทองพยาบาท ตัวอย่างที่ 1 (A-D) ตัวอย่างที่ 2 (E และ F) และตัวอย่างที่ 3 (G-I) ที่เจริญในพื้นที่ธรรมชาติจังหวัดนครราชสีมา

4) ตัวอย่างถ่อน หรือ ทิ้งถ่อน

พืชในวงศ์ Leguminosae เป็นไม้ยืนต้น สูงถึง 10-20 เมตร มีชื่อทั่วไปว่าถ่อนหรือทิ้งถ่อน พบเจริญในพื้นที่ธรรมชาติในจังหวัดนครราชสีมา มีทั้งต้นขนาดใหญ่โตเต็มวัยและขนาดเล็กที่กำลังเจริญ (รูปที่ 3.7) กิ่งอ่อนมีขนปกคลุมเล็กน้อย **ต้น**แก่สีเทา-น้ำตาล เปลือกมีรอยด่างสีน้ำตาลกระจาย มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Albizia procera* (Roxb.) Benth. **ใบ**ประกอบแบบขนนก 2 ชั้น เรียงตัวแบบสลับ ก้านใบรวม ยาว 10-12 เซนติเมตร ใบย่อย จำนวน 10-12 คู่ ใบย่อยรูปไข่กลับกว้าง 7-10 มิลลิเมตร ยาว 2-3 มิลลิเมตร สีเขียวแกมเหลือง ฐานใบมนหรือเฉียง ปลายใบมนหรือเว้าเข้าเล็กน้อย ผิวหลังใบเรียบ ท้องใบมีขนสั้นๆ ปกคลุม ขอบใบเรียบ **ช่อดอก**กระจุกแน่นทรงกลม เกิดที่ซอกใบใกล้ๆ ปลายกิ่งหรือปลายกิ่ง ดอกแต่ละช่อมีดอกย่อยจำนวน 15-25 ดอก ดอกสมบูรณ์เพศขนาดเล็กไม่มีก้านดอกย่อยหรือมีสั้นมาก กว้าง 3-7 มิลลิเมตร ยาว 2-3 มิลลิเมตร ดอกเพศผู้เป็นรูปถ้วยสีเขียวสว่างยาว 3-5 มิลลิเมตร ดอกเพศเมียเป็นรูปถ้วยสีเขียวยาว 8-10 มิลลิเมตร เกสรตัวผู้มีจำนวนมากสีขาวยาว 3-5 เซนติเมตร รังไข่เหนือวง กลีบดอกมี 1 ช่อง **ผล**เป็นฝักแบนสีน้ำตาลไม่มีขนกว้าง 2-3 เซนติเมตร ยาว 8-12 เซนติเมตร **เมล็ด** แบน

รูปรี กว้าง 6 มิลลิเมตร ยาว 8 มิลลิเมตร (รูปที่ 3.7) มีรายงานการตรวจหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในขั้นต้นจากพืชของอินเดียชนิดเดียวกับถ่อนพบว่ามีฤทธิ์ต้านมะเร็ง (Bhakuni *et al*., 1971) ส่วนสรรพคุณซึ่งเป็นข้อมูลของประเทศไทยระบุว่า รากและแก่น แก้เจ็บเอว แก้เจ็บหลัง แก้เส้นตึง แก้ท้องอืด และเปลือกต้นทำให้เจริญอาหาร แก้ธาตุพิการ (นันทวัน บุณยะประภัศร และ อรนุช โชคชัยเจริญพร, 2541)



รูปที่ 3.7 ลักษณะทางสัณฐานของพืชป่าในวงศ์ Leguminosae ชนิดที่มีชื่อทั่วไปว่า ถ่อนหรือทิ้งถ่อน ตัวอย่างจากต้นที่มีขนาดใหญ่และขนาดเล็ก (ยังเจริญไม่เต็มวัย) ที่เจริญตามธรรมชาติในพื้นที่จังหวัดนครราชสีมา

3.1.3 การทดลองสกัดสารจากพืชเพื่อทดสอบฤทธิ์ของสารต่อเซลล์มะเร็ง

ตัวอย่างพืชที่นำมาศึกษาจากแผนที่วางไว้มี 2 ชนิด แต่ได้เก็บตัวอย่างพืชป่ามา 4 ชนิด คือ ว่านขันหมาก (*Aglaonema simplex* (Blume) Blume หรือ *Aglaonema tenuipes* Engl.) เครือสี่เหลี่ยม (ยังไม่สามารถระบุชนิดจำเป็นต้องติดตามการเจริญ) ขันทองพยาบาท (*Suregada multiflora* (A.Juss.) Baill.) และ ถ่อน (*Albizia procera* (Roxb.) Benth.) โดยสกัดสารจากส่วนของพืชตามที่จัดหาได้ในช่วงเวลาของการศึกษา ได้แก่ ใบ ลำต้นหรือเปลือก ผล และราก ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีความมีขั้วน้อยและมากขึ้นเป็นลำดับ 3 ชนิด คือ เฮกเซน (Hexane) คลอโรฟอร์ม (Chloroform) และเมทานอล (Methanol) กรองแยกเอากากออกและระเหยสารสกัดดังกล่าวด้วยเครื่องระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporator) เพื่อแยกตัวทำละลายออกแล้วจึงละลายในน้ำหรือ Dimethylsulphoxide (DMSO) ให้ได้สารสกัดหยาบ

ได้เลือกสกัดสารจากว่านขันหมากพืชต้นเล็ก 1 ตัวอย่าง และพืชต้นใหญ่ 1 ตัวอย่าง แต่ละตัวอย่างพืชมีส่วนของ ใบ ลำต้น (ไม่มีส่วนเปลือกที่แยกออกจากลำต้น) ผล และราก พบว่าสารสกัดหยาบจากใบและผลว่านขันหมากต้นเล็กที่สกัดด้วย Hexane และ Methanol มีผลผลิต (Yield) สูงสุด คือ 7.499 และ 7.587% ตามลำดับ สารสกัดหยาบจากใบ ผล ต้น และรากว่านขันหมากต้นเล็กที่สกัดด้วย Methanol ได้ Yield เท่ากับ 4.064, 7.587, 1.446 และ 0.717% ตามลำดับ (ตารางที่ 3.2) ว่านขันหมากต้นใหญ่พบสารสกัดจากใบ ผล ต้น และราก ที่สกัดด้วย Methanol มีปริมาณสารสกัดหยาบสูงสุดที่ 1.925, 3.700, 3.633 และ 2.178% ตามลำดับ

เมื่อสกัดสารจากเถา (ลำต้น) ก้านใบ และใบของเครือสี่เหลี่ยมพบว่าปริมาณสารสกัดหยาบที่สกัดด้วย Methanol ที่มีความเป็นขั้วสูงสุดให้ผลผลิต (Yield เท่ากับ 4.460, 2.387 และ 6.990% ตามลำดับ) สูงกว่าตัวทำละลาย Hexane (Yield เท่ากับ 0.580, 0.772 และ 2.844% ตามลำดับ) และ Chloroform (Yield เท่ากับ 0.320, 0.704 และ 2.819% ตามลำดับ) (ตารางที่ 3.3)

สารสกัดหยาบจากใบและเปลือกของลำต้นขันทองพยาบาท (ทางโครงการมิได้ตัดต้นพืช) พบว่าสารที่มีปริมาณมากได้จากใบ ปริมาณสารสกัดหยาบที่สกัดด้วย Methanol ได้ผลผลิต (Yield) สูงสุด คือ 6.273% ส่วนการสกัดด้วย Hexane และ Chloroform ซึ่งมีความเป็นขั้วต่ำกว่า Methanol ได้ Yield เท่ากับ 2.953 และ 2.646% ตามลำดับ

สำหรับพืชป่าที่มีชื่อว่า “ถ่อน” ไม่ได้ทดลองสกัดตัวอย่างพืชที่เก็บมาเนื่องจากเป็นตัวอย่างที่เก็บมามากกว่าแผนการดำเนินงาน เพื่อเลือกชนิดของพืช

ตารางที่ 3.2 ปริมาณของสารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดสารจากใบ ต้น ราก และผลของว่านขันหมากที่มีขนาดลำต้นใหญ่และเล็ก ที่พบการเจริญในพื้นที่จังหวัดนครราชสีมา

ส่วนของว่านขันหมาก	น้ำหนักแห้ง (กรัม)	น้ำหนักของผงสารสกัด (กรัม) และ Yield (%) จากตัวทำละลาย					
		Hexane		Chloroform		Methanol	
		Crude extract	Yield	Crude extract	Yield	Crude extract	Yield
พืชต้นเล็ก 1							
ใบ	500	37.493	7.499	4.928	0.986	20.319	4.064
ต้น	500	0.465	0.093	0.202	0.040	7.228	1.446
ราก	500	1.035	0.207	0.096	0.019	3.586	0.717
ผล	500	2.278	0.456	1.467	0.293	37.933	7.587
พืชต้นใหญ่ 1							
ใบ	500	2.188	0.438	2.000	0.400	9.625	1.925
ต้น	500	0.020	0.004	0.046	0.009	18.163	3.633
ราก	500	0.108	0.022	0.104	0.021	10.892	2.178
ผล	500	2.444	0.489	4.667	0.933	18.500	3.700

ตารางที่ 3.3 ปริมาณของสารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดจากเถา (ต้น) ก้านใบ และใบของเครือสี่เหลี่ยมที่พบการเจริญในพื้นที่จังหวัดนครราชสีมา

ส่วนของเครือสี่เหลี่ยม	น้ำหนักแห้ง (กรัม)	น้ำหนักของผงสารสกัด (กรัม) และ Yield (%) จากตัวทำละลาย					
		Hexane		Chloroform		Methanol	
		Crude extract	Yield	Crude extract	Yield	Crude extract	Yield
เถา (ต้น)	55	0.319	0.580	0.176	0.320	2.455	4.460
ก้านใบ	750	5.787	0.772	5.279	0.704	17.903	2.387
ใบ	780	22.187	2.844	21.993	2.819	54.523	6.990

ตารางที่ 3.4 ปริมาณของสารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดใบและเปลือกของขันทองพยาบาทที่พบในพื้นที่ธรรมชาติ จังหวัดนครราชสีมา

ส่วนของขันทอง-พยาบาท	น้ำหนักแห้ง (กรัม)	น้ำหนักของผงสารสกัด (กรัม) และ Yield (%) จากตัวทำละลาย					
		Hexane		Chloroform		Methanol	
		Crude extract	Yield	Crude extract	Yield	Crude extract	Yield
ใบ	550	16.240	2.953	14.554	2.646	34.504	6.273
เปลือก	750	4.890	0.652	2.24	0.299	12.340	1.645

3.2 การวิจัยในส่วนของเชื้อราที่อยู่ในพืชป่า

3.2.1 การแยก เพาะเลี้ยง และจัดจำแนกชนิดของเชื้อรา

ทดลองแยกเชื้อราบริสุทธิ์ที่อยู่ในส่วนใบ ลำต้น ผล และรากของพืชป่าที่ไม่เป็นโรคหรือแมลงทำลาย เลือกพืชมาศึกษา 3 ชนิด จากแผนที่ระบุไว้ 2 ชนิด และวิเคราะห์ชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อราโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานและการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ มีการศึกษาสารพันธุกรรมโดยหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S Ribosomal RNA gene ของเชื้อราไอโซเลทเด่นและที่ยากต่อการระบุชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐาน รวมถึงไอโซเลทที่ให้ผลการทดสอบของสารสกัดที่มีแนวโน้มในการใช้ประโยชน์ในอนาคต ได้ผลดังนี้

3.2.1.1 เชื้อราจากว่านขันหมาก

คัดแยกเชื้อราและเพาะเลี้ยงได้เชื้อราบริสุทธิ์จากใบ ก้านใบ ลำต้น โคนต้น และรากของว่านขันหมากที่มีขนาดต้นเล็ก (รูปที่ 3.1-3.2) 3 ตัวอย่าง และที่มีขนาดต้นใหญ่ (รูปที่ 3.3-3.4) 2 ตัวอย่าง ได้จำนวนทั้งสิ้น 103 ไอโซเลท (ตารางที่ 3.5-3.8) ไม่พบเชื้อราจากตัวอย่างผล ตัวอย่างลักษณะทางสัณฐานของโคโลนีเชื้อราที่แยกได้ดังแสดงในรูปที่ 3.8-3.17

ตารางที่ 3.5 รหัสเชื้อรา Endophytes ที่แยกจากส่วนใบ ก้านใบ ผล ต้น โคนต้น และรากของว่านขันหมากที่มีขนาดต้นเล็กและขนาดต้นใหญ่ (รูปที่ 3.1-3.4)

ส่วนของว่านขันหมาก	ต้นใหญ่		ต้นเล็ก	
	ต้นที่ 1	ต้นที่ 2	ต้นที่ 1	ต้นที่ 2
ใบ (3 ใบ)	A B C	a b c	F G H	f g h
ผล[1]	I	i	K	k
ลำต้น	D	d	J	j
ก้านใบ	E	e	M	m
โคนต้น	Q	q	T	t
ราก	N	n	R	r

หมายเหตุ: [1], นำตัวอย่างผลที่เก็บจากว่านขันหมากต้นเล็กตัวอย่างที่ 3 (รูปที่ 3.2) มาแยกเชื้อราเพิ่ม (ตารางที่ 3.6)

ตารางที่ 3.6 เชื้อรา Endophytes แยกจากว่านขันหมากที่มีขนาดต้นเล็ก (รูปที่ 3.1-3.2) 3 ตัวอย่าง และขนาดต้นใหญ่ (รูปที่ 3.3-3.4) 2 ตัวอย่าง

ว่านขันหมากที่นำมาแยกเชื้อรา/ ส่วนของพืช		เชื้อรา Endophytes		
		รหัสเส้นใย	รหัส DNA	ชนิด
ต้นเล็ก 1				
SV1L1	ใบ 1	9F	9F	*Colletotrichum* sp. 3
SV1L2	ใบ 2	10G	10G	Unknown species 1
	ใบ 2	12G	12G	*Phomopsis* sp. 13
	ใบ 2	18G	18G	*Colletotrichum* sp. 6
SV1L3	ใบ 3	2H	2H	*Phomopsis* sp. 1
	ใบ 3	5H	5H	*Colletotrichum* sp. 2
	ใบ 3	6H	6H	*Phomopsis* sp. 4
	ใบ 3	7H	7H	*Phomopsis* sp. 5
SV1B1	ก้าน	1M	1M	*Colletotrichum* sp. 1
	ก้าน	3M	3M	*Colletotrichum* sp. 2
SV1F1-1	ผล	-	-	-
SV1F1-2	ผล	-	-	-
SV1F1-3	ผล	-	-	-
SV1F1-4	ผล	-	-	-
SV1S1	ลำต้น	4J	4J	*Colletotrichum* sp. 3
	ลำต้น	8J	8J	*Phomopsis* sp. 6
	โคนต้น	44T	44T	Unknown species 12
	โคนต้น	48T	48T	*Xylaria* sp. 4
	โคนต้น	49T	49T	*Xylaria* sp. 5
SV1R1	ราก	45R	45R	Basidiomycete species 2
	ราก	46R	46R	*Xylaria* sp. 2
	ราก	47R	47R	*Xylaria* sp. 3
	ราก	50R	50R	*Xylaria* sp. 6
	ราก	51R	51R	*Xylaria* sp. 7

หมายเหตุ: -, ไม่พบเชื้อรา; ND, ไม่ได้วิเคราะห์ชนิดของเชื้อรา (not determined) เนื่องจากพบเชื้อราที่แยกได้จำนวนมาก (ลักษณะโคโลนีตามรูปผนวกที่ 6 และ 10) เกินกรอบงบประมาณและเวลาของโครงการวิจัย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 3.6 (ต่อ) เชื้อรา Endophytes แยกจากว่านขันหมากที่มีขนาดต้นเล็ก (รูปที่ 3.1-3.2) 3 ตัวอย่าง และขนาดต้นใหญ่ (รูปที่ 3.3-3.4) 2 ตัวอย่าง

ว่านขันหมากที่นำมาแยกเชื้อรา/ ส่วนของพืช		เชื้อรา Endophytes		
		รหัสเส้นใย	รหัส DNA	ชนิด
ต้นเล็ก 2				
SV2L1	ใบ 1	35f	35f	*Daldinia* sp. 3
SV2L2	ใบ 2	13g	13g	*Colletotrichum* sp. 7
SV2L3	ใบ 3	14h	14h	*Colletotrichum* sp. 4
SV2B1	ก้าน	41m	41m	Ascomycte species
SV2F1-1	ผล	-	-	-
SV2F1-2	ผล	-	-	-
SV2F1-3	ผล	-	-	-
SV2F1-4	ผล	-	-	-
SV2F1-5	ผล	-	-	-
SV2F1-6	ผล	-	-	-
SV2F1-7	ผล	-	-	-
SV2S1-1	ลำต้น	15j	15j	*Colletotrichum* sp. 5
SV2S1-2	ลำต้น	16j	16j	*Muscodor* sp. 1
	โคนต้น	42t	42t	Unknown species 10
SV2R1	ราก	43r	43r	Unknown species 11
ต้นเล็ก 3				
SV3F1-1	ผล	-	-	-
SV3F1-2	ผล	-	-	-
SV3F1-4	ผล	-	-	-
SV3F1-5	ผล	-	-	-
ต้นใหญ่ 1				
LV1L1-1	ใบ 1	LV1L1-1	ND	ND
LV1L1-4	ใบ 1	LV1L1-4	ND	ND
LV1L1-5	ใบ 1	19A	19A	*Phomopsis* sp. 9
LV1L1-6	ใบ 1	9บ ขญ	9บ ขญ	*Guignardia mangiferae*

หมายเหตุ: -, ไม่พบเชื้อรา; ND, ไม่ได้วิเคราะห์ชนิดของเชื้อรา (not determined) เนื่องจากพบเชื้อราที่แยกได้จำนวนมาก (ลักษณะโคโลนีตามรูปผนวกที่ 6 และ 10) เกินกรอบงบประมาณและเวลาของโครงการวิจัย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 3.6 (ต่อ) เชื้อรา Endophytes แยกจากว่านขันหมากที่มีขนาดต้นเล็ก (รูปที่ 3.1-3.2) 3 ตัวอย่าง และขนาดต้นใหญ่ (รูปที่ 3.3-3.4) 2 ตัวอย่าง

ว่านขันหมากที่นำมาแยกเชื้อรา/ส่วนของพืช		เชื้อรา Endophytes		
		รหัสเส้นใย	รหัส DNA	ชนิด
ต้นใหญ่ 1 (ต่อ)				
LV1L1-7	ใบ 1	LV1L1-7	ND	ND
LV1L2-1	ใบ 2	LV1L2-1	ND	ND
LV1L2-2	ใบ 2	LV1L2-2	ND	ND
LV1L2-3	ใบ 2	LV1L2-3	ND	ND
LV1L2-4	ใบ 2	LV1L2-4	ND	ND
LV1L4-2	ใบ 2	20B	20B	*Phomopsis* sp. 10
LV1L4-3	ใบ 2	24B	24B	*Colletotrichum* sp. 12
LV1L4-4	ใบ 3	29C	29C	*Colletotrichum* sp. 9
LV1L4-1	ใบ 4	LV1L4-1	ND	ND
LV1L5-1	ใบ	LV1L5-1	ND	ND
LV1L5-2	ใบ	LV1L5-2	ND	ND
LV1L5-3	ใบ	LV1L5-3	ND	ND
LV1L5-4	ใบ	LV1L5-4	ND	ND
LV1L5-5	ใบ	LV1L5-5	ND	ND
LV1L5-7	ใบ	LV1L5-7	ND	ND
LV1L5-8	ใบ	LV1L5-8	ND	ND
LV1L5-9	ใบ	LV1L5-9	ND	ND
LV1L6-1	ใบ	LV1L6-1	ND	ND
LV1L6-2	ใบ	LV1L6-2	ND	ND
LV1L7-2	ใบ	LV1L7-2	ND	ND
LV1L7-3	ใบ	LV1L7-3	ND	ND
LV1L8-1	ใบ	LV1L8-1	ND	ND
LV1L8-1-1	ใบ	LV1L8-1-1	ND	ND
LV1L8-2	ใบ	LV1L8-2	ND	ND
LV1L8-3	ใบ	LV1L8-3	ND	ND
LV1L8-5	ใบ	LV1L8-5	ND	ND
LV1L8-6	ใบ	LV1L8-6	ND	ND
LV1L9-1	ใบ	LV1L9-1	ND	ND

หมายเหตุ: -, ไม่พบเชื้อรา; ND, ไม่ได้วิเคราะห์ชนิดของเชื้อรา (not determined) เนื่องจากพบเชื้อราที่แยกได้จำนวนมาก (ลักษณะโคโลนีตามรูปผนวกที่ 6 และ 10) เกินกรอบงบประมาณและเวลาของโครงการวิจัย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 3.6 (ต่อ) เชื้อรา Endophytes แยกจากว่านขันหมากที่มีขนาดต้นเล็ก (รูปที่ 3.1-3.2) 3 ตัวอย่าง และขนาดต้นใหญ่ (รูปที่ 3.3-3.4) 2 ตัวอย่าง

ว่านขันหมากที่นำมาแยกเชื้อรา/ส่วนของพืช		เชื้อรา Endophytes		
		รหัสเส้นใย	รหัส DNA	ชนิด
ต้นใหญ่ 1 (ต่อ)				
LV1L9-2	ใบ	LV1L9-2	ND	ND
LV1L9-3	ใบ	LV1L9-3	ND	ND
LV1L9-3-1	ใบ	LV1L9-3-1	ND	ND
LV1L9-5	ใบ	LV1L9-5	ND	ND
LV1L10-1	ใบ	LV1L10-1	ND	ND
LV1L11-2	ใบ	LV1L11-2	ND	ND
LV1L12-1	ใบ	LV1L12-1	ND	ND
LV1L12-2	ใบ	LV1L12-2	ND	ND
LV1B1	ก้าน	27E	27E	Unknown species 3
	ก้าน	28E	28E	Unknown species 4
LV1S1-1	ลำต้น	30D	30D	*Daldinia* sp. 2
LV1S1-3	ลำต้น	1ล ขญ	1ล ขญ	ND
LV1S1-4	ลำต้น	2ล ขญ	2ล ขญ	*Glomerella* sp. 2
LV1S1-5	ลำต้น	3ล ขญ	3ล ขญ	ND
LV1S1-6	ลำต้น	4ล ขญ	4ล ขญ	*Endothia* sp.
LV1S1-7	ลำต้น	5ล ขญ	5ล ขญ	ND
LV1S1-8	ลำต้น	6ล ขญ	6ล ขญ	ND
LV1S1-9	ลำต้น	7ล ขญ	7ล ขญ	ND
LV1S1-10	ลำต้น	8ล ขญ	8ล ขญ	*Colletotrichum* sp. 11
LV1S1-11	โคนต้น	11Q	11Q	*Xylaria* sp.1
	โคนต้น	12Q	12Q	Basidiomycete species 1
	โคนต้น	36Q	36Q	Unknown species 6
LV1R1	ราก	37N	37N	Unknown species 7
LV1R2	ราก	38N	38N	Unknown species 8
LV1R1-6	ราก	LV1R1-6	ND	ND

หมายเหตุ: -, ไม่พบเชื้อรา; ND, ไม่ได้วิเคราะห์ชนิดของเชื้อรา (not determined) เนื่องจากพบเชื้อราที่แยกได้จำนวนมาก (ลักษณะโคโลนีตามรูปผนวกที่ 6 และ 10) เกินกรอบงบประมาณและเวลาของโครงการวิจัย

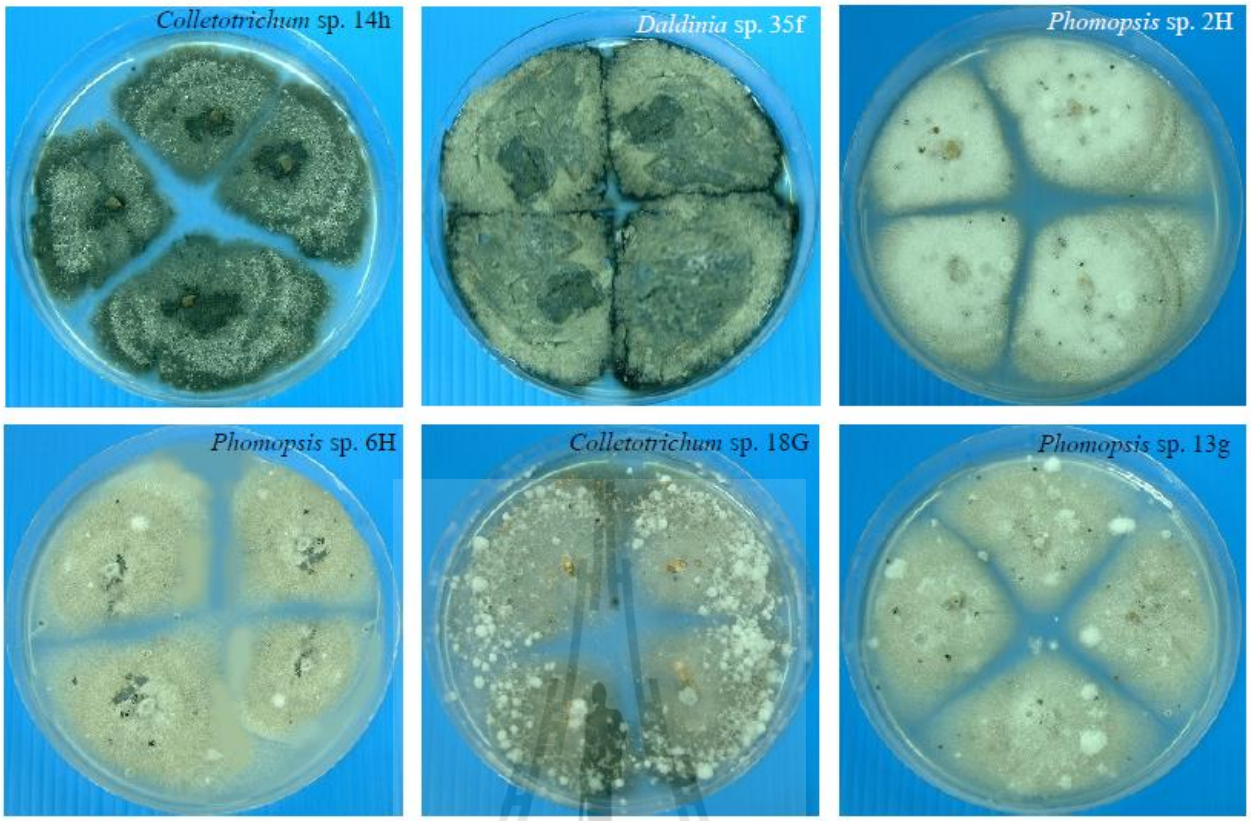
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 3.6 (ต่อ) เชื้อรา Endophytes แยกจากว่านขันหมากที่มีขนาดต้นเล็ก (รูปที่ 3.1-3.2) 3 ตัวอย่าง และขนาดต้นใหญ่ (รูปที่ 3.3-3.4) 2 ตัวอย่าง

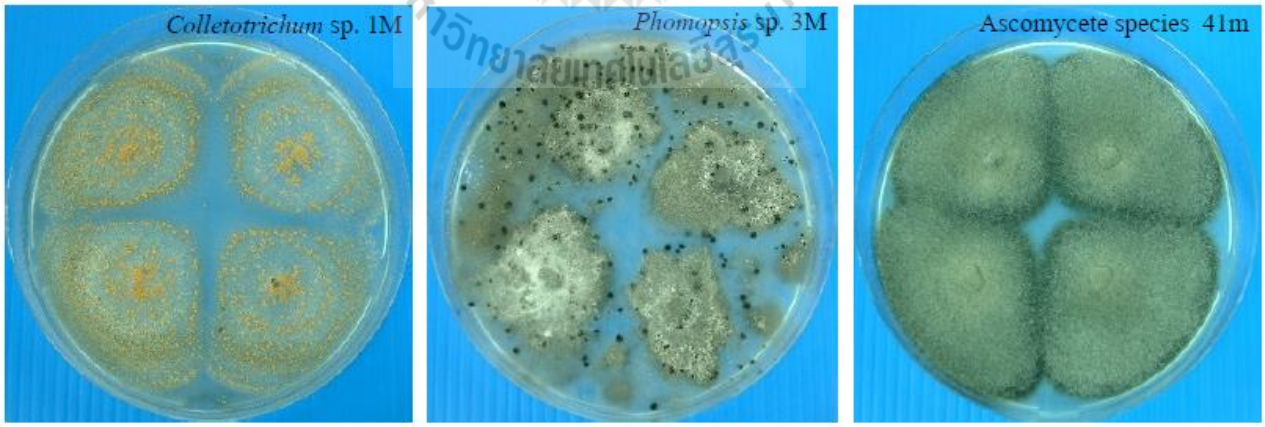
ตัวอย่างที่นำมาแยกเชื้อรา/ ส่วนของพืช		เชื้อรา Endophytes		
		รหัสเส้นใย	รหัส DNA	ชนิด
ต้นใหญ่ 1 (ต่อ)				
LV1R1-6-1	ราก	LV1R1-6-1	ND	ND
LV1R3	ราก	LV1R3	ND	ND
LV1R4	ราก	LV1R4	ND	ND
LV1R5	ราก	LV1R5	ND	ND
LV1R6	ราก	LV1R6	ND	ND
LV1R8-1	ราก	LV1R8-1	ND	ND
LV1R9-3-1	ราก	LV1R9-3-1	ND	ND
LV1R12-1-1	ราก	LV1R12-1-1	ND	ND
ต้นใหญ่ 2				
LV2L1	ใบ 1	31a	31a	*Phomopsis* sp. 15
LV2L1	ใบ 1	34a	34a	*Colletotrichum* sp. 10
LV2L2	ใบ 2	17b	17b	*Phomopsis* sp. 8
LV2L2	ใบ 2	22b	22b	*Colletotrichum* sp. 7
LV2L2	ใบ 2	33b	33b	Unknown species 5
LV2L3	ใบ 3	23c	23c	*Colletotrichum* sp. 8
LV2S1	ลำต้น	25d	25d	*Phomopsis* sp. 13
LV2S1	ลำต้น	26d	26d	*Phomopsis* sp. 14
	โคนต้น	21q	21q	*Colletotrichum* sp. 12
LV2R1	ราก	32n	32n	*Xylaria* sp. 1

หมายเหตุ: -, ไม่พบเชื้อรา; ND, ไม่ได้วิเคราะห์ชนิดของเชื้อรา (not determined) เนื่องจากพบเชื้อราที่แยกได้จำนวนมาก (ลักษณะโคโลนีตามรูปผนวกที่ 6 และ 10) เกินกรอบงบประมาณและเวลาของโครงการวิจัย

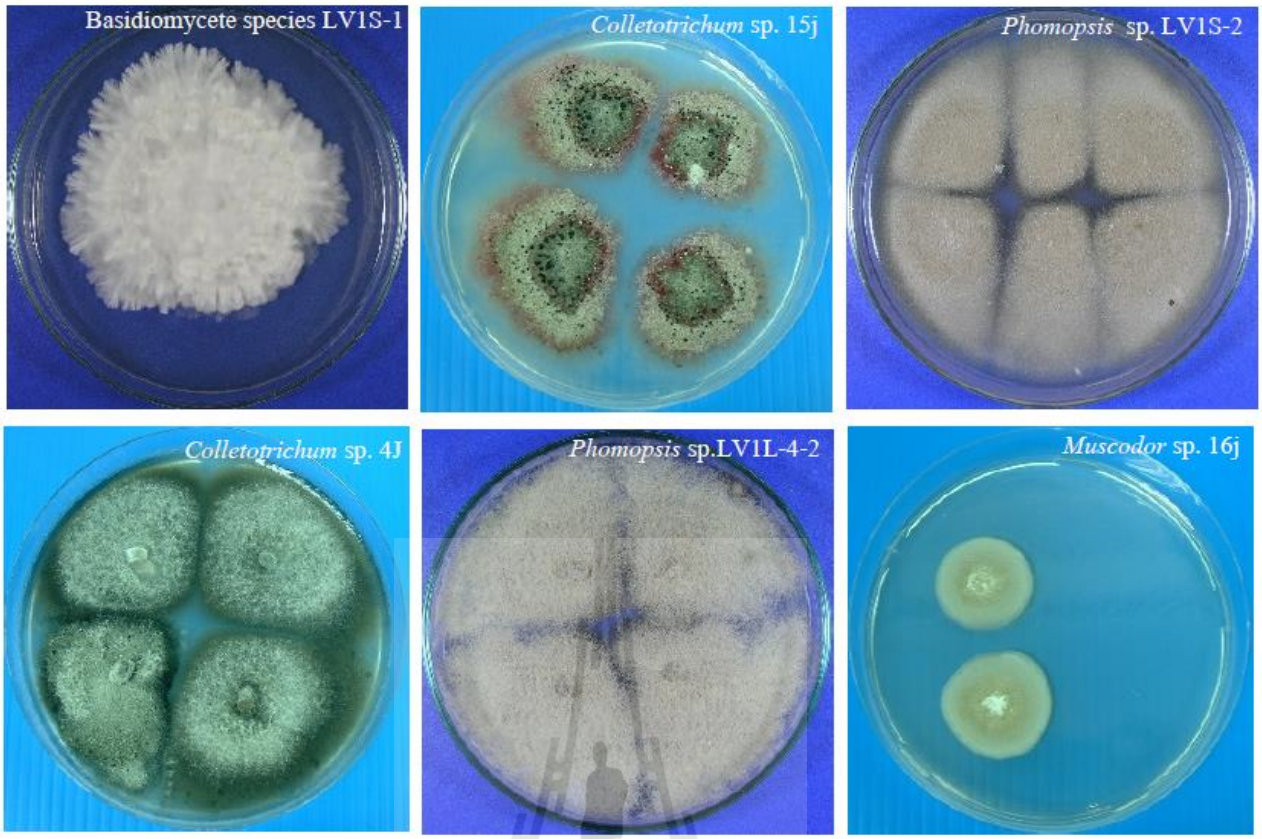
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



รูปที่ 3.8 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของเชื้อราต่างไอโซเลทที่แยกได้จาก**ใบ**ของว่านขันหมากที่มีขนาด**ต้นเล็ก**

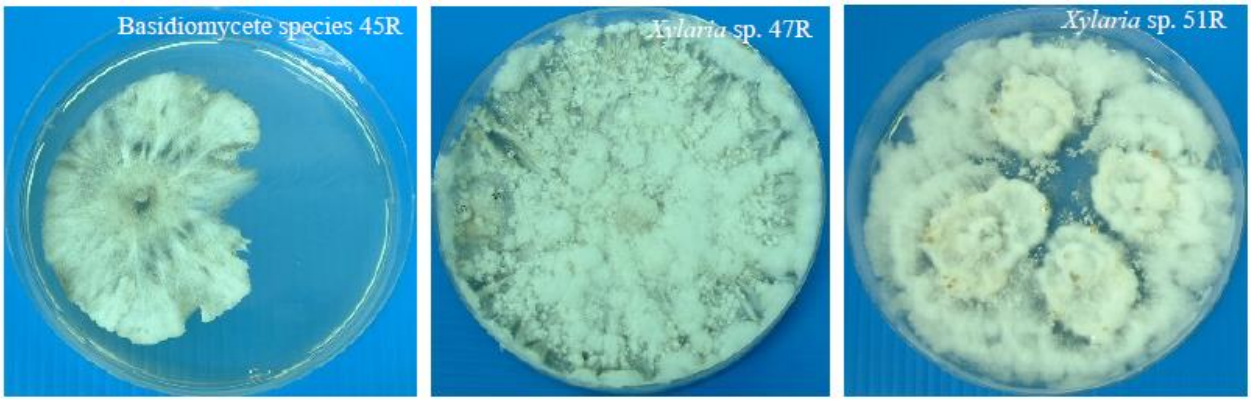


รูปที่ 3.9 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของเชื้อราต่างไอโซเลทที่แยกได้จาก**ก้านใบ**ของว่านขันหมากที่มีขนาด**ต้นเล็ก**

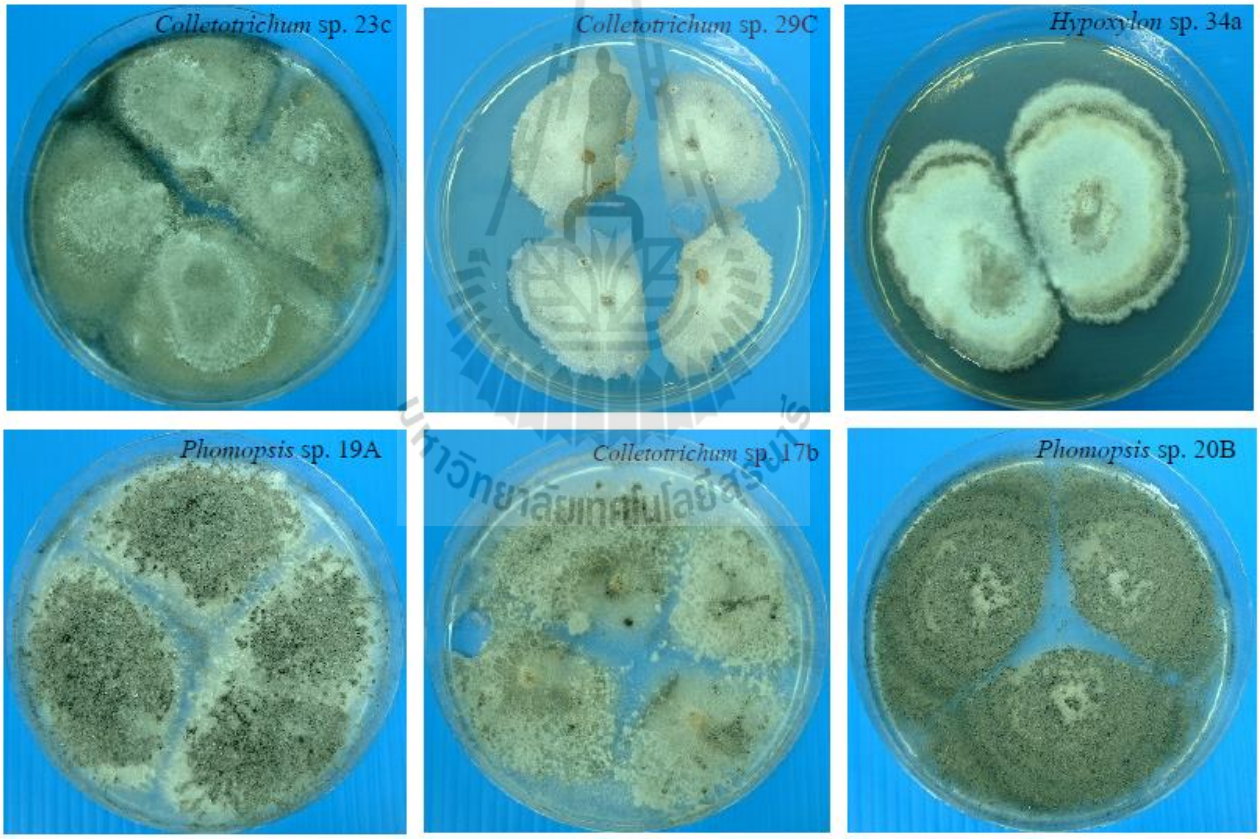


รูปที่ 3.10 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของเชื้อราต่างไอโซเลทที่แยกได้จาก**ลำต้น**ของว่านขันหมากที่มีขนาด**ต้นเล็ก**

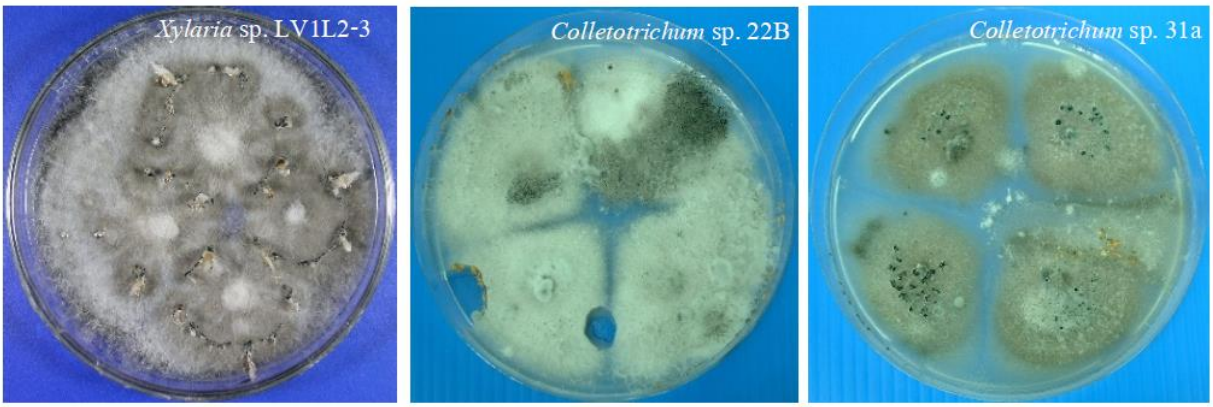
รูปที่ 3.11 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของเชื้อราต่างไอโซเลทที่แยกได้จาก**โคนต้น**ของว่านขันหมากที่มีขนาด**ต้นเล็ก**



รูปที่ 3.12 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของเชื้อราต่างไอโซเลทที่แยกได้จาก**ราก**ของว่านขันหมากที่มีขนาด**ต้นเล็ก**

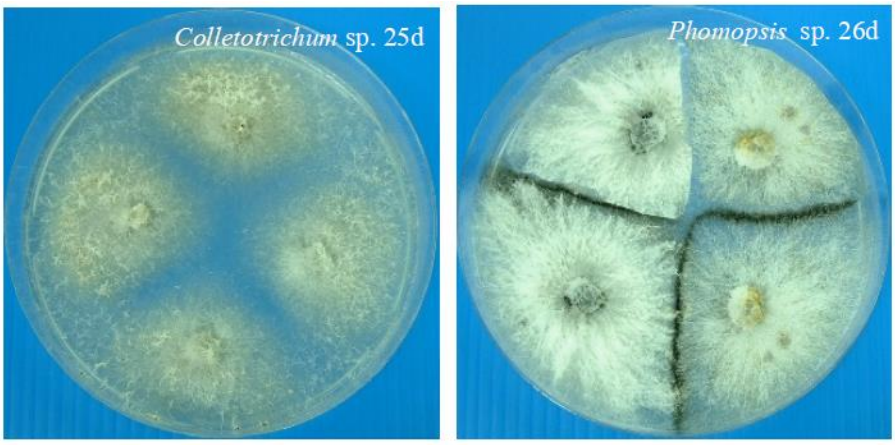


รูปที่ 3.13 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของเชื้อราต่างไอโซเลทที่แยกได้จาก**ใบ**ของว่านขันหมากที่มีขนาด**ต้นใหญ่**



รูปที่ 3.13 (ต่อ) ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของเชื้อราต่างไอโซเลทที่แยกได้จาก**ใบ**ของว่านขันหมากที่มีขนาด**ต้นใหญ่**

รูปที่ 3.14 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของเชื้อราต่างไอโซเลทที่แยกได้จาก**ก้านใบ**ของว่านขันหมากที่มีขนาด**ต้นใหญ่**



รูปที่ 3.15 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของเชื้อราต่างไอโซเลทที่แยกได้จาก**ลำต้น**ของว่านขันหมากที่มีขนาด**ต้นใหญ่**

รูปที่ 3.16 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของเชื้อราต่างไอโซเลทที่แยกได้จาก**โคนต้น**ของว่านขันหมากที่มีขนาด**ต้นใหญ่**

รูปที่ 3.17 ตัวอย่างลักษณะทางสัณฐานของเชื้อราที่แยกได้จาก**ราก**ของว่านขันหมากที่มีขนาด**ต้นใหญ่**

เชื้อรา Endophytes ที่แยกได้จากพืชป่าในวงศ์ Araceae ชนิดที่มีชื่อทั่วไปว่า ว่านขันหมากมีความหลากหลายของ Species และลักษณะทางสัณฐานของโคโลนีและสปอร์ที่แตกต่างกัน ได้แก่ เชื้อรา *Colletotricum* sp. 3 (9F) และ *Colletotricum* sp. 2 (5H) แยกได้จากใบว่านขันหมากต้นเล็กมีขนาดสปอร์ 10.0-15.0×2.5-5.0 และ 8.8-15.0×2.5-5.0 ไมโครเมตร ตามลำดับ *Colletotricum* sp. 1 (1M) และ *Phomopsis* sp. 6 (8J) แยกได้จากก้านใบและลำต้นของว่านขันหมากต้นเล็กมีขนาดสปอร์ 12.5-17.2×2.5-5.0 และ 15.0-22.5×2.5-5.0 ไมโครเมตร ตามลำดับ) *Colletotrichum* sp. (24B) และ *Colletotricum* sp. 9 (29C) แยกได้จากใบว่านขันหมากต้นใหญ่มีขนาดสปอร์ 7.5×10.0-15.0 และ 5.0×12.5-15.0ไมโครเมตร ตามลำดับ

จากการวิเคราะห์ชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานจากการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อและลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rRNA gene ของเชื้อราบริสุทธิ์ที่แยกได้จากตัวอย่างพืชว่านขันหมาก (ตารางที่ 3.5-3.8 และรูปที่ 3.8-3.17) เชื้อรา Endophytes ที่คัดแยกได้จากว่านขันหมากต้นเล็ก (ความสูงโดยเฉลี่ย 45

เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลางของลำต้นประมาณ 1 เซนติเมตร รูปที่ 3.1 และ 3.2) ตัวอย่างที่ 1 จากใบ ก้านใบ ลำต้น โคนต้น และราก จำนวน 8, 2, 2, 3 และ 5 ไอโซเลท ตามลำดับ รวมทั้งสิ้น 20 ไอโซเลท เป็นราสกุลเด่น คือ *Colletotrichum* และ *Phomopsis* ส่วนเชื้อรา Endophytes ที่คัดแยกได้จากว่านขันหมากต้นเล็กตัวอย่างที่ 2 จากใบ ก้านใบ ลำต้น โคนต้น และราก มีจำนวนน้อยกว่าตัวอย่างที่ 1 คือ คัดแยกได้จำนวน 3, 1, 2, 1 และ 1 ไอโซเลท ตามลำดับ รวมทั้งสิ้น 8 ไอโซเลท เป็นราสกุลเด่น คือ *Colletotrichum*, *Daldinia* และกลุ่ม Ascomycetes ที่ยังไม่สามารถระบุสกุลได้แน่นอนจากการศึกษาเบื้องต้นนี้

เชื้อรา Endophytes ที่แยกได้จากว่านขันหมากต้นใหญ่ (ความสูงโดยเฉลี่ย 60-120 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลางของลำต้น 1-2 เซนติเมตร รูปที่ 3.3 และ 3.4) ตัวอย่างที่ 1 ที่แยกได้จากใบ ก้านใบ ลำต้น โคนต้น และราก จำนวน 40, 2, 9, 3 และ 11 ไอโซเลท ตามลำดับ รวมทั้งสิ้น 65 ไอโซเลท เป็นราสกุลเด่น คือ *Colletotrichum*, *Phomopsis* และ *Guignardia* ในขณะที่เชื้อราที่คัดแยกได้จากว่านขันหมากต้นใหญ่ตัวอย่างที่ 2 จากใบ ลำต้น โคนต้น และราก จำนวน 6, 2, 1 และ 1 ไอโซเลท ตามลำดับ รวมทั้งสิ้น 10 ไอโซเลท เป็นราสกุลเด่น คือ *Colletotrichum*, *Phomopsis* และ *Xylaria*

พืชป่าชนิดว่านขันหมากที่พบเจริญในจังหวัดนครราชสีมาและนำมาศึกษา ชนิดที่มีขนาดต้นเต็มวัยเล็กและพืชที่มีขนาดต้นใหญ่ ไม่พบเชื้อรา Endophytes ในส่วนผลของทุกตัวอย่าง แต่ส่วนอื่นของพืชมีชนิดของรา Endophytes ที่ค่อนข้างคล้ายกัน กล่าวคือ ราที่คัดแยกได้จากว่านขันหมากต้นเล็กที่แยกได้จากใบ ก้านใบ ลำต้น โคนต้น และราก จำนวน 11, 3, 4, 4 และ 6 ไอโซเลท ตามลำดับ รวมทั้งสิ้น 28 ไอโซเลท เป็นราสกุลเด่น คือ *Colletotrichum*, *Daldinia* และ *Phomopsis* ขณะที่รา Endophytes ที่คัดแยกได้จากว่านขันหมากต้นใหญ่ จากใบ ก้านใบ ลำต้น โคนต้น และราก จำนวน 46, 2, 11, 4 และ 12 ไอโซเลท ตามลำดับ รวมทั้งสิ้น 75 ไอโซเลท จากที่ได้เลือกเชื้อราที่คัดแยกได้นี้จำนวน 26 ไอโซเลท มาวิเคราะห์ชนิด พบว่าเป็นราสกุลเด่น คือ *Colletotrichum*, *Guignardia*, *Phomopsis*, และ *Xylaria* ยังมีราที่คัดแยกได้อีกจำนวน 49 ไอโซเลท ที่ไม่ได้วิเคราะห์ชนิด เนื่องจากข้อจำกัดด้านงบประมาณและเวลาของโครงการวิจัย

ตารางที่ 3.7 ชนิดของเชื้อราที่แยกจากใบ ก้าน ลำต้น โคนต้น และรากของว่านขันหมากที่วิเคราะห์ด้วยลักษณะทางสัณฐานของเชื้อราที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อและลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S Ribosomal RNA gene (Partial sequence) เปรียบเทียบกับข้อมูลจาก GenBank (U.S.A)

ส่วนของว่านขันหมาก	Fungal isolate/ species		PCR Primers	DNA sequence size (bp)	Identification result compared to GenBank data base	Identity (%)
ต้นเล็ก						
ใบ	F3	*Glomerella* sp. 1	NS1/SR2	1,207	*Glomerella cinguiata*	96
	18G	*Colletotrichum* sp. 6	NS1/SR2	1,137	*Glomerella cinguiata*	95
	13g2	*Colletotrichum* sp. 7	NS1/SR2	600	*Colletotrichum coccodes*	99
	14h1	*Colletotrichum* sp. 4	NS1/SR2	1,206	*Colletotrichum dematium*	98
ก้านใบ	1M	*Colletotrichum* sp. 1	NS1/SR2	1,133	*Colletotrichum* sp.	98
	3M	*Colletotrichum* sp. 2	NS1/SR2	1,214	*Colletotrichum musae*	96
	41m	Ascomycete species	NS1/SR2	1,189	Ascomycete species	97
ลำต้น	4J2	*Plectosphaerella* sp.	NS1/SR2	1,070	*Plectosphaerella cucumerina*	98
	4J	*Colletotrichum* sp. 3	NS1/SR2	1,183	*Colletotrichum truncatum*	96
	15j2	*Colletotrichum* sp. 9	NS1/SR2	1,039	*Colletotrichum lindemuthianum*	96
	16J1	*Muscodor* sp.	NS1/SR2	1,027	*Rosellinia* sp., , *Muscodor* sp.	96
	16J1	*Muscodor* sp.	NS3/SR2	1,207	*Muscodor albus*	96
โคนต้น	49T	*Xylaria* sp. 5	NS1/SR2	1,209	Ascomycete species	97
ราก	46R	*Xylaria* sp. 2	NS1, SR2	952	Ascomycete species	97
	51R	*Xylaria* sp. 7	NS1/SR2	1,109	Ascomycete species	96
ต้นใหญ่						
ใบ	9บ ญ	*Guignardia mangiferae*	NS1/SR2	1,144	*Guignardia mangiferae*	99
	31a	*Hypoxylon* sp.	NS1/SR2	1,182	*Colletotrichum cirinans*	99
	34a	*Colletotrichum* sp. 10	NS1/SR2	1,182	*Hypoxylon haematostroma*	96
	17b	*Phomopsis* sp. 8	NS1/SR2	1,188	*Phomopsis* sp.	98
	24B	*Colletotrichum* sp.	NS1/SR2	1,194	*Colletotrichum* sp.	98
	23	*Colletotrichum* sp. 8	NS1/SR2	1,065	*Colletotrichum musae*	98
ลำต้น	2ล ขญ	*Glomerella* sp. 2	NS1/SR2	1,175	*Glomerella cinguiata*	93
	4ล ขญ	*Endothia* sp.	NS1/SR2	1,143	*Endothia* sp.	98
	8ล ขญ	*Colletotrichum* sp. 11	NS1/SR2	1,053	*Colletotrichum truncatum*	98
โคนต้น	11Q	*Xylaria* sp. 1	NS1/SR2	1,184	*Xylaria acuta*	98
	36Q	Unknown species	NS1/SR2	1,174	*Pestalotiopsis* sp.	97
	21q	*Colletotrichum* sp. 12	NS1/SR2	1,160	*Colletotrichum coccodes*	97
ราก	32n	*Xylaria* sp. 1	NS1/SR2	1,196	Ascomycete species	95

ตารางที่ 3.8 ชนิดของเชื้อรา Endophytes ที่แยกได้จากใบ ก้านใบ ลำต้น โคนต้น และรากของว่านขันหมากต้นเล็กตัวอย่างที่ 1 และต้นใหญ่ตัวอย่างที่ 1

ส่วนของว่านขันหมาก	Fungal species จากว่านขันหมาก:	
	ต้นเล็ก	ต้นใหญ่
ใบ	*Colletotrichum* sp. 2 (5H) (Spore size 8.8-15.0×2.5-5.0 µm)	*Colletotrichum* sp. 7 (22b)
	Colletotricum sp. 3 (9F) (Spore size 10.0-15.0×2.5-5.0 µm)	*Colletotrichum* sp. 8 (23c)
	Colletotrichum sp. 4 (14h)	*Colletotrichum* sp. 9 (29C) (Spore size 12.5-15.0×5.0 µm)
	Colletotrihcum sp. 6 (18G)	*Hypoxylon* sp. 10 (34a)
	Daldinia sp. 3 (35f)	*Phomopsis* sp. 8 (17b)
	Phomopsis sp. 1 (2H)	*Phomopsis* sp. 9 (19A)
	Phomopsis sp. 4 (6H)	*Phomopsis* sp. 10 (20B)
	Phomopsis sp. 5 (7H)	*Colletotrichum* sp. 12 (24B) (Spore size 12-10.0-15.0×7.5 µm)
	Colletotrichum sp. (13g)	*Phomopsis* sp. 15 (31a)
	Unknown species 1 (10G) (Spore size 5.0-10.0×5.0-7.5 µm)	Unknown species 5 (33b) (Spore size 5.0-7.5×2.5-5.0 µm)
ก้านใบ	*Colletotrichum* sp. 1 (1M) (Spore size 12.5-17.2×2.5-5.0 µm)	Unknown species 3 (27E)
	Colletotrichum sp. 2 (3M)	Unknown species 4 (28E)
	Unknown species 9 (41m)	
ลำต้น	*Colletotrihcum* sp. 5 (15j)	*Daldinia* sp. 2 (30D)
	Colletotrichum sp. 3 (4J)	*Phomopsis* sp. 13 (25d)
	Phomopsis sp. 6 (8J) (Spore size 15.0-22.5×2.5-5.0 µm)	*Phomopsis* sp. 14 (26d)
	Muscodor sp. (16j)	
โคนต้น	Unknown species 10 (42t)	Basidiomycete species 1 (12Q)
	Unknown species 12 (44T)	*Hypoxylon* sp. 1 (11Q)
	Xylaria sp. 4 (48T)	*Colletotrichum* sp. 11 (21q)
	Xylaria sp. 5 (49T)	Unknown species 6 (36Q)
ราก	Basidiomycete species 3 (45R)	Unknown species 7 (37N)
	Unknown species 11 (43r) (Spore size 7.5-8.8×2.5-5.0 µm)	Unknown species 8 (38N)
	Xylaria sp. 2 (46R)	*Xylaria* sp. 1 (32n)
	Xylaria sp. 3 (47R)	
	Xylaria sp. 6 (50R)	
	Xylaria sp. 7 (51R)	

หมายเหตุ: (Code), รหัสเส้นใยและ DNA

เชื้อรา Endophytes ที่มีรายงานส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่ม Deuteromycotina, Ascomycotina และ Basidiomycotina (Bacon and White, 2000; Mekkamol, 1998) ในระดับสกุลได้แก่ *Colletotrichum*, *Nodulosporium* และ Xylariaceae เป็น Endophytes ที่พบบนใบกล้วยไม้ดิน (เลขา มาโนช และคณะ, 2544) *Colletotrichum* sp. เป็นเชื้อราชนิดเด่นที่แยกได้จากพืชหลายชนิดได้แก่ ใบหน้าวัว (วงศ์ *Araceae*) (วสันณ์ เพชรรัตน์ และ นพวรรณ นิลสุวรรณ, 2550) กล้วย ขิง ถั่วเหลือง ลำใย และมะม่วง (Photita *et al*., 2005) กรณีกล้วยยังมีรายงานการพบรา *Guignardia* sp. เป็น Endophytes (Baldassari *et al*., 2008) รา ในสกุลนี้บาง Species เป็นสาเหตุของโรคพืช

Maehara *et al.* (2010) รายงานเชื้อรา Endophytes ชนิด *Phomopsis* spp., *Diaporthe* spp., *Penicillium* spp. และ *Arthrinium* sp. ที่แยกได้จากต้นอ่อนของควินิน *Cinchona ledgeriana* (วงศ์ *Rubiaceae*) ในเขตชวาตะวันตก ประเทศอินโดนีเซีย เชื้อรา *Phomopsis* sp. ยังพบในพืชอื่นได้แก่ พืช *Bauhinia brevipes* ในวงศ์ *Fabaceae* ที่มีเชื้อราที่อาศัยอยู่ในใบที่เป็นสกุลเด่น (Hilarino *et al.*, 2011) Sutjaritvorkul (2015) คัดแยกเชื้อรา *Absidia* spp., *Aspergillus niger*, *Aspergillus* sp., *Fusarium* spp., *Penicillum* sp., *Pestalotiopsis* spp., *Phomopsis* spp. และ *Phyllosticta* spp. ได้จากใบสะทอนสด (*Millettia utilis* Dunn) Ezra *et al*. (2004) รายงานรา Endophytes ชนิด *Muscodor albus* ที่แยกได้จาก *Cinnamomum zeylanicum* สามารถสร้าง Volatile organic compounds (VOCs) เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์บางชนิดได้

3.2.1.2 เชื้อราจากเครือสี่เหลี่ยม

จากการแยกเชื้อราที่อยู่ในส่วนใบและเถา (ลำต้น) ของเครือสี่เหลี่ยมที่พบเจริญในพื้นที่ธรรมชาติจังหวัดนครราชสีมา พบเชื้อราจากใบที่คัดแยกได้มากที่สุดจำนวน 13 ไอโซเลท และคัดแยกได้จากลำต้นจำนวน 9 ไอโซเลท (ตารางที่ 3.9) จากการระบุชนิดของเชื้อราด้วยลักษณะทางสัณฐานและลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rRNA gene (Partial sequence) เชื้อราที่แยกได้จากใบจำนวน 8, 1, 1 และ 1 ไอโซเลท ที่จัดอยู่ในสกุล *Glomerella*, *Hexagonia*, *Rosellinia* และ *Xylaria* ตามลำดับ จากเถา (ลำต้น) เป็นราในสกุล *Glomerella* ยังมีเชื้อราที่แยกได้จากใบอีก 1 ไอโซเลท และเถาอีก 6 ที่ยังมิได้วิเคราะห์ชนิดด้วยข้อจำกัดของงบประมาณและเวลาของโครงการ

ตารางที่ 3.9 ชนิดของเชื้อราที่แยกจากใบและเถา (ลำต้น) เครือสี่เหลี่ยมที่วิเคราะห์ด้วยลักษณะทางสัณฐานของเชื้อราที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อและลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S Ribosomal RNA gene (Partial sequence) เปรียบเทียบกับข้อมูลจาก GenBank (U.S.A)

ส่วนของเครือสี่เหลี่ยม	Fungal isolate/ species	PCR Primers	DNA sequence size (bp)	Identification result compared to GenBank data base	Identity (%)
ใบ ตัวอย่างที่ 1:					
1บ ส	*Glomerella* sp. 2	NS1/SR2	1,140	*Glomerella cingulata*	98
2บ ส	ND			ND	
3บ ส	*Glomerella* sp. 2	NS1/SR2	1,084	*Glomerella cingulata*	98
4บ ส	*Glomerella* sp. 2	NS1/SR2	1,105	*Glomerella cingulata*	98
5บ ส	*Glomerella* sp. 3	NS1/SR2	1,057	*Glomerella cingulata*	97
6บ ส	*Glomerella* sp. 4	NS1/SR2	1,084	*Glomerella mangiferae*	96
7บ ส	*Glomerella* sp. 5	NS1/SR2	1,084	*Glomerella mangiferae*	95
8บ ส	*Glomerella* sp. 5	NS1/SR2	1,050	*Glomerella mangiferae*	95
9บ ส	*Rosellinia* sp.	NS1/SR2	1,057	*Rosellinia* sp.	98
9บ ส	*Xylaria* sp.	NS3/SR2	1,057	*Xylaria* sp.	96
17บ ส	*Hexagonia* sp.	NS3/SR2	1,017	*Hexagonia hirta*	97
เถา (ลำต้น) ตัวอย่างที่ 1:					
10ข ส	ND			ND	
11ล ส	ND			ND	
12ล ส	ND			ND	
13ล ส	ND			ND	
14ล ส	*Glomerella* sp. 3	NS1/SR2	1,140	*Glomerella cingulata*	97
15ล ส	*Glomerella* sp. 6	NS1/SR2	1,002	*Glomerella cingulata*	93
18ล ส	ND			ND	
19ล ส	ND			ND	
ใบ ตัวอย่างที่ 2:					
1บ น	*Glomerella* sp. 1	NS1/SR2	1,201	*Glomerella mangiferae*	98
2บ น	Fungal endophyte	NS3/SR2	650	Fungal endophyte	98
เถา (ลำต้น) ตัวอย่างที่ 2:					
3ล น	ND			ND	

หมายเหตุ: -, ไม่พบเชื้อรา; ND, ไม่ได้วิเคราะห์ชนิดของเชื้อรา (not determined) เนื่องจากพบเชื้อราที่แยกได้จำนวนมากเกินกรอบงบประมาณและเวลาของโครงการวิจัย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.2.1.3 เชื้อราจากขันทองพยาบาท

จากการแยกเชื้อราจากพืชขันทองพยาบาทจำนวน 3 ตัวอย่าง รวบรวมจากที่พบเจริญในพื้นที่ธรรมชาติจังหวัดนครราชสีมา นำมาคัดแยกเชื้อราได้ทั้งสิ้น 58 ไอโซเลท เป็นเชื้อราที่แยกจากใบได้จำนวน 10, 8 และ 8 ไอโซเลท จาก 3 ตัวอย่างใบ ตามลำดับ และคัดแยกเชื้อราจากเปลือกของต้นได้จำนวน 10, 13 และ 9 ไอโซเลท ตามลำดับ ด้วยเวลาและงบประมาณที่จำกัดจึงเลี้ยงเชื้อราเพื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากอาหารที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อและเส้นใยของเชื้อราต่อเซลล์มะเร็ง ก่อนการระบุชนิดของเชื้อรา (ตารางที่ 3.14)

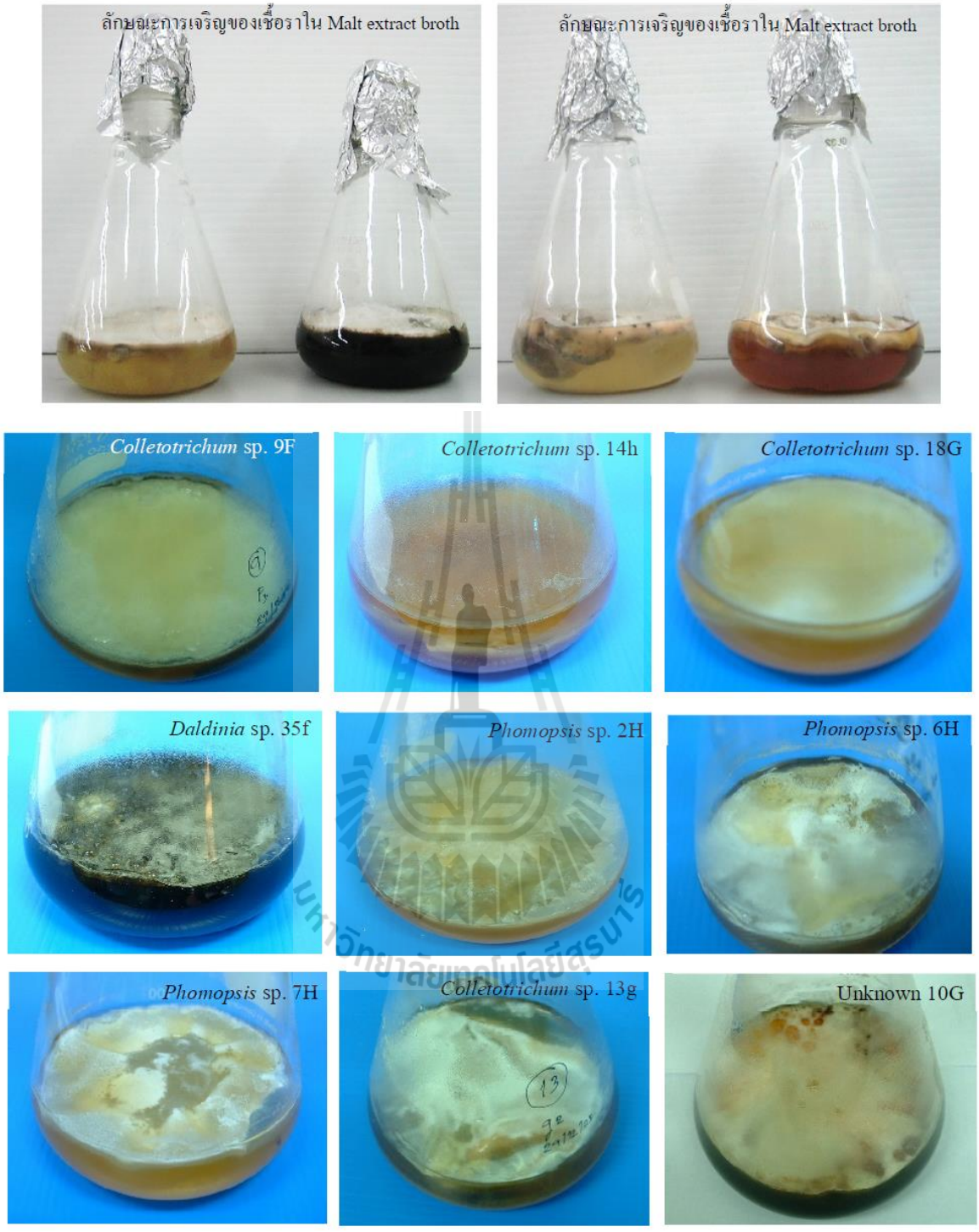
รายงานการระบุชนิดของเชื้อราที่แยกได้จากขันทองพยาบาท ได้แก่ Ditpan (2009) ได้คัดแยกเชื้อราจากกิ่ง ใบและเปลือกต้นขันทองพยาบาท ทำการศึกษาชนิดตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน ITS1-5.8S-ITS2 ของ rDNA จำแนกราไอโซเลต SM1 ที่อยู่ในส่วนของเปลือกต้นขันทองพยาบาทเป็น *Lasiodiplodia* sp. ซึ่งคาดว่าเป็น Anamorph ของรา *Botryosphaeria rhodina* (ลำดับนิวคลิโอไทด์เหมือนกัน 100%)

3.2.2 การจัดเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เชื้อรา

จัดเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เชื้อรา (Culture collection) ด้วยวิธีมาตรฐานของการเก็บเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์ให้มีชีวิตรอดได้นาน โดยยังมีความบริสุทธิ์และไม่เปลี่ยนแปลงลักษณะทางพันธุกรรม การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์โดยเก็บรักษาด้วย 2 วิธี คือ เก็บในสภาพแห้งบนกระดาษกรองและการเก็บรักษาในกลีเซอรอล 10% ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นวิธีการเก็บรักษาที่ดี

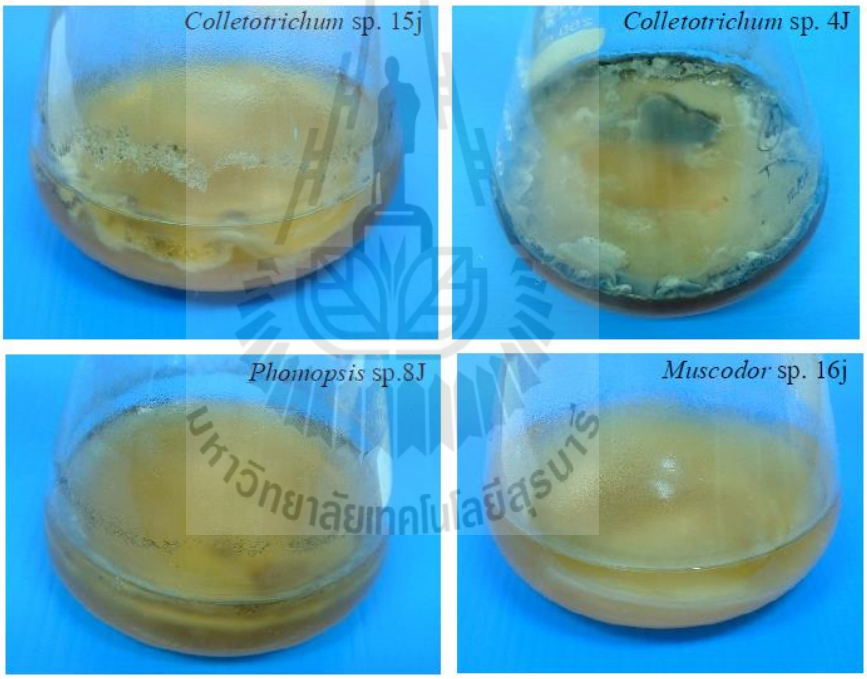
3.2.3 การทดลองผลิตสารออกฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง

เลี้ยงเชื้อราที่แยกได้ ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว Malt extract broth (ภาคผนวก ข 3) แบบ Batch culture ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-5 สัปดาห์ โดยสังเกตจากลักษณะและความสามารถในการเจริญ เชื้อราบางสายพันธุ์มีความสามารถในการเจริญได้เร็ว เมื่อเลี้ยงในลักษณะ Batch culture ไประยะเวลาหนึ่ง อาหารเริ่มหมดหรือมีการสะสมเมแทบอไลท์มากขึ้น เซลล์จะเริ่มตาย ดังนั้นจึงควรเก็บเกี่ยวผลผลิตเร็วกว่าเชื้อราบางสายพันธุ์ที่เจริญได้ช้า เก็บเกี่ยวส่วนของอาหารเหลวภายหลังการเลี้ยงเชื้อด้วยการกรองและปั่นแยกเซลล์หรือเส้นใยออกจากอาหาร และเตรียมผงแห้งของอาหารเหลวและเส้นใยเชื้อราด้วยเทคนิคการทำแห้งเยือกแข็ง (Lyophilization) จากการศึกษาในขั้นตอนนี้ได้เก็บเส้นใยแบบสุ่มตามชนิดของเชื้อราที่เลี้ยงได้ปริมาณมากเพื่อสกัดสารและทดสอบฤทธิ์ของสารต่อเซลล์มะเร็งของคน

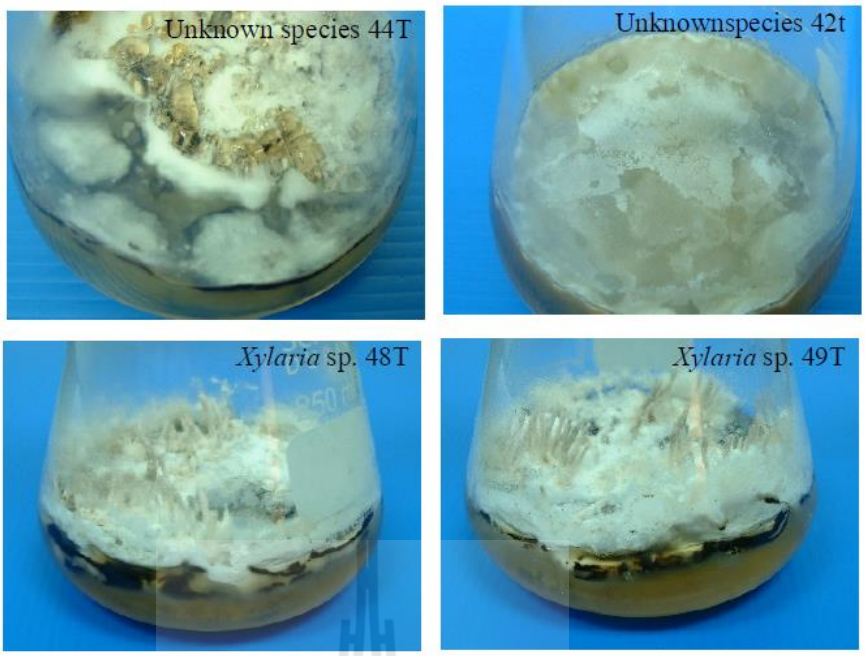


รูปที่ 3.18 ตัวอย่างลักษณะการเจริญของเชื้อราต่างไอโซเลทที่แยกได้จาก**ใบ**ของว่านขันหมากที่มีขนาด**ต้นเล็ก** ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Malt extract broth ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-5 สัปดาห์

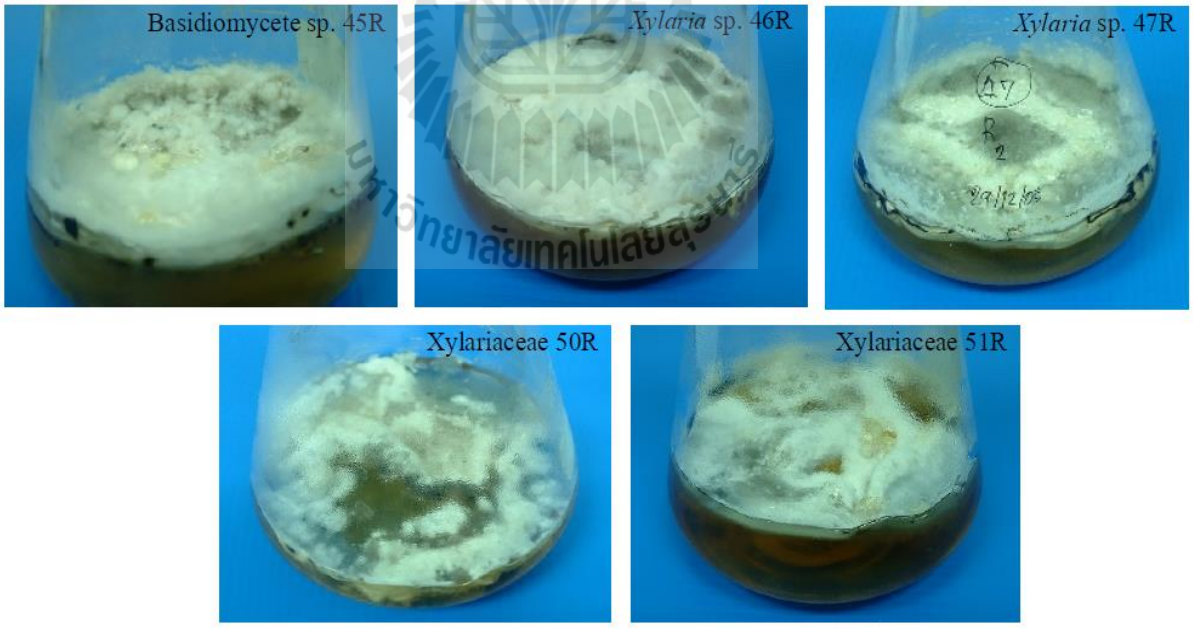
รูปที่ 3.19 ตัวอย่างลักษณะการเจริญของเชื้อราต่างไอโซเลทที่แยกได้จาก**ก้านใบ**ของว่านขันหมากที่มีขนาด**ต้นเล็ก** ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Malt extract broth ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-5 สัปดาห์



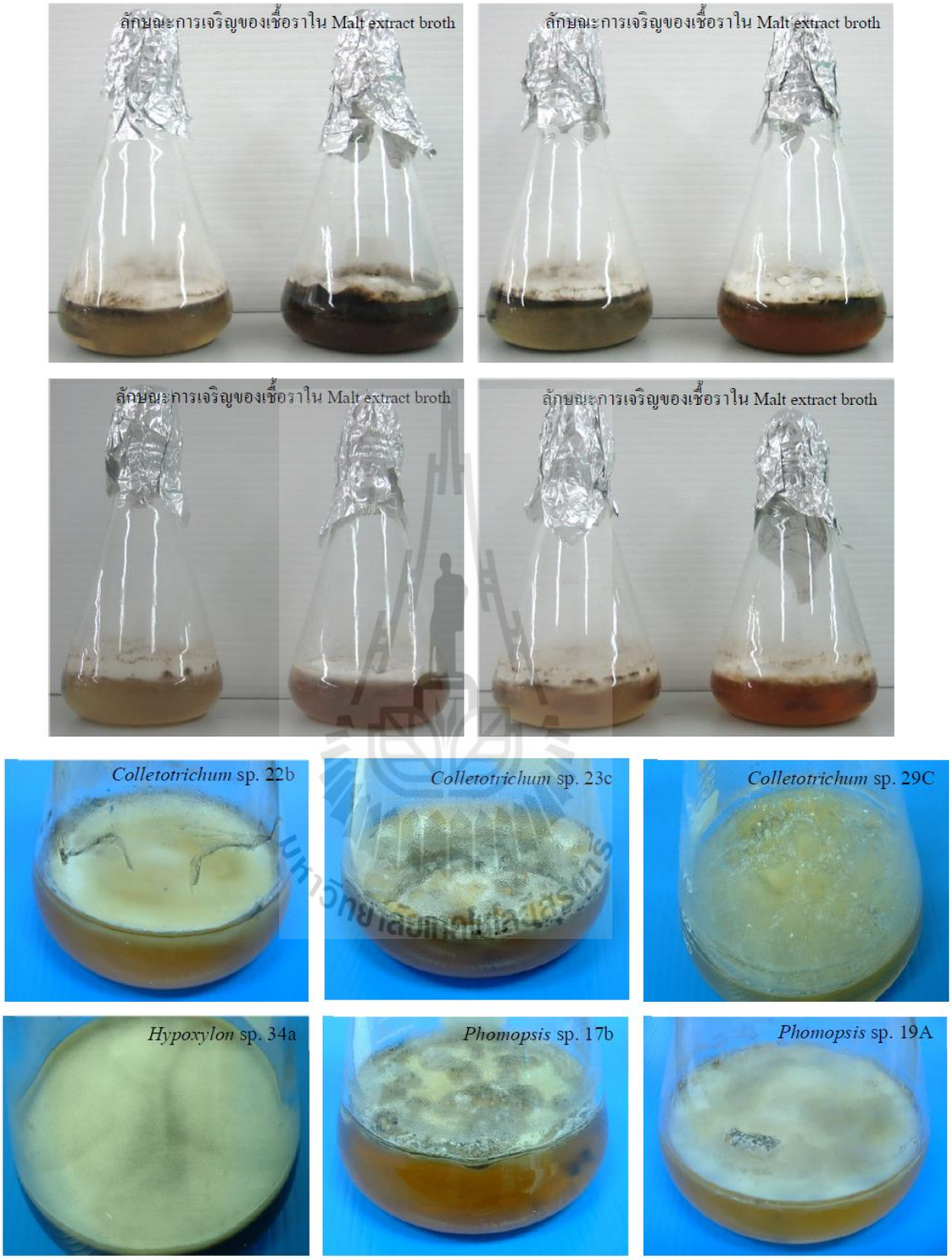
รูปที่ 3.20 ตัวอย่างลักษณะการเจริญของเชื้อราต่างไอโซเลทที่แยกได้จาก**ลำต้น**ของว่านขันหมากที่มีขนาด**ต้นเล็ก** ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Malt extract broth ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-5 สัปดาห์



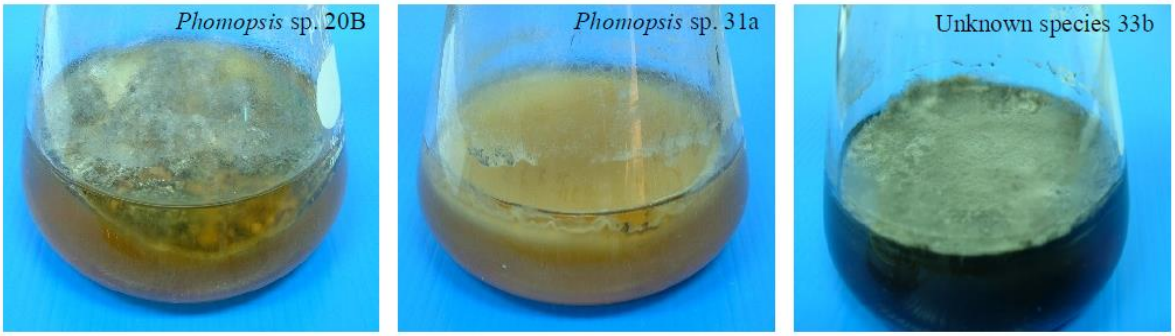
รูปที่ 3.21 ตัวอย่างลักษณะการเจริญของเชื้อราต่างไอโซเลทที่แยกได้จาก**โคนต้น**ของว่านขันหมากที่มีขนาด**ต้นเล็ก**ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Malt extract broth ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-5 สัปดาห์



รูปที่ 3.22 ตัวอย่างลักษณะการเจริญของเชื้อราต่างไอโซเลทที่แยกได้จาก**ราก**ของว่านขันหมากที่มีขนาด**ต้นเล็ก** ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Malt extract broth ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-5 สัปดาห์



รูปที่ 3.23 ตัวอย่างลักษณะการเจริญของเชื้อราต่างไอโซเลทที่แยกได้จาก**ใบ**ของว่านขันหมากที่มีขนาด**ต้นใหญ่** ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Malt extract broth ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-5 สัปดาห์

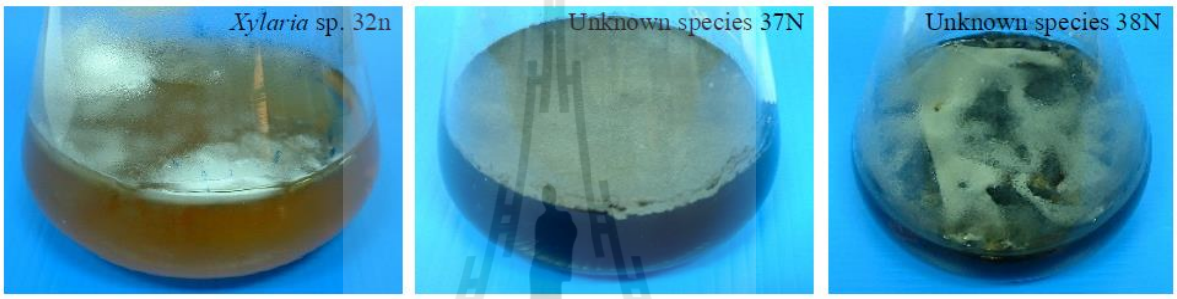


รูปที่ 3.23 (ต่อ) ตัวอย่างลักษณะการเจริญของเชื้อราต่างไอโซเลทที่แยกได้จาก**ใบ**ของว่านขันหมากที่มีขนาด**ต้นใหญ่** ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Malt extract broth ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-5 สัปดาห์

รูปที่ 3.24 ตัวอย่างลักษณะการเจริญของเชื้อราต่างไอโซเลทที่แยกได้จาก**ก้านใบ**ของว่านขันหมากที่มีขนาด**ต้นใหญ่** ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Malt extract broth ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-5 สัปดาห์

รูปที่ 3.25 ตัวอย่างลักษณะการเจริญของเชื้อราต่างไอโซเลทที่แยกได้จาก**ลำต้น**ของว่านขันหมากที่มีขนาด**ต้นใหญ่** ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Malt extract broth ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-5 สัปดาห์

รูปที่ 3.26 ตัวอย่างลักษณะการเจริญของเชื้อราต่างไอโซเลทที่แยกได้จาก**โคนต้น**ของว่านขันหมากที่มีขนาด**ต้นใหญ่** ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Malt extract broth ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-5 สัปดาห์



รูปที่ 3.27 ตัวอย่างลักษณะการเจริญของเชื้อราต่างไอโซเลทที่แยกได้จาก**ราก**ของว่านขันหมากที่มีขนาด**ต้นใหญ่** ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Malt extract broth ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-5 สัปดาห์

3.2.4 การศึกษาความเป็นพิษของสารที่ผลิตจากเชื้อราและจากพืชต่อเซลล์มะเร็ง

ทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบที่ได้จากการใช้ตัวทำละลาย Ethanol สกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อและเส้นใยของเชื้อรา Endophytes ต่อเซลล์มะเร็งที่เลี้ยงไว้ในหลอดทดลอง (*in vitro*) ด้วยวิธี MTT Colorimetric assay โดยเลือกเซลล์มะเร็งเยื่อบุช่องปาก (KB, Human epidermoid carcinoma cell line) เพื่อคัดกรองสารสกัดหยาบในเบื้องต้น จากนั้นจึงเลือกสารที่มีฤทธิ์ไปทดสอบกับเซลล์มะเร็งชนิดอื่นต่อไป พร้อมทั้งนำสารสกัดหยาบที่ได้จากส่วนของพืชเป้าหมาย ได้แก่ ใบ ก้านใบ ผล ลำต้น และราก และจากอาหารที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อราและทำให้เป็นผงแห้ง โดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ 3 ชนิด คือ Hexane, Chloroform และ Methanol มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเช่นเดียวกับสารสกัดหยาบจากเชื้อราโดยใช้เซลล์ปกติที่ได้จากไตของลิง (Vero, African green monkey (Kidney) cells) แทนเซลล์ปกติของคน โดยค่า IC_{50} (50% Inhibition concentration) มาตรฐานของสารบริสุทธิ์ที่สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็งต้องมีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 30 และ 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับสารสกัดหยาบและสารบริสุทธิ์ ตามลำดับ จึงจะจัดว่าเป็นสารมีฤทธิ์ที่ควรพัฒนาใช้ประโยชน์ต่อไป การศึกษาความเป็นพิษของสารที่ผลิตจากเชื้อราและจากพืชต่อเซลล์มะเร็งได้ผลดังนี้

3.2.4.1 ความเป็นพิษของสารที่ผลิตจากเชื้อราต่อเซลล์มะเร็ง

1) เชื้อราจากว่านขันหมาก

ทดสอบสารสกัดหยาบจากอาหารเหลวที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อแล้วจำนวน 49 ตัวอย่าง (ไอโซเลท) และสารจากเส้นใยของเชื้อรา จำนวน 17 ตัวอย่าง ด้านความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง พบว่าสารสกัดหยาบจากอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ตัวอย่าง (*Colletotrichum* sp. 9 และ *Xylaria* sp. 3) มีผลที่สังเกตได้ที่เหลือไม่มีผลในการต้านเซลล์มะเร็งชนิด KB (ตารางที่ 3.10) แต่สารสกัดด้วยเอทานอลที่สกัดจากเส้นใยของเชื้อราจำนวน 4 ตัวอย่าง (*Colletotrichum* sp. 11 และ *Xylaria* species 3, 4 และ 5) มีฤทธิ์อย่างอ่อนในการต้านเซลล์มะเร็งชนิด KB (ตารางที่ 3.11) จึงได้เลือกสารสกัดหยาบจากอาหารเลี้ยงเชื้อทดสอบกับเซลล์มะเร็งชนิดอื่นเพิ่มเติม คือ มะเร็งปากมดลูก (HeLa, Human cervical carcinoma) มะเร็งเต้านม (MCF-7, Human breast adenocarcinoma) และมะเร็งตับ (Hep-G2, Human hepatocellular carcinoma) พบว่าสารสกัดหยาบจากอาหารเลี้ยงเชื้อ จำนวน 1 ตัวอย่าง (*Colletotricum* sp. 9 จากใบของว่านขันหมากต้นใหญ่) ออกฤทธิ์ปานกลางในการต้านเซลล์มะเร็งเต้านม (ตารางที่ 3.12) อาจเนื่องจากชนิดและองค์ประกอบของอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อรา กรรมวิธีการเลี้ยง และชนิดของตัวทำลายที่ใช้ในการสกัดสารจากเชื้อรา ยังไม่เหมาะสมเท่าที่ควร

ตารางที่ 3.10 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ผลิตจากเชื้อรา Endophytes 49 ไอโซเลท แยกจากว่านขันหมาก ต่อเซลล์มะเร็งเยื่อบุช่องปาก (KB, Human epidermoid carcinoma cell line) ด้วยวิธี MTT Colorimetric assay

ส่วนของพืชที่แยกเชื้อรา/ Fungal species	**IC_{50} (μg/ml) ของสารสกัดหยาบที่ละลายใน:**	
	Dimethylsulphoxide (DMSO)	Deionized water
ใบ ต้นเล็ก:		
Phomopsis sp. 1 (2H)	>100	>100
Colletotrichum sp. 2 (5H)	>100	>100
Phomopsis sp. 4 (6H)	>100	>100
Phomopsis sp. 5 (7H)	>100	>100
Colletotrichum sp. 3 (9F)	>100	>100
Unknown species 1 (10G)	>100	>100
Colletotrichum sp. 7 (13g)	>100	>100
Colletotrichum sp. 4 (14h)	>100	>100
Colletotrichum sp. 6 (18G)	>100	>100
Daldinia sp. 3 (35f)	>100	>100

หมายเหตุ : IC_{50} (50% Inhibition concentration), ค่าความเข้มข้นของสารที่ใช้ทดสอบที่สามารถฆ่าเซลล์มะเร็งได้ครึ่งหนึ่ง เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Significant values: Crude extracts ≤30 μg/ml; Pure compounds ≤4 μg/ml)

ตารางที่ 3.10 (ต่อ) ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ผลิตจากเชื้อรา Endophytes 49 ไอโซเลท แยกจากว่านขันหมาก ต่อเซลล์มะเร็งเยื่อบุช่องปาก (KB, Human epidermoid carcinoma cell line) ด้วยวิธี MTT Colorimetric assay

ส่วนของพืชที่แยกเชื้อรา/ Fungal species	**IC_{50} (μg/ml) ของสารสกัดหยาบที่ละลายใน:**	
	Dimethylsulphoxide (DMSO)	Deionized water
ก้านใบ ต้นเล็ก:		
Colletotrichum sp. 1 (1M)	>100	>100
Ascomycete species 9 (41m)	>100	>100
Colletotrichum sp. 2 (3M)	>100	>100
ลำต้น ต้นเล็ก:		
Colletotrichum sp. 3 (4J)	>100	>100
Phomopsis sp. 6 (8J)	>100	>100
Colletotrichum sp. 5 (15j)	>100	>100
Muscodor sp. (16j)	>100	>100
โคนต้น ต้นเล็ก:		
Unknown species 10 (42t)	>100	>100
Unknown species 12 (44T)	>100	>100
Xylaria sp. 4 (48T)	>100	>100
Xylaria sp. 5 (49T)	>100	>100
ราก ต้นเล็ก:		
Unknown species 11 (43r)	>100	>100
Basidiomycete species 3 (45R)	>100	>100
Xylaria sp. 2 (46R)	45	45
Xylaria sp. 3 (47R)	**60**	**60**
Xylaria sp. 6 (50R)	>100	>100
Xylaria sp. 7 (51R)	>100	>100
ใบ ต้นใหญ่:		
Phomopsis sp. 8 (17b)	>100	>100
Phomopsis sp. 9 (19A)	>100	>100
Phomopsis sp. 10 (20B)	>100	>100
Colletotrichum sp. 7 (22b)	>100	>100

หมายเหตุ : IC_{50} (50% Inhibition concentration), ค่าความเข้มข้นของสารที่ใช้ทดสอบที่สามารถฆ่าเซลล์มะเร็งได้ครึ่งหนึ่ง เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Significant values: Crude extracts ≤30 μg/ml; Pure compounds ≤4 μg/ml)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 3.10 (ต่อ) ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ผลิตจากเชื้อรา Endophytes 49 ไอโซเลท แยกจากว่านขันหมาก ต่อเซลล์มะเร็งเยื่อบุช่องปาก (KB, Human epidermoid carcinoma cell line) ด้วยวิธี MTT Colorimetric assay

ส่วนของพืชที่แยกเชื้อรา/ Fungal species	**IC_{50} (μg/ml) ของสารสกัดหยาบที่ละลายใน:**	
	Dimethylsulphoxide (DMSO)	Deionized water
ใบ ต้นใหญ่ (ต่อ)**:**		
Colletotrichum sp. 9 (29C)	**54**	**54**
Colletotrichum sp. 12 (24B)	>100	>100
Phomopsis sp. 15 (31a)	>100	>100
Unknown species 5 (33b)	>100	>100
Hypoxylon sp. 10 (34a)	>100	>100
ก้าน ต้นใหญ่:		
Unknown species 3 (27E)	>100	>100
Unknown species 4 (28E)	>100	>100
ลำต้น ต้นใหญ่:		
Phomopsis sp. 13 (25d)	>100	>100
Phomopsis sp. 14 (26d)	>100	>100
Daldinia sp. 2 (30D)	>100	>100
โคนต้น ต้นใหญ่:		
Hypoxylon sp.1 (11Q)	>100	>100
Basidiomycete species 1 (12Q)	>100	>100
Colletotrichum sp. 11 (21q)	>100	>100
Unknown species 6 (36Q)	>100	>100
ราก ต้นใหญ่:		
Xylaria sp. 1 (32n)	>100	>100
Unknown species 7 (37N)	>100	>100
Unknown species 8 (38N)	>100	>100

หมายเหตุ : IC_{50} (50% Inhibition concentration), ค่าความเข้มข้นของสารที่ใช้ทดสอบที่สามารถฆ่าเซลล์มะเร็งได้ครึ่งหนึ่ง เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Significant values: Crude extracts ≤30 μg/ml; Pure compounds ≤4 μg/ml)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 3.11 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเชื้อรา Endophytes จำนวน 17 ไอโซเลท ที่แยกจากว่านขันหมากต่อเซลล์มะเร็งเยื่อบุช่องปาก (KB, Human epidermoid carcinoma cell line) ด้วยวิธี MTT Colorimetric assay

ส่วนของพืชที่นำมาแยกเชื้อรา/ Fungal species	IC_{50} (μg/ml)
ใบ ต้นเล็ก:	
Unknown species 1 (10G)	>100
11G	>100
Phomopsis sp. 13 (12G)	>100
โคนต้น ต้นเล็ก:	
Xylaria sp. 4 (48T)	>100
Xylaria sp. 4 (48T)	>100
Xylaria sp. 5 (49T)	**45**
Xylaria sp. 4 (48T)	**45**
ราก ต้นเล็ก:	
Basidiomycete species 3 (45R)	>100
Xylaria sp. 6 (50R)	>100
Xylaria sp. 7 (51R)	>100
Xylaria sp. 3 (47R)	**75**
Unknown species 11 (43r)	>100
Xylaria sp. 2 (46R)	>100
ใบ ต้นใหญ่:	
Unknown species 5 (33b)	>100
Colletotrichum sp. 11 (8ล ขญ)	**80**
ราก ต้นใหญ่:	
Unknown species 8 (38N)	>100
Unknown species 7 (37N)	>100

หมายเหตุ : IC_{50} (50% Inhibition concentration), ค่าความเข้มข้นของสารที่ใช้ทดสอบที่สามารถฆ่าเซลล์มะเร็งได้ครึ่งหนึ่ง เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Significant values: Crude extracts ≤30 μg/ml; Pure compounds ≤4 μg/ml)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 3.12 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากอาหารเลี้ยงเชื้อรา Endophytes จำนวน 8 ไอโซเลท ที่แยกได้จากว่านขันหมาก ต่อเซลล์มะเร็งของคน 4 ชนิด และเซลล์ปกติที่ได้จากไตของลิง แทนเซลล์ปกติของคน ด้วยวิธี MTT Colorimetric assay

ส่วนของพืชที่แยกเชื้อรา/	**IC_{50} (μg/ml) ต่อเซลล์มะเร็ง:**				
Fungal species	**KB**	**Hela**	**MCF-7**	**HepG2**	**Vero**
โคนต้น ต้นเล็ก:				-	-
Xylaria sp. 4 (48T)	>100	-	-		
Xylaria sp. 5 (49T)	>100	-	-	-	-
ราก ต้นเล็ก:					
Basidiomycete species 3 (45R)	>100	-	-	-	-
Xylaria sp. 2 (46R)	45.67±8.14	-	-	-	-
Xylaria sp. 3 (47R)	60.00±4.08	-	-	-	-
Xylaria sp. 6 (50R)	>100	-	-	-	-
Xylaria sp. 7 (51R)	>100	-	-	-	-
ใบ ต้นใหญ่:					
Colletotrichum sp. 9 (29C)	54.00±8.94	50.25±0.50	20.50±1.91	51.00±1.15	45.25±0.50

หมายเหตุ: IC_{50} (50% Inhibition concentration), ค่าความเข้มข้นของสารที่ใช้ทดสอบที่สามารถฆ่าเซลล์มะเร็งได้ครึ่งหนึ่ง เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Significant values: Crude extracts ≤30 μg/ml; Pure compounds ≤4 μg/ml)

KB, Human epidermoid carcinoma (มะเร็งเยื่อบุช่องปาก)

HeLa, Human cervical carcinoma (มะเร็งปากมดลูก)

MCF-7, Human breast adenocarcinoma (มะเร็งเต้านม)

Hep-G2, Human hepatocellular carcinoma (มะเร็งตับ)

Vero, African green monkey (Kidney) cells (เซลล์ปกติจากไตลิง)

2) เชื้อราจากเครือสี่เหลี่ยม

จากการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากอาหารเลี้ยงเชื้อของเชื้อรา Endophytes จากเครือสี่เหลี่ยม ต่อเซลล์มะเร็งเยื่อบุช่องปาก (KB, Human epidermoid carcinoma cell line) ด้วยวิธี MTT Colorimetric assay พบว่าสารสกัดหยาบเพียง 1 ตัวอย่าง (*Glomerella* sp. 2 ที่แยกได้จากใบ) จาก 21 ตัวอย่าง ผลิตจากเชื้อรา 21 ไอโซเลท มีค่า IC_{50} ที่แสดงความเข้มข้นของสารที่ใช้ทดสอบที่สามารถฆ่าเซลล์มะเร็งได้ครึ่งหนึ่งเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมนั้นเท่ากับ 75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตัวอย่างสารสกัดหยาบอีก 20 ตัวอย่าง มีค่ามากกว่า 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 3.13)

ตารางที่ 3.13 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผลิตจากเชื้อรา Endophytes ที่แยกจากเครือสี่เหลี่ยมจำนวน 21 ไอโซเลท ต่อเซลล์มะเร็งเยื่อบุช่องปาก (KB, Human epidermoid carcinoma cell line) ด้วยวิธี MTT Colorimetric assay

ส่วนของเครือสี่เหลี่ยมที่แยกเชื้อรา/ Fungal species/ isolate code	IC_{50} (μg/ml)
ใบ ตัวอย่างที่ 1:	
Glomerella sp. (1บ ส)	>100
2บ ส	>100
Glomerella sp. 2 (3บ ส)	>100
Glomerella sp. 2 (4บ ส)	**75**
Glomerella sp. 3 (5บ ส)	>100
Glomerella sp. 4 (6บ ส)	>100
Glomerella sp. 5 (7บ ส)	>100
Glomerella sp. 5 (8บ ส)	>100
Rosellinia sp. (9บ ส)	>100
Hexagonia sp. (17บ ส)	>100
ลำต้น ตัวอย่างที่ 1:	
10ข ส	>100
11ล ส	>100
12ล ส	>100
13ล ส	>100
Glomerella sp. 3 (14ล ส)	>100
Glomerella sp. 6 (15ล ส)	>100
18ล ส	>100
19ล ส	>100
ใบ ตัวอย่างที่ 2:	
Glomerella sp. 1 (1บ น)	>100
2บ น	>100
ลำต้น ตัวอย่างที่ 2:	
3ล น	>100

หมายเหตุ : IC_{50} (50% Inhibition concentration), ค่าความเข้มข้นของสารที่ใช้ทดสอบที่สามารถฆ่าเซลล์มะเร็งได้ครึ่งหนึ่ง เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Significant values: Crude extracts ≤30 μg/ml; Pure compounds ≤4 μg/ml)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3) เชื้อราจากขันทองพยาบาท

ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากจากอาหารเลี้ยงเชื้อและเส้นใยของเชื้อรา Endophytes จากขันทองพยาบาท ต่อเซลล์มะเร็งเยื่อบุช่องปาก (KB, Human epidermoid carcinoma cell line) ด้วยวิธี MTT Colorimetric assay พบว่าค่า IC_{50} ที่แสดงความเข้มข้นของสารที่ใช้ทดสอบที่สามารถฆ่าเซลล์มะเร็งได้ครึ่งหนึ่งเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมนั้น ตัวอย่างสารสกัดหยาบทุกตัวอย่าง (58 ตัวอย่าง) มีค่ามากกว่า 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 3.14) ซึ่งไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของคนที่ทดสอบ

ตารางที่ 3.14 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากอาหารเลี้ยงเชื้อและเส้นใยของเชื้อรา Endophytes จากขันทองพยาบาทจำนวน 58 ไอโซเลท ต่อเซลล์มะเร็งเยื่อบุช่องปาก (KB, Human epidermoid carcinoma cell line) ด้วยวิธี MTT Colorimetric assay

ส่วนของขันทองพยาบาทที่แยกเชื้อรา/ Fungal isolate	**IC_{50} (μg/ml) ของสารสกัดหยาบจาก:**	
	อาหารเลี้ยงเชื้อ	เส้นใย
ใบ ตัวอย่างที่ 1:		
ท1	>100	>100
ท2	>100	>100
ท3	>100	>100
ท4	>100	>100
ท5	>100	>100
ท6	>100	>100
ท7	>100	>100
ท8	>100	>100
ท9	>100	>100
ท10	>100	>100
เปลือกของต้น ตัวอย่างที่ 1:		
ท11	>100	>100
ท12	>100	>100
ท13	>100	>100
ท14	>100	>100
ท15	>100	>100
ท16	>100	>100
ท17	>100	>100
ท18	>100	>100
ท19	>100	>100
ท20	>100	**80**

หมายเหตุ : IC_{50} (50% Inhibition concentration), ค่าความเข้มข้นของสารที่ใช้ทดสอบที่สามารถฆ่าเซลล์มะเร็งได้ครึ่งหนึ่ง เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Significant values: Crude extracts ≤30 μg/ml; Pure compounds ≤4 μg/ml)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 3.14 (ต่อ) ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากอาหารเลี้ยงเชื้อและเส้นใยของเชื้อรา Endophytes จากขันทองพยาบาท 58 ไอโซเลท ต่อเซลล์มะเร็งเยื่อบุช่องปาก (KB, Human epidermoid carcinoma cell line) ด้วยวิธี MTT Colorimetric assay

ส่วนของขันทองพยาบาทที่แยกเชื้อรา/ Fungal isolate	**IC_{50} (μg/ml) ของสารสกัดหยาบจาก:**	
	อาหารเลี้ยงเชื้อ	เส้นใย
ใบ ตัวอย่างที่ 2:		
ท21	>100	>100
ท22	>100	>100
ท23	>100	>100
ท24	>100	>100
ท25	>100	>100
ท26	>100	>100
ท27	>100	>100
ท28	>100	>100
เปลือกของต้น ตัวอย่างที่ 2:		
ท29	>100	>100
ท30	>100	>100
ท31	>100	>100
ท32	>100	>100
ท33	>100	>100
ท34	>100	>100
ท35	>100	>100
ท36	>100	>100
ท37	>100	>100
ท38	>100	>100
ท39	>100	**80**
ท40	>100	>100
ท41	>100	>100
ใบ ตัวอย่างที่ 3:		
ท42	>100	>100
ท43	>100	>100
ท44	>100	>100
ท45	>100	>100
ท46	>100	>100
ท47	>100	>100
ท48	>100	>100
ท48	>100	>100

หมายเหตุ : IC_{50} (50% Inhibition concentration), ค่าความเข้มข้นของสารที่ใช้ทดสอบที่สามารถฆ่าเซลล์มะเร็งได้ครึ่งหนึ่ง เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Significant values: Crude extracts ≤30 μg/ml; Pure compounds ≤4 μg/ml)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 3.14 (ต่อ) ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากอาหารเลี้ยงเชื้อและเส้นใยของเชื้อรา Endophytes จากขันทองพยาบาท 58 ไอโซเลท ต่อเซลล์มะเร็งเยื่อบุช่องปาก (KB, Human epidermoid carcinoma cell line) ด้วยวิธี MTT Colorimetric assay

ส่วนของขันทองพยาบาทที่แยกเชื้อรา/ Fungal isolate	**IC_{50} (μg/ml) ของสารสกัดหยาบจาก:**	
	อาหารเลี้ยงเชื้อ	เส้นใย
เปลือกของต้น ตัวอย่างที่ 3:		
ท50	>100	>100
ท51	>100	**67**
ท52	>100	**85**
ท53	>100	>100
ท54	>100	>100
ท55	>100	>100
ท56	>100	>100
ท57	>100	>100
ท58	>100	>100

หมายเหตุ : IC_{50} (50% Inhibition concentration), ค่าความเข้มข้นของสารที่ใช้ทดสอบที่สามารถฆ่าเซลล์มะเร็งได้ครึ่งหนึ่ง เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Significant values: Crude extracts ≤30 μg/ml; Pure compounds ≤4 μg/ml)

4) เชื้อราจากถ่อนหรือทิ้งถ่อน

การศึกษาครั้งนี้มิได้สกัดแยกเชื้อราเนื่องจากมีแผนศึกษาพืช 2 ชนิด แต่ได้เก็บตัวอย่างมามากกว่าแผนเนื่องจากมีตัวอย่างพืชในช่วงเวลาศึกษา เพื่อคัดเลือกศึกษา

3.2.4.2 ความเป็นพิษของสารจากพืชต่อเซลล์มะเร็ง

1) ว่านขันหมาก

ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากว่านขันหมากที่เก็บรวบรวมจากที่พบเจริญในพื้นที่ธรรมชาติจังหวัดนครราชสีมา ด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ Hexane, Chloroform และ Methanol ต่อเซลล์มะเร็งเยื่อบุช่องปาก (KB, Human epidermoid carcinoma cell line) ด้วยวิธี MTT Colorimetric assay พบว่าค่า IC_{50} ที่แสดงความเข้มข้นของสารที่ใช้ทดสอบที่สามารถฆ่าเซลล์มะเร็งได้ครึ่งหนึ่งเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมนั้น ตัวอย่างสารสกัดหยาบ 2 ตัวอย่าง เป็นสารสกัดด้วย Hexane และ Chloroform จากรากและผลของว่านขันหมากต้นใหญ่ มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งเยื่อบุช่องปาก (KB) จึงนำสารสกัดทั้งหมดมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa) และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติที่ได้จากไตของลิง (Vero) แทนเซลล์ปกติของคน สารสกัดด้วย Hexane, Chloroform และ

Methanol จากรากและผลของว่านขันหมากต้นใหญ่นั้นมีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งเยื่อบุช่องปาก (KB) และมะเร็งปากมดลูก (HeLa) ได้ดีในระดับที่น่าสนใจ ที่ค่า IC_{50} ในช่วงระหว่าง 10-15 และ 23-34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 3.15) เฉพาะสารสกัดด้วย Hexane จากรากและผลที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติสูงกว่าที่ค่า IC_{50} ที่ค่า 3.11 และ 7.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 3.15) สารสกัด Methanol จากทุกส่วนของว่านขันหมากต้นใหญ่และว่านขันหมากต้นเล็ก ไม่มีผลในการต้านเซลล์มะเร็งทุกชนิดที่นำมาทดสอบ ที่เหลือมีค่ามากว่า 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 3.15)

จากผลการวิจัยในเบื้องต้นสามารถสรุปได้ว่าสารสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์จากส่วนของพืชในวงศ์ Araceae ชนิดที่มีชื่อทั่วไปว่าว่านขันหมาก ออกฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งที่เลี้ยงไว้ในหลอดทดลองได้ผลดีในระดับที่น่าสนใจ และแสดงฤทธิ์เฉพาะเจาะจงในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งแต่ละอวัยวะที่คัดเลือกมาทดสอบ จึงควรที่จะศึกษาในเชิงลึกต่อไป อย่างไรก็ตามสารสกัดบางชนิดที่สกัดจากรากและผลของพืช แสดงความเป็นพิษค่อนข้างสูงต่อเซลล์ปกติ จึงจำเป็นต้องศึกษาความเป็นพิษของพืชชนิดนี้ ก่อนที่จะนำไปทำการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาต่อไป

ตารางที่ 3.15 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากพืชป่าว่านขันหมากด้วย Hexane, Chloroform และ Methanol จากนั้นละลายในน้ำต่อเซลล์มะเร็ง 2 ชนิด และเซลล์ปกติจากไตลิง ด้วยวิธี MTT Colorimetric assay

ตัวอย่างจากส่วนของพืช	IC_{50} (μg/ml)								
	Crude hexane extract			Crude chroloform extract			Crude methanol extract		
	KB	HeLa	Vero	KB	HeLa	Vero	KB	HeLa	Vero
พืชต้นเล็ก 1									
ใบ	>100	>100	-	>100	>100	-	>100	>100	-
ต้น	>100	70.5±8.17	-	>100	>100	-	>100	>100	-
ราก	>100	80.83±4.92	-	85.0±0.5	87.0±2.74	-	83.0±0.5	80.0±1.75	-
ผล	>100	>100	-	>100	>100	-	>100	>100	-
พืชต้นใหญ่ 1									
ใบ	>100	>100	-	>100	>100	-	>100	>100	-
ต้น	>100	>100	-	>100	>100	-	>100	>100	-
ราก	12±0.63	15±3.08	3.11±1.72	10.5±0.04	10.0±0.02	-	11.5±0.12	10.0±0.55	-
ผล	34.0±2.33	33.67±2.67	7.25±0.67	25.0±0.03	27.0±0.05	-	23.0±0.63	25.0±0.65	-

หมายเหตุ : IC_{50} (50% Inhibition concentration), ค่าความเข้มข้นของสารที่ใช้ทดสอบที่สามารถฆ่าเซลล์มะเร็งได้ครึ่งหนึ่งเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Significant values: Crude extracts ≤30 μg/ml; Pure compounds ≤4 μg/ml)

KB, Human epidermoid carcinoma (มะเร็งเยื่อบุช่องปาก)

HeLa, Human cervical carcinoma (มะเร็งปากมดลูก)

Vero, African green monkey (Kidney) cells (เซลล์ปกติจากไตลิง)

2) เครือสี่เหลี่ยม

ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากเถา (ลำต้น) ก้านใบ และใบของเครือสี่เหลี่ยม เก็บรวบรวมจากที่พบเจริญในพื้นที่ธรรมชาติจังหวัดนครราชสีมา ด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ คือ Hexane, Chloroform และ Methanol ต่อเซลล์มะเร็งเยื่อบุช่องปาก (KB, Human epidermoid carcinoma cell line) ด้วยวิธี MTT Colorimetric assay พบว่าสารสกัดหยาบจากเถา (ลำต้น) ด้วย Chloroform มีค่า IC_{50} 65 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงความเป็นพิษสูงกว่าตัวอย่างสารสกัดหยาบที่เหลือที่มีค่ามากกว่า 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 3.16)

ตารางที่ 3.16 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากเถา (ลำต้น) ก้านใบ และใบของเครือสี่เหลี่ยม (จังหวัดนครราชสีมา) ต่อเซลล์มะเร็งเยื่อบุช่องปาก (KB, Human epidermoid carcinoma cell line) ด้วยวิธี MTT Colorimetric assay

สารสกัดหยาบจากเครือสี่เหลี่ยม	IC_{50} (μg/ml)
เถา (ลำต้น) สกัดด้วย:	
Hexane	>100
Chloroform	**65**
Methanol	>100
ก้านใบ สกัดด้วย:	
Hexane	>100
Chloroform	>100
Methanol	>100
ใบ สกัดด้วย:	
Hexane	>100
Chloroform	>100
Methanol	>100

หมายเหตุ : IC_{50} (50% Inhibition concentration), ค่าความเข้มข้นของสารที่ใช้ทดสอบที่สามารถฆ่าเซลล์มะเร็งได้ครึ่งหนึ่ง เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Significant values: Crude extracts ≤30 μg/ml; Pure compounds ≤4 μg/ml)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3) ขันทองพยาบาท

จากการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากใบ และเปลือก ของต้นขันทองพยาบาทตัวอย่างที่ 1 ที่เก็บรวบรวมจากที่พบเจริญในพื้นที่ธรรมชาติ จังหวัดนครราชสีมา ด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ Hexane, Chloroform และ Methanol ต่อเซลล์มะเร็งเยื่อบุช่องปาก (KB, Human epidermoid carcinoma cell line) ด้วยวิธี MTT Colorimetric assay พบว่าค่า IC_{50} ที่แสดงความเข้มข้นของสารที่ใช้ทดสอบที่สามารถฆ่าเซลล์มะเร็งได้ครึ่งหนึ่งเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมนั้น ทุกตัวอย่างมีค่ามากกว่า 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 3.17) ตามที่มีรายงาน สุวัชชัย มิสุนา และคณะ (2552) ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัดธรรมชาติของเปลือกต้นขันทองพยาบาทที่สกัดด้วย Ethanol มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa cells) ที่ค่า Cytoxicity เท่ากับ 80% ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อให้สารสกัดสำผัสกับเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สารสกัดสมุนไพรขันทองพยาบาทมีความเป็นพิษน้อยต่อเซลล์ปกติ ทั้ง Human embryonic kidney (HEK293) cell และ Mouse fibroblast (NIH3T3) cell

ตารางที่ 3.17 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากใบและเปลือกของต้นขันทองพยาบาท ที่พบในพื้นที่ธรรมชาติจังหวัดนครราชสีมา ต่อเซลล์มะเร็งเยื่อบุช่องปาก (KB, Human epidermoid carcinoma cell line) ด้วยวิธี MTT Colorimetric assay

สารสกัดจากขันทองพยาบาท	IC_{50} (μg/ml)
ใบ สกัดด้วย:	
Hexane	>100
Chloroform	>100
Methanol	>100
เปลือกของต้น สกัดด้วย:	
Hexane	>100
Chloroform	>100
Methanol	>100

หมายเหตุ : IC_{50} (50% Inhibition concentration), ค่าความเข้มข้นของสารที่ใช้ทดสอบที่สามารถฆ่าเซลล์มะเร็งได้ครึ่งหนึ่ง เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Significant values: Crude extracts $\leq$30 μg/ml; Pure compounds $\leq$4 μg/ml)

ด้านการใช้ประโยชน์ มีรายงานการใช้เปลือกของต้นขันทองพยาบาทในการรักษาโรคตับ ต่อมน้ำเหลือง โรคผิวหนัง และการติดเชื้อราตามภูมิปัญญาชาวบ้านไทย (Wutthithamavet, 1997) ขันทองพยาบาทยังมีฤทธิ์ Anti-HIV activity และยับยั้งการเพิ่มจำนวนของ Herpes simplex virus (HSV)

(Bourinbaiar and Lee-Huang, 1996) Crude extract ของพืชยังเป็นพิษกับ Human tumor cell lines หลายชนิด (Jahan *et al*., 2002) ทรงวิทย์ เขมเศรษฐ์ และ ปนัดดา ปุญญนิรันดร์ (2534) นำรากขันทองพยาบาทที่แห้งและบดละเอียดมาสกัดด้วย Hexane, Chloroform และ Methanol ตามลำดับ นำผลสกัด Hexane, Chloroform และ Methanol มาแยกโดยคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบรวดเร็วโดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ สามารถแยกสารที่เป็นของแข็งได้สามชนิด จุดหลอมเหลว 77-80 องศาเซลเซียส เป็นสารผสมของสาร 5 ชนิด ซึ่งคาดว่าเป็น Long chain aliphatic ester ผสมกับ Long chain aliphatic hydrocarbon สารที่สองเป็นผลึกรูปเข็ม ละเอียดสีขาว จุดหลอมเหลว 205.0-206.5 องศาเซลเซียส เป็นสารผสมของไตรเทอร์พีนอยด์ชนิดหนึ่งคือ α-Amyrin และไตรเทอร์พีนอยด์อีกชนิดคือ Bauerenol (D:C-Friedours-7-en-3-ol(3-β)) สารที่สามเป็นของแข็งเม็ดเล็ก สีขาวคล้ายน้ำตาล จุดหลอมเหลว 171-175 องศาเซลเซียส พบว่าเป็นน้ำตาลซูโครส

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 4
บทสรุป

4.1 สรุปผลการวิจัย

เชื้อรา Endophytes อาศัยอยู่ร่วมกับพืชแบบพึ่งพาอาศัย ไม่ก่อให้เกิดโรค ราได้รับสารอาหารจากพืช และช่วยส่งเสริมการเจริญของพืช ทำให้พืชดูดซับธาตุอาหารได้มากขึ้น สามารถทำให้พืชอาศัยต้านทานต่อโรคและแมลง การดำเนินงานของโครงการวิจัย 'เชื้อราที่อยู่ในพืชป่าและความเป็นพิษของสารจากเชื้อราและพืชต่อเซลล์มะเร็ง' มีผลสำเร็จของการวิจัยครบถ้วนตามวัตถุประสงค์ของโครงการ กล่าวคือ ได้ชนิดหรือสายพันธุ์ของเชื้อรา Endophytes ที่อยู่ในพืชป่าซึ่งพบเจริญในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย 3 ชนิด (จากแผนการดำเนินงานของโครงการที่ระบุ 2 ชนิด) ที่มีความเป็นไปได้สูงในการผลิตสารต้านเซลล์มะเร็ง ที่เป็นสารอินทรีย์สกัดด้วยตัวทำละลายที่ควรศึกษาเพื่อระบุชนิดของสารต่อไปในอนาคต และได้ข้อมูลฤทธิ์ของสารที่ผลิตจากเชื้อราบางชนิดที่อยู่ในพืชป่าและจากพืชนั้นๆ ที่เป็นพิษกับเซลล์มะเร็งของคน และเซลล์ปกติ ดังนี้

4.1.1 สายพันธุ์ของเชื้อราที่อยู่ในพืชป่า (Endophytic fungi)

ได้คัดแยกเชื้อราบริสุทธิ์ที่อยู่ในพืชป่าที่ไม่เป็นโรคหรือแมลงทำลาย จำนวนทั้งสิ้น 183 ไอโซเลท จากพืชที่เลือกมาศึกษา 3 ชนิด เมื่อวิเคราะห์ชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อราโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อและลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rRNA gene พบว่าเชื้อรา Endophytes จำนวน 103 ไอโซเลท จากพืชป่าชนิดแรกในวงศ์ Araceae ชนิดที่มีชื่อทั่วไปว่า 'ว่านขันหมาก' ซึ่งเป็นตัวอย่างว่านขันหมากที่มีขนาดต้นเล็ก (ความสูงโดยเฉลี่ย 45 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลางของลำต้นประมาณ 1 เซนติเมตร) จำนวน 2 ตัวอย่าง และว่านขันหมากที่มีขนาดต้นใหญ่ (ความสูงโดยเฉลี่ย 60-120 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลางของลำต้น 1-2 เซนติเมตร) 2 ตัวอย่าง พบว่ารา Endophytes ที่คัดแยกจากว่านขันหมากต้นเล็กตัวอย่างที่ 1 จากใบ ก้านใบ ลำต้น โคนต้น และราก จำนวน 8, 2, 2, 3 และ 5 ไอโซเลท ตามลำดับ รวมทั้งสิ้น 20 ไอโซเลท เป็นราสกุลเด่น คือ *Colletotrichum* และ *Phomopsis* ส่วนเชื้อรา Endophytes ที่คัดแยกได้จากว่านขันหมากต้นเล็กตัวอย่างที่ 2 จากใบ ก้านใบ ลำต้น โคนต้น และราก มีจำนวนน้อยกว่าตัวอย่างที่ 1 คือคัดแยกได้จำนวน 3, 1, 2, 1 และ 1 ไอโซเลท ตามลำดับ รวมทั้งสิ้น 8 ไอโซเลท เป็นราสกุลเด่น คือ *Colletotrichum*, *Daldinia* และกลุ่ม Ascomycetes ที่ยังไม่สามารถระบุสกุลได้แน่นอนจากการศึกษาเบื้องต้นนี้

เชื้อรา Endophytes ที่แยกได้จากว่านขันหมากต้นใหญ่ตัวอย่างที่ 1 ที่แยกได้จากใบ ก้านใบ ลำต้น โคนต้น และราก จำนวน 40, 2, 9, 3 และ 11 ไอโซเลท ตามลำดับ รวมทั้งสิ้น 65 ไอโซเลท เป็นราสกุลเด่น คือ *Colletotrichum*, *Phomopsis* และ *Guignardia* ในขณะที่เชื้อราที่คัดแยกได้จากว่าน

ขันหมากต้นใหญ่ตัวอย่างที่ 2 จากใบ ลำต้น โคนต้น และราก จำนวน 6, 2, 1 และ 1 ไอโซเลท ตามลำดับ รวมทั้งสิ้น 10 ไอโซเลท เป็นราสกุลเด่น คือ *Colletotrichum*, *Phomopsis* และ *Xylaria*

กรณีผลของพืชป่าชนิดว่านขันหมากที่พบเจริญในจังหวัดนครราชสีมาและนำมาศึกษา ชนิดที่มีขนาดต้นเต็มวัยเล็กและพืชที่มีขนาดต้นใหญ่ ไม่พบเชื้อรา Endophytes ในทุกตัวอย่าง แต่ส่วนอื่นของพืชทั้งสองขนาดต้นมีชนิดของรา Endophytes ที่ค่อนข้างคล้ายกัน กล่าวคือ ราที่คัดแยกได้จากว่านขันหมากต้นเล็กที่แยกได้จากใบ ก้านใบ ลำต้น โคนต้น และราก จำนวน 11, 3, 4, 4 และ 6 ไอโซเลท ตามลำดับ รวมทั้งสิ้น 28 ไอโซเลท เป็นราสกุลเด่น คือ *Colletotrichum*, *Daldinia* และ *Phomopsis* ขณะที่รา Endophytes ที่คัดแยกได้จากว่านขันหมากต้นใหญ่ จากใบ ก้านใบ ลำต้น โคนต้น และราก จำนวน 46, 2, 11, 4 และ 12 ไอโซเลท ตามลำดับ รวมทั้งสิ้น 75 ไอโซเลท จากที่ได้เลือกเชื้อราที่คัดแยกได้นี้จำนวน 26 ไอโซเลท มาวิเคราะห์ชนิด พบว่าเป็นราสกุลเด่น คือ *Colletotrichum*, *Guignardia*, *Phomopsis* และ *Xylaria* ยังมีราที่คัดแยกได้อีกจำนวน 49 ไอโซเลท ที่ไม่ได้วิเคราะห์ชนิด เนื่องจากข้อจำกัดด้านงบประมาณและเวลาของโครงการวิจัย

รา Endophytes จำนวน 22 ไอโซเลท คัดแยกได้จากพืชป่าชนิดที่สองมีชื่อทั่วไปว่า 'เครือสี่เหลี่ยม' เจริญในพื้นที่ธรรมชาติจังหวัดนครราชสีมา จากการแยกเชื้อราที่อยู่ในส่วนใบและเถา (ลำต้น) ของเครือสี่เหลี่ยม พบเชื้อราจากใบที่คัดแยกได้มากที่สุดจำนวน 13 ไอโซเลท และคัดแยกจากลำต้นได้จำนวน 9 ไอโซเลท เป็นราในสกุล *Glomerella* เป็นหลัก ทั้งเชื้อราที่แยกได้จากใบและเถาของเครือสี่เหลี่ยม และพบ Ascomycetes ในสกุล *Rosellinia* และ *Xylaria* จากใบอีกด้วย ทั้งนี้ยังมีรา Endophytes ที่แยกได้จากใบและเถาอีก 1 และ 6 ไอโซเลท ตามลำดับ ที่ยังมิได้วิเคราะห์ชนิด ด้วยข้อจำกัดของงบประมาณและระยะเวลาดำเนินงานของโครงการ

เชื้อรา Endophytes จากพืชป่าชนิดสุดท้ายมีชื่อทั่วไปว่า 'ขันทองพยาบาท' จากการแยกเชื้อราจากพืชขันทองพยาบาทจำนวน 3 ตัวอย่าง รวบรวมจากที่พบเจริญในพื้นที่ธรรมชาติจังหวัดนครราชสีมา ได้เชื้อราทั้งสิ้น 58 ไอโซเลท เป็นเชื้อราที่แยกจากใบได้จำนวน 26 ไอโซเลท และคัดแยกเชื้อราจากเปลือกของต้นได้จำนวน 32 ไอโซเลท ตามลำดับ ด้วยระยะเวลาและงบประมาณที่จำกัดจึงเลี้ยงเชื้อราเพื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากอาหารที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อและเส้นใยของเชื้อรา ต่อเซลล์มะเร็งก่อนการระบุชนิดของเชื้อรา

สายพันธุ์ของเชื้อราจากพืชป่าที่คัดแยกได้ มีการจัดเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ (Culture collection) ด้วยวิธีมาตรฐานของการเก็บเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์ให้มีชีวิตรอดได้นาน โดยยังมีความบริสุทธิ์และไม่เปลี่ยนแปลงลักษณะทางพันธุกรรม การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์โดยเก็บรักษาด้วย 2 วิธี คือ เก็บในสภาพแห้งบนกระดาษกรองและการเก็บรักษาในกลีเซอรอล 10% ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นวิธีการเก็บรักษาที่ดี สายพันธุ์ของเชื้อราที่อยู่ในพืชป่าเหล่านี้ สามารถนำไปสู่การค้นพบทางวิชาการระดับสูงและส่งผลถึงการใช้ประโยชน์ในการผลิตเมแทบอไลท์ในระดับอุตสาหกรรมได้

4.1.2 พืชป่าที่มีเชื้อราอยู่อาศัย

จากแผนการดำเนินงานต้องการตัวอย่างพืชป่าเป้าหมาย 2 ชนิด จากพืช 4 กลุ่มหลัก ที่ได้สำรวจพื้นที่จังหวัดนครราชสีมาและจังหวัดใกล้เคียงในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยที่มีการเจริญของพืชป่าในเบื้องต้น พืชเหล่านี้พบการเจริญทั้งในและนอกเขตป่าสงวน ช่วงเวลาของการดำเนินการวิจัย รวบรวมพืชได้ 4 ชนิด คือ ว่านขันหมาก (พืชวงศ์ Araceae) เครือสี่เหลี่ยม (พืชประเภทไม้เถา) ขันทองพยาบาท (พืชในวงศ์ Euphorbiaceae) และถ่อนหรือทิ้งถ่อน (พืชในวงศ์ Leguminosae) ตามระยะการเจริญ ณ ช่วงนั้น และดำเนินการวิเคราะห์ชนิดของพืชตามลักษณะทางสัณฐาน เพื่อเลือกพืช 2 ชนิด สำหรับศึกษาเชื้อรา Endophytes และความเข้มข้นของสารจากเชื้อราและพืชต่อเซลล์มะเร็ง

พืชป่าที่มีชื่อทั่วไปว่า 'ว่านขันหมาก' เป็นพืชที่คนไทยในชนบทนำมาใช้ในการรักษาโรคมะเร็งและโรคอื่นๆ ตามภูมิปัญญาพื้นบ้านอยู่แล้ว แต่ขาดความรู้และข้อมูลทางวิชาการ จากการรวบรวมตัวอย่างพืชป่าในวงศ์ Araceae ชนิดที่มีชื่อทั่วไปว่า 'ว่านขันหมาก' เป็นไม้ล้มลุก จากการสำรวจพบเฉพาะในพื้นที่ป่าเบญจพรรณ จังหวัดนครราชสีมา มีการบริโภคผลสุกกันอย่างกว้างขวางด้วยความเชื่อว่ารักษาโรคได้ครอบจักรวาล แต่ขาดข้อมูลทางวิชาการ ตัวอย่างพืชที่เก็บรวบรวมได้มี 2 ขนาดของต้นที่เจริญเต็มวัย คือ พืชที่มีขนาดต้นเล็ก มีความสูงโดยเฉลี่ย 45 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลางของลำต้นประมาณ 1 เซนติเมตร และพืชที่มีขนาดต้นใหญ่ มีความสูงโดยเฉลี่ย 60-120 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลางของลำต้น 1-2 เซนติเมตร ว่านขันหมากทั้งขนาดต้นเล็กและต้นใหญ่ที่พบเป็นพืชดอกมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Aglaonema simplex* (Blume) Blume ชื่อพ้อง *Aglaonema tenuipes* Engl. ได้เก็บตัวอย่างพืชที่มีขนาดต้นเล็กจำนวน 4 ซ้ำ และต้นใหญ่จำนวน 3 ซ้ำ เพื่อเลือกศึกษาเชื้อรา Endophytes และความเป็นพิษของสารจากเชื้อราและจากพืชต่อเซลล์มะเร็งของคน

พืชประเภทไม้เถาชนิดที่ชาวบ้านเรียกว่า 'เครือสี่เหลี่ยม' พบได้ทั่วไปในป่าเบญจพรรณแถบจังหวัดนครราชสีมาและบุรีรัมย์ ยังไม่สามารถระบุชนิดได้เนื่องจากพบเฉพาะระยะเป็นใบและลำต้น (เถา) ซึ่งเถามีลักษณะเป็นสี่เหลี่ยม เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.3-0.5 เซนติเมตร ใบเดี่ยวออกตรงข้ามเป็นคู่ กว้างประมาณ 4-5 เซนติเมตร ยาวประมาณ 10-12 เซนติเมตร 'เครือสี่เหลี่ยม' ที่เป็นชื่อท้องถิ่นของพืชที่พบในประเทศไทยก็มีรายงาน แต่มีลักษณะทางสัณฐานของพืชแตกต่างจากลักษณะของตัวอย่างพืชที่ทางโครงการได้เก็บมาศึกษา โดยลักษณะของพืชตามระบุในหนังสือสมุนไพรมีชื่อทั่วไปว่า เครือโงบ ชื่อวิทยาศาสตร์ *Uncaria homomalla* Miq. จัดอยู่ในวงศ์เข็ม (Rubiaceae)

พืชในวงศ์ Euphorbiaceae ชนิดที่มีชื่อเรียกทั่วไปว่า 'ขันทองพยาบาท' พบทั้งที่เป็นไม้พุ่มขนาดใหญ่และไม้ยืนต้นขนาดย่อม มีรายงานว่าเปลือกต้นมีรสเบื่อเมา มีสรรพคุณแก้โรคมะเร็ง เรื้อน คุดทะราด กลากและเกลื้อน ทำให้ฟันทน รักษาโรคตับพิการ แก้ประดง แก้พิษในกระดูก แก้โรคผิวหนัง ฆ่าพยาธิ ส่วนเนื้อไม้มีรสเบื่อเมา มีสรรพคุณแก้ลมพิษ แก้ไข้ แก้กามโรค ระบุว่าพบขันทองพยาบาทเจริญอยู่ในป่าฝนเขตร้อนแถบภาคกลาง ภาคตะวันออก และภาคใต้ของประเทศไทย เก็บจากพื้นที่ธรรมชาติในจังหวัดนครราชสีมาจำนวน 3 ตัวอย่าง ตามข้อมูลจากกรมป่าไม้ ขันทองพยาบาทมีชื่อ

วิทยาศาสตร์ว่า *Suregada multiflora* (A.Juss.) Baill. ชื่อพ้อง *Gelonium multiflorum* เป็นไม้พุ่มหรือไม้ต้นขนาดเล็ก สูง 8-10 เมตร ไม่ผลัดใบ

ถ่อน หรือ ทิ้งถ่อน อยู่ในวงศ์ *Leguminosae* เป็นไม้ดอกยืนต้น สูงถึง 10-20 เมตร มีชื่อทั่วไปว่า ถ่อนหรือทิ้งถ่อนพบเจริญในพื้นที่ธรรมชาติในจังหวัดนครราชสีมา มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Albizia procera* (Roxb.) Benth. สรรพคุณซึ่งเป็นข้อมูลของประเทศไทยระบุว่า รากและแก่น แก้เจ็บเอว แก้เจ็บหลัง แก้เส้นตึง แก้ท้องอืด และเปลือกต้นทำให้เจริญอาหาร แก้ธาตุพิการ

4.1.3 ข้อมูลด้านศักยภาพในการผลิตสารออกฤทธิ์ที่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้งจากเชื้อราและพืช

ข้อมูลด้านศักยภาพในการผลิตสารออกฤทธิ์ที่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้งจากเชื้อราและพืชจากการศึกษาความเป็นพิษของสารที่ผลิตจากเชื้อราและจากพืชต่อเซลล์มะเร็ง โดยทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบที่ได้จากอาหารที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อรา และการใช้ตัวทำละลาย Ethanol สกัดจากเส้นใยของเชื้อรา Endophytes และสารสกัดหยาบที่ได้จากส่วนของพืชเป้าหมาย ได้แก่ ใบ ก้านใบ ผล ลำต้น และราก ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ 3 ชนิด คือ Hexane, Chloroform และ Methanol ต่อเซลล์มะเร็งที่เลี้ยงไว้ในหลอดทดลอง (*in vitro*) ด้วยวิธี MTT Colorimetric assay โดยเลือกเซลล์มะเร็งเยื่อบุช่องปาก (KB, Human epidermoid carcinoma cell line) เพื่อคัดกรองสารสกัดหยาบในเบื้องต้น จากนั้นจึงเลือกสารที่มีฤทธิ์ไปทดสอบกับเซลล์มะเร็งชนิดอื่นที่พบมากและกำลังเป็นปัญหาต่อการรักษาผู้ป่วยในประเทศไทย คือ มะเร็งปากมดลูก (Human cervical carcinoma) มะเร็งเต้านม (Human breast adenocarcinoma, MCF-7) และมะเร็งตับ (Human hepatocellular carcinoma, Hep-G2) ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดที่มีต่อเซลล์ปกติโดยใช้เซลล์ปกติที่ได้จากไตของลิง (Vero, African green monkey kidney epithelial cell line) แทนเซลล์ปกติของคน วิเคราะห์ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งเป็นค่า IC_{50} (50% Inhibition concentration เป็นค่าความเข้มข้นของสารที่ใช้ทดสอบที่สามารถฆ่าเซลล์มะเร็งได้ครึ่งหนึ่งเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม) มาตรฐานของสารบริสุทธิ์ที่สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็งต้องมีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 30 และ 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับสารสกัดหยาบและสารบริสุทธิ์ ตามลำดับ จึงจะจัดว่าเป็นสารมีฤทธิ์ที่ควรพัฒนาใช้ประโยชน์ต่อไป การศึกษาความเป็นพิษของสารที่ผลิตจากเชื้อราและจากพืชต่อเซลล์มะเร็งได้ผลดังนี้

4.1.3.1 สารออกฤทธิ์จากเชื้อรา

ผลิตสารออกฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง ด้วยการเลี้ยงเชื้อราที่แยกได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว Malt extract broth แบบ Batch culture ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-5 สัปดาห์ ตามความสามารถในการเจริญของเชื้อราแต่ละไอโซเลท เก็บเกี่ยวส่วนของอาหารเหลวภายหลังการเลี้ยงเชื้อด้วยการกรองและปั่นแยกเซลล์หรือเส้นใยออกจากอาหาร และเตรียมผงแห้งของอาหารเหลวและเส้นใยเชื้อราด้วยเทคนิคการทำแห้งเยือกแข็ง (Lyophilization) จากการศึกษาในขั้นตอนนี้ได้เก็บเส้นใยแบบ

สุ่มตามชนิดของเชื้อราที่เลี้ยงได้ปริมาณมากเพื่อสกัดสารและทดสอบฤทธิ์ของสารต่อเซลล์มะเร็งของคน

ความเป็นพิษของสารที่ผลิตจากเชื้อราจากว่านขันหมากต่อเซลล์มะเร็ง ที่ทดสอบสารสกัดหยาบจากอาหารเหลวที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อแล้วจำนวน 49 ตัวอย่าง (ไอโซเลท) และสารจากเส้นใยของเชื้อรา จำนวน 17 ตัวอย่าง ด้านความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเยื่อบุช่องปาก (KB) พบว่าสารสกัดหยาบจากอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ตัวอย่าง (*Colletotrichum* sp. 9 และ *Xylaria* sp. 3) มีผลที่สังเกตได้ที่เหลือไม่มีผลในการต้านเซลล์มะเร็งชนิด KB (ตารางที่ 3.10) แต่สารสกัดด้วยเอทานอลที่สกัดจากเส้นใยของเชื้อราจำนวน 4 ตัวอย่าง (*Colletotrichum* sp. 11 และ *Xylaria* species 3, 4 และ 5) มีฤทธิ์อย่างอ่อนในการต้านเซลล์มะเร็งชนิด KB (IC_{50} เท่ากับ 80, 75, 45 และ 45 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) จึงได้ทดสอบสารสกัดหยาบจากอาหารเลี้ยงเชื้อกับเซลล์มะเร็งชนิดอื่นเพิ่มเติม คือ มะเร็งปากมดลูก (HeLa) มะเร็งเต้านม (MCF-7) และมะเร็งตับ (Hep-G2) พบว่าสารสกัดหยาบจากอาหารเลี้ยงเชื้อจำนวน 1 ตัวอย่าง (*Colletotricum* sp. 9 จากใบของว่านขันหมากต้นใหญ่) มีฤทธิ์อย่างอ่อนในการต้านเซลล์มะเร็งชนิด KB, HeLa, Hep-G2 และเซลล์ปกติ Vero (IC_{50} เท่ากับ 54, 50, 51 และ 45 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) แต่มีผลดีกับ MCF-7 (IC_{50} เท่ากับ 20.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

สำหรับเชื้อราจากเครือสี่เหลี่ยม จากการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากจากอาหารเลี้ยงเชื้อของเชื้อรา Endophytes จากเครือสี่เหลี่ยม ต่อเซลล์มะเร็งเยื่อบุช่องปาก (KB) พบว่าสารสกัดหยาบเพียง 1 ตัวอย่าง (*Glomerella* sp. 2 ที่แยกได้จากใบ) จาก 21 ตัวอย่าง ผลิตจากเชื้อรา 21 ไอโซเลท มีผลที่สังเกตได้ ค่า IC_{50} เท่ากับ 75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตัวอย่างสารสกัดหยาบที่เหลือมีค่ามากกว่า 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากจากอาหารเลี้ยงเชื้อและเส้นใยของเชื้อรา Endophytes จากขันทองพยาบาท ต่อเซลล์มะเร็งเยื่อบุช่องปาก (KB) พบว่าค่า IC_{50} ตัวอย่างสารสกัดหยาบทุกตัวอย่าง (58 ตัวอย่าง) มีค่ามากกว่า 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนเชื้อราจากถ่อนหรือทิ้งถ่อนไม่ได้สกัดแยกเชื้อราเนื่องจากมีแผนศึกษาพืช 2 ชนิด แต่ได้เก็บตัวอย่างมามากกว่าแผนเนื่องจากมีตัวอย่างพืชในช่วงเวลาศึกษา เพื่อคัดเลือกศึกษา

4.1.3.2 สารออกฤทธิ์จากพืช

ตัวอย่างพืชที่นำมาศึกษาจากแผนที่วางไว้มี 2 ชนิด แต่ได้เก็บตัวอย่างพืชป่าที่พบเจริญในพื้นที่ธรรมชาติในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มา 4 ชนิด คือ ว่านขันหมาก (*Aglaonema simplex* (Blume) Blume หรือ *Aglaonema tenuipes* Engl.) เครือสี่เหลี่ยม (ยังไม่สามารถระบุชนิดจำเป็นต้องติดตามการเจริญ) ขันทองพยาบาท (*Suregada multiflora* (A.Juss.) Baill.) และถ่อน (*Albizia procera* (Roxb.) Benth.) โดยสกัดสารจากส่วนของพืชตามที่จัดหาได้ในช่วงเวลาของการศึกษา สำหรับพืชป่าที่มีชื่อว่า “ถ่อน” ไม่ได้ทดลองสกัดตัวอย่างพืชที่เก็บมาเนื่องจากเป็นตัวอย่างที่เก็บมามากกว่าแผนการ

ดำเนินงาน จากการสกัดสารจากส่วนต่างๆ ของพืช ได้แก่ ใบ ลำต้นหรือเปลือก ผล และราก ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีความมีขั้วน้อยและมากขึ้นเป็นลำดับ 3 ชนิด คือ Hexane, Chloroform และ Methanol กรองแยกเอากากออกและระเหยสารสกัดดังกล่าวด้วยเครื่องระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporator) เพื่อแยกตัวทำละลายออกแล้วจึงละลายในน้ำหรือ Dimethylsulphoxide (DMSO) ให้ได้สารสกัดหยาบทดสอบกับเซลล์มะเร็งเยื่อบุช่องปาก (KB) เพื่อการคัดกรองก่อนทดสอบกับเซลล์มะเร็งชนิดอื่น

กรณีว่านขันหมาก ได้สกัดสารจากพืชต้นเล็ก 1 ตัวอย่าง และพืชต้นใหญ่ 1 ตัวอย่าง แต่ละตัวอย่างพืชมีส่วนของ ใบ ลำต้น (ไม่มีส่วนเปลือกที่แยกออกจากลำต้น) ผล และราก พบว่าสารสกัดหยาบจากใบและผลว่านขันหมากต้นเล็กที่สกัดด้วย Hexane และ Methanol มีผลผลิต (Yield) สูงสุด คือ 7.499 และ 7.587% ตามลำดับ สารสกัดหยาบจากใบ ผล ต้น และรากว่านขันหมากต้นเล็กที่สกัดด้วย Methanol ได้ Yield เท่ากับ 4.064, 7.587, 1.446 และ 0.717% ตามลำดับ ว่านขันหมากต้นใหญ่พบสารสกัดจากใบ ผล ต้น และราก ที่สกัดด้วย Methanol มีปริมาณสารสกัดหยาบสูงสุดที่ 1.925, 3.700, 3.633 และ 2.178% ตามลำดับ เมื่อทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากว่านขันหมาก พบตัวอย่างสารสกัดหยาบ 2 ตัวอย่าง เป็นสารสกัดจากรากและผลของว่านขันหมากต้นใหญ่ทุกตัวอย่างมีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งเยื่อบุช่องปาก (KB) และ มะเร็งเยื่อปากมดลูก (HeLa) ได้ดีในระดับที่น่าสนใจ ที่ค่า IC_{50} ในช่วงระหว่าง 10-15 และ 23-34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เฉพาะสารสกัดด้วย Hexane จากรากและผลที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติสูงกว่าที่ค่า IC_{50} ที่ค่า 3.11 และ 7.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สารสกัด Methanol จากทุกส่วนของว่านขันหมากต้นใหญ่และว่านขันหมากต้นเล็ก ไม่มีผลในการต้านเซลล์มะเร็งทุกชนิดที่นำมาทดสอบ ที่เหลือมีค่า IC_{50} มากว่า 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากผลการวิจัยในเบื้องต้นสามารถสรุปได้ว่าสารสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์จากส่วนของพืชในวงศ์ Araceae ชนิดที่มีชื่อทั่วไปว่าว่านขันหมาก ออกฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งที่เลี้ยงไว้ในหลอดทดลองได้ผลดีในระดับที่น่าสนใจ และแสดงฤทธิ์เฉพาะเจาะจงในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งแต่ละอวัยวะที่คัดเลือกมาทดสอบ จึงควรที่จะศึกษาในเชิงลึกต่อไป อย่างไรก็ตามสารสกัดบางชนิดที่สกัดจากรากและผลของพืช แสดงความเป็นพิษค่อนข้างสูงต่อเซลล์ปกติ จึงจำเป็นต้องศึกษาความเป็นพิษของพืชชนิดนี้ ก่อนที่จะนำไปทำการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาต่อไป

สารจากเถา (ลำต้น) ก้านใบ และใบของเครือสี่เหลี่ยมพบว่าปริมาณสารสกัดหยาบที่สกัดด้วย Methanol ที่มีความเป็นขั้วสูงสุดให้ผลผลิต (Yield เท่ากับ 4.460, 2.387 และ 6.990% ตามลำดับ) สูงกว่าตัวทำละลาย Hexane (Yield เท่ากับ 0.580, 0.772 และ 2.844% ตามลำดับ) และ Chloroform (Yield เท่ากับ 0.320, 0.704 และ 2.819% ตามลำดับ) ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากเถา (ลำต้น) ก้านใบ และใบของเครือสี่เหลี่ยม พบว่าค่าสารสกัดหยาบจากเถา (ลำต้น) ด้วย Chloroform มีค่า IC_{50} 65 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงความเป็นพิษสูงกว่าตัวอย่างสารสกัดหยาบที่เหลือที่มีค่ามากกว่า 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สารสกัดหยาบจากใบและเปลือกของลำต้นขันทองพยาบาท (ทางโครงการมิได้ตัดต้นพืช) พบว่าสารที่มีปริมาณมากได้จากใบ ปริมาณสารสกัดหยาบที่สกัดด้วย Methanol ได้ผลผลิต (Yield) สูงสุด คือ 6.273% ส่วนการสกัดด้วย Hexane และ Chloroform ซึ่งมีความเป็นขั้วต่ำกว่า Methanol ได้ Yield เท่ากับ 2.953 และ 2.646% ตามลำดับ สารสกัดหยาบจากใบและเปลือกของต้นขันทองพยาบาท ที่เก็บรวบรวมจากที่พบเจริญในพื้นที่ธรรมชาติจังหวัดนครราชสีมา ทุกตัวอย่างมีค่า IC_{50} มากกว่า 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

โดยภาพรวมผลของสารสกัดที่ได้จากเชื้อราและพืชที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งและที่เป็นพิษและไม่เป็นพิษกับเซลล์ปกติของคน สรุปได้ว่าสารสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์จากส่วนของพืชในวงศ์ Araceae ชนิดที่มีชื่อทั่วไปว่าว่านขันหมาก ออกฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งที่เลี้ยงไว้ในหลอดทดลองได้ผลดีในระดับที่น่าสนใจ และแสดงฤทธิ์เฉพาะเจาะจงในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งแต่ละอวัยวะที่คัดเลือกมาทดสอบ จึงควรที่จะศึกษาในเชิงลึกต่อไป อย่างไรก็ตามสารสกัดบางชนิดที่สกัดจากรากและผลของพืช แสดงความเป็นพิษค่อนข้างสูงต่อเซลล์ปกติ

4.1.4 องค์ความรู้ใหม่ด้านเชื้อราที่อยู่ในพืชป่าที่มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของประเทศไทย

องค์ความรู้ใหม่ด้านเชื้อราที่อยู่ในพืชป่าที่มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของประเทศไทย ดังระบุข้างต้นนี้ ช่วยส่งเสริมการอนุรักษ์และใช้ประโยชน์ทรัพยากรพืชและทรัพยากรจุลินทรีย์ที่คุ้มค่า

4.2 ข้อเสนอแนะ

ผลสำเร็จของโครงการวิจัย 'เชื้อราที่อยู่ในพืชป่าและความเป็นพิษของสารจากเชื้อราและพืชต่อเซลล์มะเร็ง' เป็นพื้นฐานสำคัญในการศึกษาพืชป่าและเชื้อราที่อาศัยในพืชป่าของประเทศไทย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และควรมีการศึกษาต่อในส่วนที่เกี่ยวข้องในประเด็นดังต่อไปนี้

1) การทดลองเพิ่มด้านสารออกฤทธิ์และการวิเคราะห์โครงสร้างของสารจากเชื้อรา Endophytes ที่คัดแยกได้ และจากพืชป่าที่ศึกษาในเบื้องต้นแล้ว

2) การศึกษาความหลากหลายของพืชป่าในกลุ่มว่านขันหมากที่เชื้อรา Endophytes ที่พบในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยที่อาศัยการศึกษาสารพันธุกรรม เพื่อให้สามารถระบุชนิด/สายพันธุ์ของพืชป่าได้ชัดเจนยิ่งขึ้น

3) การศึกษาเพิ่มเพื่อการระบุชนิด/สายพันธุ์ของเชื้อรา สายพันธุ์ธรรมชาติที่ศึกษาอาจเป็นชนิดหรือสายพันธุ์ใหม่ ทั้งนี้ยังมีราที่คัดแยกได้อีกจำนวนไม่น้อยกว่า 50 ไอโซเลท ที่มิได้วิเคราะห์ชนิด เนื่องจากข้อจำกัดด้านงบประมาณและเวลาของโครงการวิจัย แม้ไม่มีฤทธิ์ด้านความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ซึ่งอาจเนื่องจากชนิดและองค์ประกอบของอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อรา กรรมวิธีการเลี้ยง และชนิดของตัวทำลายที่ใช้ในการสกัดสารจากเชื้อรา ยังไม่เหมาะสม

4) การรวบรวมและจัดทำฐานข้อมูลของเชื้อรา Endophytes และพืชป่าที่ได้ศึกษา เพื่อการใช้ประโยชน์ต่อไป

บรรณานุกรม

กระทรวงสาธารณสุข. 2556. *สถิติสาธารณสุขฉบับเต็มปี 2556: สาเหตุการตาย, มะเร็ง*. กรุงเทพมหานคร: สำนักนโยบายและยุทธศาสตร์, กระทรวงสาธารณสุข.

เกียรติ สัจจลักษณ์. 2541. *ตำราเภสัชกรรมไทยแผนโบราณ*. นครราชสีมา: ศูนย์แพทย์เวชและเภสัชกรรมแผนโบราณทั่วไป บ้านสัจจลักษณ์โอสถ (เชาว์โอสถ).

จิตรา เกาะแก้ว เลขา มาโนช จีรพันธ์ วรพงษ์ นิพนธ์ วิสารทานนท์ ณรงค์ สิงห์บุระอุดม อำนาจ เอี่ยมวิจารณ์ และ วรวรรณ ปุณณะตระกูล. 2550. ราเอนโดไฟท์ในพืชสมุนไพรและการศึกษาการเป็นปฏิปักษ์ต่อราสาเหตุโรคพืชในห้องปฏิบัติการ. *เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45: สาขาพืช, 30 มกราคม - 2 กุมภาพันธ์ 2550, กรุงเทพมหานคร*: 571-578.

เต็ม สมิตินันทน์. 2518. *พันธุ์ไม้ป่าเมืองไทย*. กรุงเทพมหานคร: กรมป่าไม้. 252 หน้า.

ทรงวิทย์ เขมเศรษฐ์ และ ปนัดดา ปุญญนิรันดร์. 2534. *องค์ประกอบทางเคมีของรากขันทองพยาบาท* (Chemical Constituents of the Roots of *Suregada multiflorum* (*A. juss*) Baill.). โครงการพิเศษ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพมหานคร: คณะวิทยาศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

นันทวัน บุณยะประภัศร และ อรนุช โชคชัยเจริญพร. 2541. *สมุนไพร ไม้พื้นบ้าน* (2). กรุงเทพมหานคร: บริษัท ประชาชน จำกัด.

เพ็ญนภา ทรัพย์เจริญ. 2549. *สมุนไพรในอุทยานแห่งชาติภาคกลาง*. พิมพ์ครั้งที่ 2. นนทบุรี: ศูนย์พัฒนาตำราการแพทย์แผนไทย. 228 หน้า.

เลขา มาโนช กัญญา เจริญไทย คนึงนิจ บุศราคำ พรพิมล อธิปัญญาคม อภิรัชต์ สมฤทธิ์ และ อรอุมา เจียมจิตต์. 2544. เชื้อราโรคพืช รา Endophyte และราดินในประเทศไทย. *เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 39 สาขาพืช สาขาส่งเสริมและนิเทศศาสตร์เกษตร, 5-7 กุมภาพันธ์ 2544, กรุงเทพมหานคร*: 502-510.

เลขา มาโนช อรอุมา เพียซ้าย ธิดา เดชฮวบ จิตรา เกาะแก้ว อำนาจ เอี่ยมวิจารณ์ และ เสียงแจ๋ว พิริยพฤนต์. 2552. การควบคุมรา *Rhizoctonia* สาเหตุโรคข้าว ข้าวโพด และทุเรียน โดยใช้ราดินและราเอนโดไฟท์. *เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 47 สาขาพืช, 17 - 20 มีนาคม 2552, กรุงเทพมหานคร*: 542-547.

วสันณ์ เพชรรัตน์ และ นพวรรณ นิลสุวรรณ. 2550. *เอนโดไฟท์จากพืชวงศ์ Araceae และผลต่อเชื้อโรคของหน้าวัว*. กรุงเทพมหานคร: ฐานข้อมูลโครงสร้างพื้นฐานภาครัฐด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.

สุวัชชัย มิสุนา ธนเศรษฐ์ เสนาวงศ์ และ วิภา จึงจตุพรชัย. 2552. ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัดจากพืชสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ฮิสโทนดีอะเซทิลเลส. *Proceedings of the 12th National Graduate Research Conference, 12-23 February 2009, Khon Kaen, Thailand*: 109-116.

Arnold A.E., Maynard, Z., Gilbert, G.S., Coley, P.D, and Kursar, T.A. 2000. Are tropical fungal endophytes hyperdiverse. *Ecology*. 3: 267-274.

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J.H., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*. 25: 3389-3402.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. 1994. *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: John Wiley & Sons Inc.

Bacon, C.W. and White, J.F. 2000. *Microbial Endophytes*. New York: Mareel Decker, Inc.

Baldassari, R.B., Wickert, E., and de Goes, A. 2008. Pathogenicity, colony morphology and diversity of isolates of *Guignardia citricarpa* and *G. mangiferae* isolated from *Citrus* spp. *European Journal of Plant Pathology*. 120: 103-110.

Bara, R.A., Zerfaß, I., Lai, D., Lin, W., Debbab, A., Brötz-Oesterelt, H., and Proksch, P. 2013. New natural product from *Botryosphaeria australis*, an endophyte from mangrove *Avicennia marina*. *Squalen Bulletin of Marine and Fisheries Postharvest and Biotechnology*. 8(3): 139-145.

Bhakuni, D.S., Dhar, M.L., Dhar, M.M., Dhawan, B.N., Gupta, B., and Srimali, R.C. 1971. Screening of Indian plants for biological activity. Part III. *Indian Journal of Experimental Biology*. 9: 91-102.

Brunner, F. and Petrini, O. 1992. Taxonomy of some *Xylaria* spp. and xylariaceous identification of althiomycin from *Cystobactor fuscus* (Myxobacterales). *Journal of Antibiotics*. 35: 636-646.

Bourinbaiar, A.S. and Lee-Huang, S. 1996. The activity of plant-derived antiretroviral proteins MAP30 and GAP31 against herpes simplex virus in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 219(3): 923-9.

Chakravarthi, B.V.S.K., Sujay, R., Kuriakose, G.C., Karande, A.A, and Jayabaskaran, C. 2013. Inhibition of cancer cell proliferation and apoptosis-inducing activity of fungal taxol and its precursor baccatin III purified from endophytic *Fusarium solani*. *Cancer Cell International*. 13: 1-11.

Ditpan, K. 2007. Bioactive Compound from Endophytic Fungi from *Suregada multiflora* (A. Juss) Baill. *M.Sc* Thesis, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand.

Dunham, S.M., O'Dell, T.E., and Molina, R. 2003. Analysis of nrDNA sequence and microsatellite allele frequencies reveals a cryptic chanterelle species *Cantharellus cascadensis* sp. nov. from the American Pacific Northwest. *Mycological Research*. 107(10): 1163-1177.

Ezra, D., Hess, W.M., and Strobel, G.A. 2004. New endophytic isolates of *Muscodor albus*, a volatile-antibiotic-producing fungus. *Microbiology*. 150: 4023-4031.

Fong, Y.K., Anuar, S., Lim, H.P., Tham, F.Y., and Sanderson, F.R. 2000. A modified filter paper technique for long-term preservation of some fungal cultures. *Mycologist*. 14(3):128-131

Gardes, M. and Bruns, T.D. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*. 2: 113-118.

Gazis, R., Miadlikowska, J., Lutzoni, F., Arnold, A.E., and Chaverri P. 2012. Culture-based study of endophytes associated with rubber trees in Peru reveals a new class of *Pezizomycotina*: Xylonomycetes. *Molecular Phylogenetics and Evolution.* 65: 294-304.

Hallmann, J. and Sikora, R. 1998. Toxicity of fungal endophyte secondary metabolites to plant parasitic nematodes and soil-borne plant pathogenic fungi. *Life Science*. 102(2): 155-162.

Hilarino, M.P.A, Silveira, F.A.O, Oki, Y., Rodrigues, L., Santos, J.C., Junior, A.C., Fernandes, G.W., and Rosa, C.A. 2011. Distribution of the endophytic fungi community in leaves of *Bauhinia brevipes* (Fabaceae). *Acta Botanica Brasilica.* 25: 815-821.

Khuntong, S. and Sudprasert, W. 2008. Extraction and basic testing for antibacterial activity of the chemical constituents in suregada multiflorum. *Kasetsart Journal* (*Natural Science*)**.** 42(3): 429-434.

Lee, J., Yang, X., Schwartz, M., Strobel, G.A., and Clardy, J. 1995. The relationship between the forest tree in North America and an endophytic fungus. *Chemistry and Biology*. 2: 721-727.

Li, J.-Y., Sidhu, R.S., Bollon, A., and Strobel, G.A. 1998a. Stimulation of taxol production in liquid cultures of *Pestalotiopsis microspora*. *Mycological Research.* 102(4): 461-464.

Li, J.-Y., Sidhu, R.S., Ford, E.J., Long, D.M., Hess, W.M., and Strobel, G.A. 1998b. The induction of taxol production in the endophytic fungus-*Periconia* sp. from *Torreya grandifolia*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 20: 259-264.

Lumyong, S., Lumyong, P., and Hyde, K.D. 2004. Endophytes. *In* Jones, E.B.G., Tanticharoen, M., and Hyde, K.D. (eds.). *Thai Fungal Diversity*, pp. 197-205. Bangkok: BIOTEC, Thailand

Maehara, S., Simanjuntak, P., Ohashi, K., and Shibuya, H. 2010. Composition of endophytic fungi living in *Cinchona ledgeriana* (Rubiaceae). *Journal of Natural Medicines.* 64(2): 227-230.

Mekkamol, S. 1998. Endophytic Fungi in *Tectona grandis* L. (Teak). Ph.D. Thesis, Liverpool John Moores University, Liverpool, U.K.

Mingma, R., Pathom-aree, W., Trakulnaleamsai, S., Thamchaipenet, A. and Duangmal, K. 2014. Isolation of rhizospheric and root endophytic actinomycetes from Leguminosae plant and their

activities to inhibit soybean pathogen, *Xanthomonas campestris* pv. *glycine*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 30(1): 271-280.

Moncalvo, J.-M., Drehmel, D., and Vilgalys, R. 2000a. Variation in modes and rates of evolution in nuclear and mitochondrial ribosomal DNA in the mushroom genus *Amanita* (Agaricales, Basidiomycota): phylogenetic implications. *Molecular Phylogenetic and Evolution*. 16: 48-63.

Moncalvo, J.-M., Lutzoni, F.M., Rehner, S.A., Johnson, J., and Vilgalys, R. 2000b. Phylogenetic relationships of agaric fungi based on nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Systematic Biology*. 49: 278-305.

Petrini O. 1986. *Taxonomy of Endophytic Fungi in Aerial Plant Tissue*. Cambridge: Cambridge University Press, U.K.

Photita, W., Taylor, P.W.J., Ford, R., Hyde, K.D. and Lumyong, S. 2005. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum* species from herbaceous plants in Thailand. *Fungal Diversity*. 18: 117-133.

Rodtong, S., Thienhirun, S., and Whalley, A.J.S. 2000. New and interesting *Xylariaceae* from Tup Lan National Park. *Abstracts of the Tropical Mycology 2000, 25-29 April 2000, Liverpool, U.K.*: 30.

Smith, D. 1988. Culture and Preservation. In *Filamentous Fungi*, *Living Resource Biotechnology*, ed. D.L.Hawksworth and B.E. Kirsop, pp. 75-99. Cambridge: Cambridge University Press, U.K.

Sowemimo, A., Venables, L., Odedeji, M., Koekemoer, T., van de Venter, M., and Hongbing, L. 2015. Antiproliferative mechanism of the methanolic extract of *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb. (Fabaceae). *Journal of Ethnopharmacology.*159: 257-261.

Stierle, A., Strobel, G., and Stierle, D. 1993. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science*. 260: 214-216.

Strobel, G., Yang, X., Scars. J., Kramer, R., Sidhu, R.S., and Lless, W.M. 1996. Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallichiana*. *Microbiology, Reading U.K.* 142: 435-440.

Stierle, A., Strobel, G., and Stierle, D. 1993. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science*. 260: 214-216.

Strobel, G., Yang, X., Scars. J., Kramer, R., Sidhu, R.S., and Lless, W.M. 1996. Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallichiana*. *Microbiology*. 142: 435-440.

Sutjaritvorkul, T. 2015. Diversity analysis of endophytic fungi isolated from *Millettia utilis* Dunn (Leguminosae-Papilionoideae) and screening for antibacterial activity. *Pathumwan Academic Journal.* 5(13): 1-7.

Tanamatayarat, P., Limtrakul, P., Chunsakaow, S., and Duangrat, C. 2003. Screening of some Rubiaceous plants for cytotoxic activity against cervix carcinoma (KB-3-1) cell line. *Thai Journal of Pharmaceutical Sciences.* 27(3-4): 167-172.

Tewtrakul, S., Subhadhirasakula, S., Cheenpracha, S., Yodsaoue, O., Ponglimanont, C., and Karalai, C. 2011. Anti-inflammatory principles of *Suregada multiflora* against nitric oxide and prostaglandin E_2 releases. *Journal of Ethnopharmacology*. 133: 63-66.

Thienhirun, S., Rodtong, S., Phukhawan, N., and Suwannasai, N. 2003. Xylariaceous fungi in Phu Hin Rongkra National Park, Thailand. *Proceedings of the 2nd International Conference on Medicinal Mushroom and the International Conference on Biodiversity and Bioactive Compounds, 17-20 July 2003, Pattaya, Chonburi, Thailand*: 505-510.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In* Innis, M.A., Gelfand, H., Sninsky, J.S., and White T.J. (eds.). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, pp. 315-322. San Diego: Academic Press.

Wibulpolprasert, S. 2002. *Thailand Health Profile 1999-2000*. Bangkok: Bureau of Policy and Strategy, Ministry of Public Health.

Wutthithamavet, W. 1997. *Thai Traditional Medicine*, revised edition. Bangkok: Odean Store Press.

Zhang, J., Nishimoto, Y., Tokuda, H., Suzuki, N., Yasukawa, K., Kitdamrongtham, W., Akazawa, H., Manosroi, A., Manosroi, J., and Akihisa, T. 2013. Cancer chemopreventive effect of bergenin from *Peltophorum pterocarpum* wood. *Chemistry and Biodiversity.* 10: 1866-1875.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก สารละลายและน้ำยาเคมี

1. Lactophenol

Lactic acid	20.00	มิลลิลิตร
Phenol crystal	20.00	กรัม
Glycerol	40.00	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	20.00	มิลลิลิตร

เก็บในขวด (อาจเติม 0.05 กรัมของ Cotton blue หรือ Methylene blue)

2. Loading buffer

Sucrose	4.0	กรัม
Bromophenol blue	0.25	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. Melzer's reagent

Iodine	1.50	กรัม
Potassium iodide	5.00	กรัม
Chloral hydrate	100.00	กรัม
น้ำกลั่น	100.00	มิลลิลิตร

4. Mushroom lysis buffer

SDS (MW 288.38, 25% w/v)	50.000	กรัม
EDTA (MW372.2, 50 mM)	3.722	กรัม
NaCl (MW58.44, 75 mM)	0.876	กรัม
Tris-HCl (MW157.56, 50 mM)	1.576	กรัม
น้ำกลั่น (Microbiology grade)	200.00	มิลลิลิตร

ปรับ pH เท่ากับ 7.5 ด้วย 4N NaOH นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส (15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) เป็นเวลา 15 นาที

5. Sodium chloride solution (NaCl) 0.85%

Sodium chloride	85.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ	1,000.0	มิลลิลิตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส (15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) เป็นเวลา 15 นาที

10. Sodium dodecylsulfate (SDS) (10% w/v)

Sodium dodecylsulfate (SDS)	100.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ	1,000.0	มิลลิลิตร

6. TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA)

Tris-HCl	0.79	กรัม
EDTA (di-Sodium salt)	0.37	กรัม
Boric acid	5.54	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ	1,000.00	มิลลิลิตร

7. TES buffer

5mM Tris-HCl (pH 8.0)

5mM Sodium chloride

0.5mM EDTA

8. Tris-Borate (TBE) buffer (pH 8.0)

Tris-Base	10.77	กรัม
EDTA (di-Sodium salt)	0.93	กรัม
Boric acid	5.54	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ	1,000.00	มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข อาหารเลี้ยงจุลินทรีย์

1. Potato dextrose agar (PDA) (ATCC medium 336) ใช้แยกเชื้อรา

Potato, infusion form	300.00	กรัม
Dextrose (Glucose)	20.00	กรัม
Distilled water	1,000.00	มิลลิลิตร
Agar	15.00	กรัม

Potato infusion:

ปอกเปลือกมันฝรั่งและชั่ง 300 กรัม หั่นเป็นชิ้นเล็กใส่ในน้ำ 800 มิลลิลิตร ต้มจนสุก (แต่ไม่เละ) ประมาณ 15 นาที ถึง 1 ชั่วโมง กรองผ่านผ้าหรือตะแกรงที่มีช่องถี่ ใส่น้ำที่กรองได้ผสมส่วนผสมข้างต้น ปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 และนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เมื่ออาหารเย็นลงก่อนที่วุ้นแข็งตัวเติม Penicillin-G 20,000 units ต่อลิตร และ Streptomycin 40,000 units ต่อลิตร หรือ Chloramphenicol 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

หรือ Chlotetracycline 0.04 มิลลิกรัมต่อลิตร

2. Yeast extract-malt extract (YME) agar สำหรับเก็บรักษาเชื้อรา

Malt extract	10.00	กรัม
Yeast extract	4.00	กรัม
Glucose	4.00	กรัม
Agar	15.00	กรัม
Distilled water	1,000.00	มิลลิลิตร

pH 7.0

3. Malt yeast broth ใช้ทดสอบการสร้าง Secondary metabolites

Malt extract	20.00	กรัม
Yeast extract	10.00	กรัม
Distilled water	1,000.00	มิลลิลิตร

pH 5.5

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติม Streptomycin (20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และ Rose bengal (30 ไมโครกรัมต่อลิตร) หรือ Penicillin-G 20,000 units/l และ Streptomycin 40,000 units ต่อลิตร

4. Malt extract agar สำหรับแยกเชื้อรา

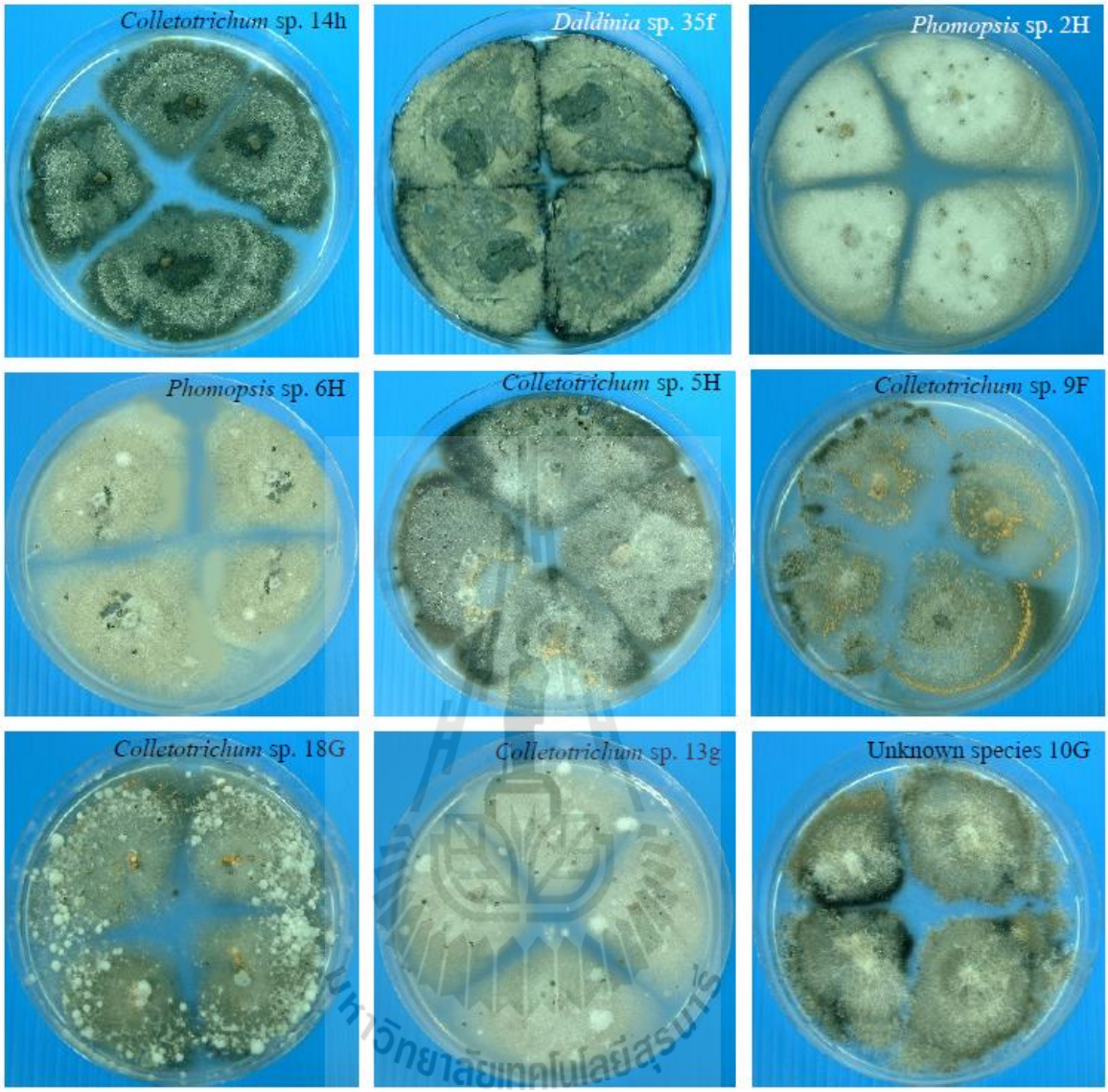
Malt extract	20.00	กรัม
Peptone	1.00	กรัม
Glucose	20.0	กรัม
Agar	15.00	กรัม

pH 4.5±0.2

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่น หรือ De-ionized water 1,000 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจนละลาย สมบูรณ์ ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ก่อนเทอาหารลงจานเลี้ยงเชื้อ เติม Antibiotics: Penicillin-G 40,000 Unit ต่อมิลลิลิตร และ Streptomycin 80,000 Unit ต่อมิลลิลิตร หรือ Chloramphenicol 5 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ Chlotetracycline 0.04 มิลลิกรัมต่อลิตร

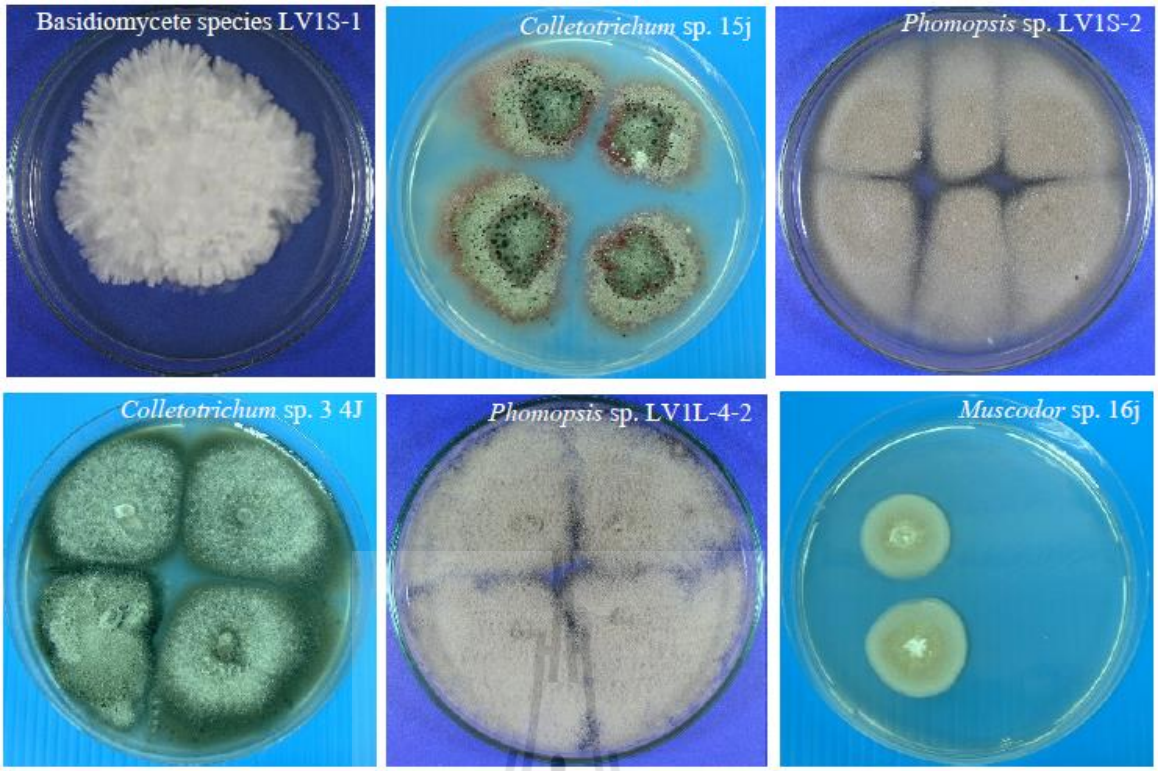
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาคผนวก ค รูปผนวก

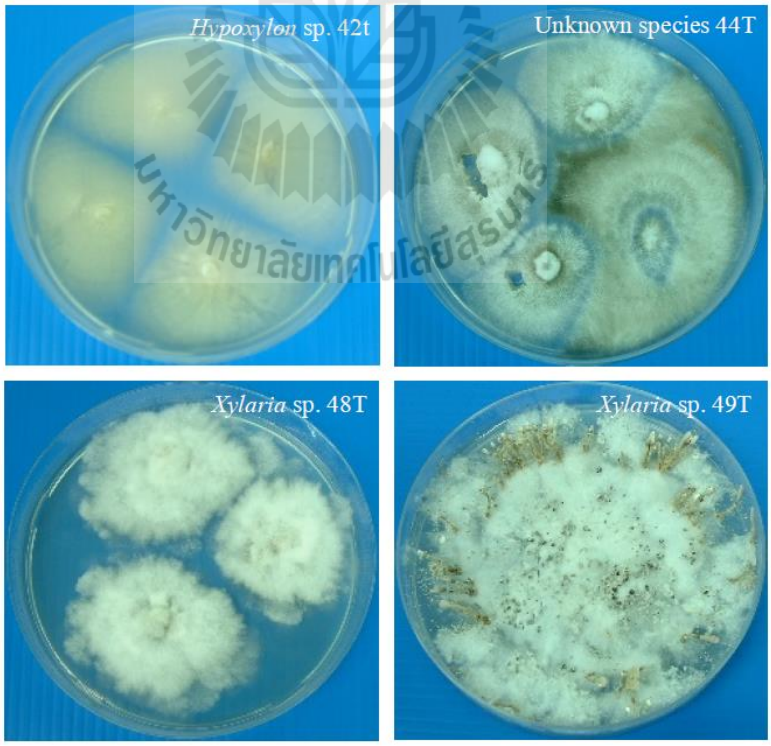


รูปผนวกที่ 1 ลักษณะโคโลนีของเชื้อราต่างไอโซเลทที่แยกได้จาก**ใบ**ของว่านขันหมากที่มีขนาด**ต้นเล็ก**

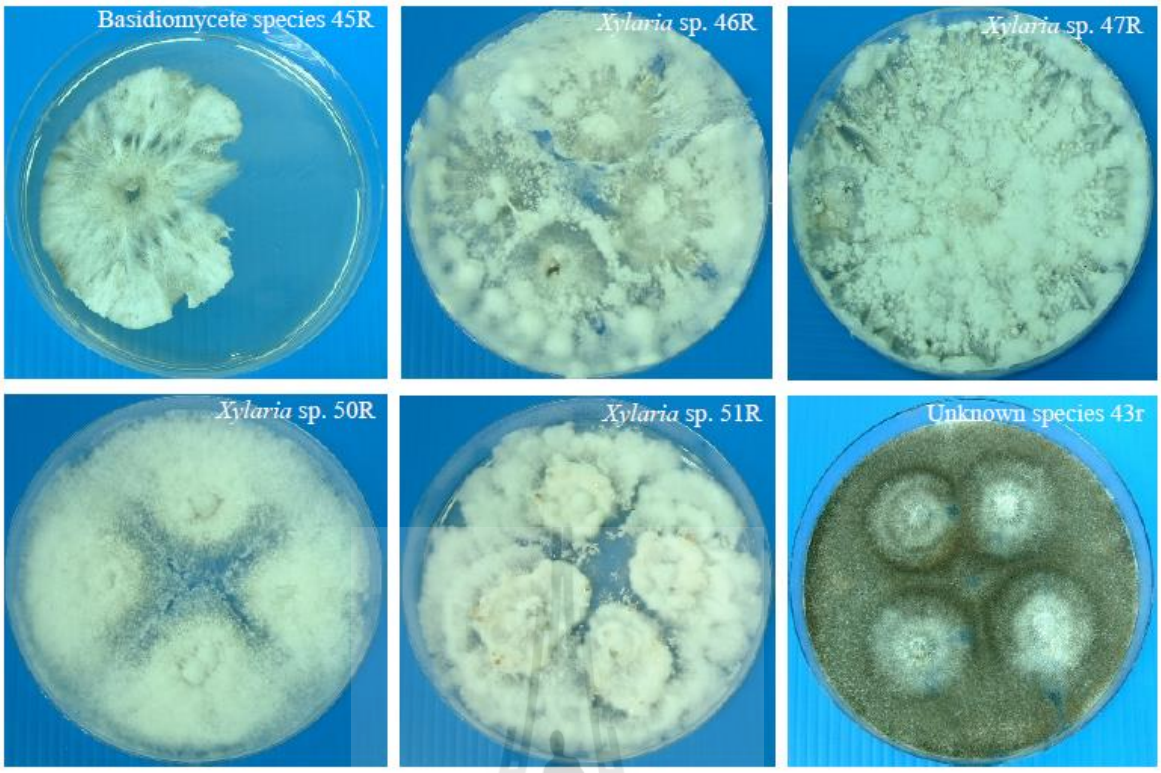
รูปผนวกที่ 2 ลักษณะโคโลนีของเชื้อราต่างไอโซเลทที่แยกได้จาก**ก้านใบ**ของว่านขันหมากที่มีขนาด**ต้นเล็ก**



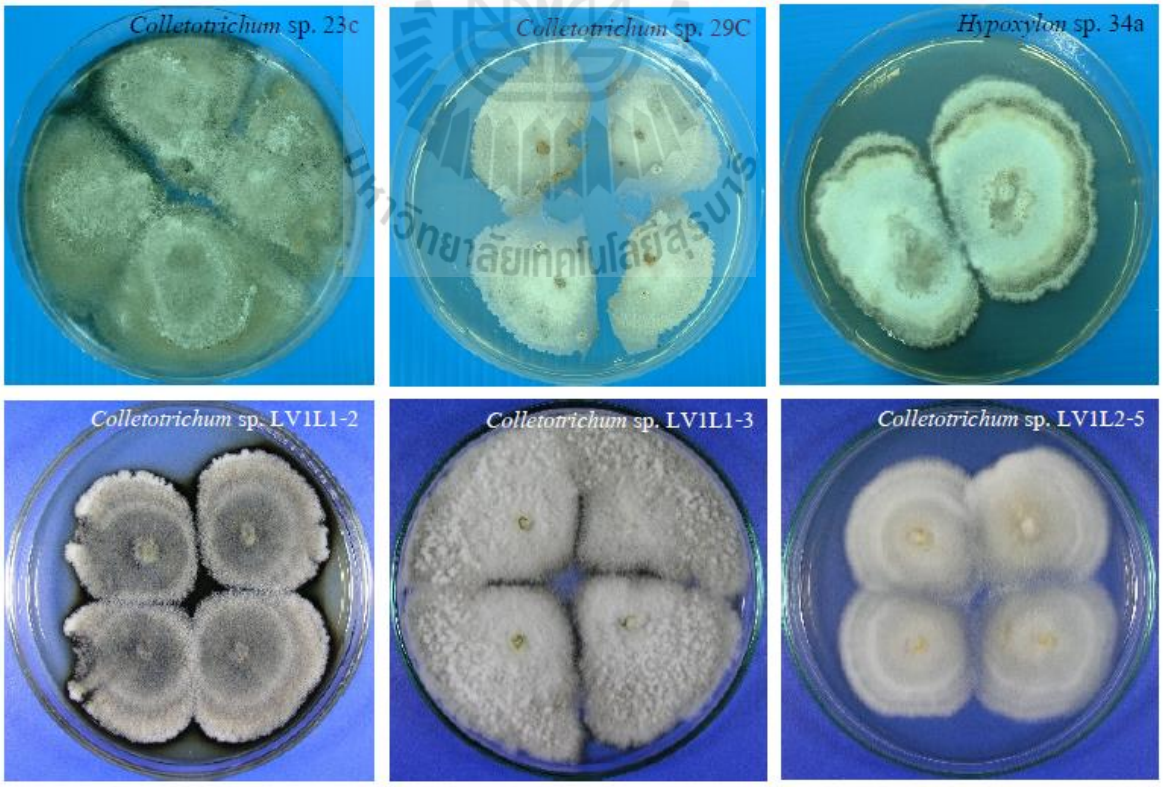
รูปผนวกที่ 3 ลักษณะโคโลนีของเชื้อราต่างไอโซเลทที่แยกได้จาก**ลำต้น**ของว่านขันหมากที่มีขนาดต้นเล็ก



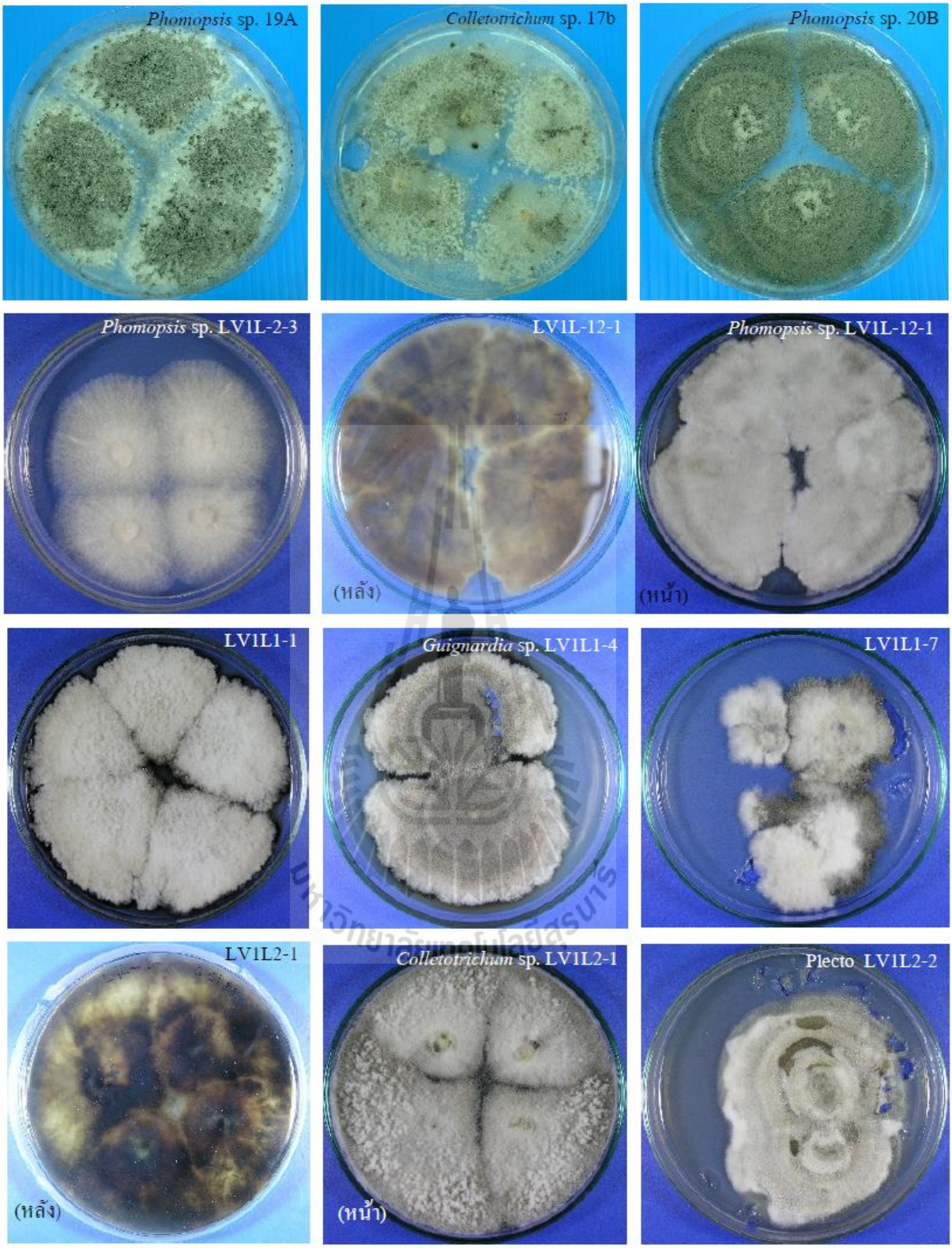
รูปผนวกที่ 4 ลักษณะโคโลนีของเชื้อราต่างไอโซเลทที่แยกได้จาก**โคนต้น**ของว่านขันหมากที่มีขนาดต้นเล็ก



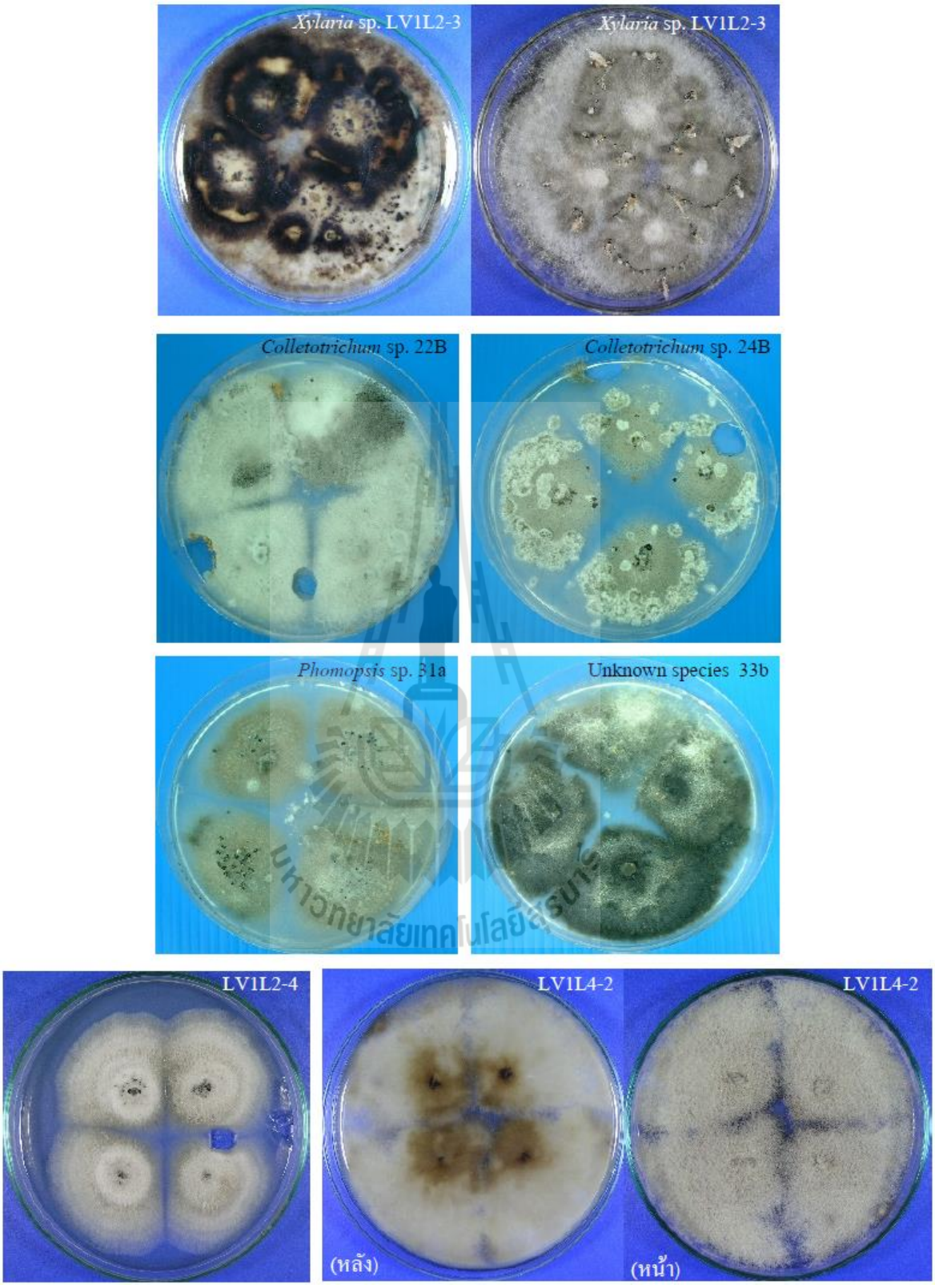
รูปผนวกที่ 5 ลักษณะโคโลนีของเชื้อราต่างไอโซเลทที่แยกได้จาก**ราก**ของว่านขันหมากที่มีขนาด**ต้นเล็ก**



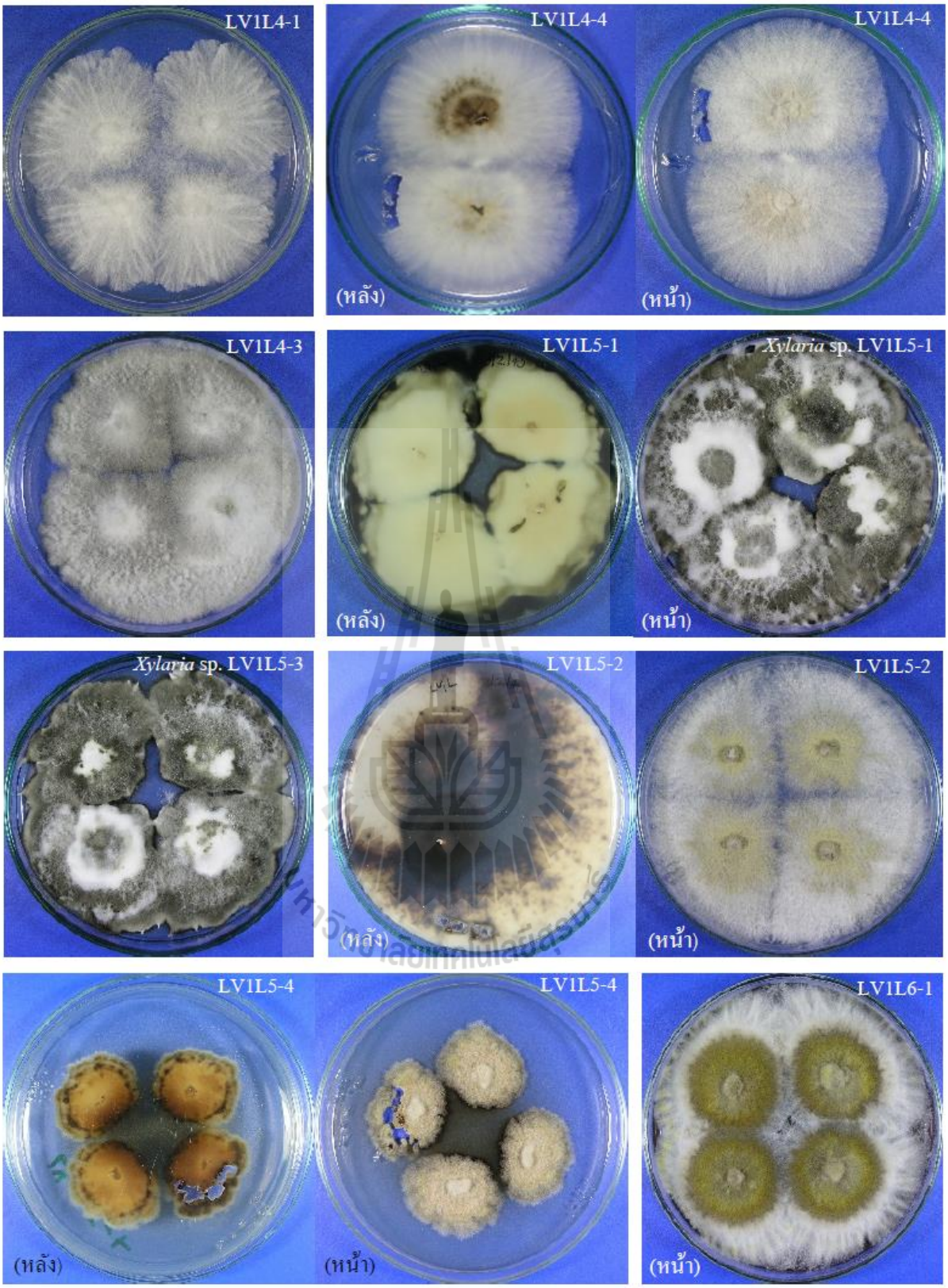
รูปผนวกที่ 6 ลักษณะโคโลนีของเชื้อราต่างไอโซเลทที่แยกได้จาก**ใบ**ของว่านขันหมากที่มีขนาด**ต้นใหญ่**



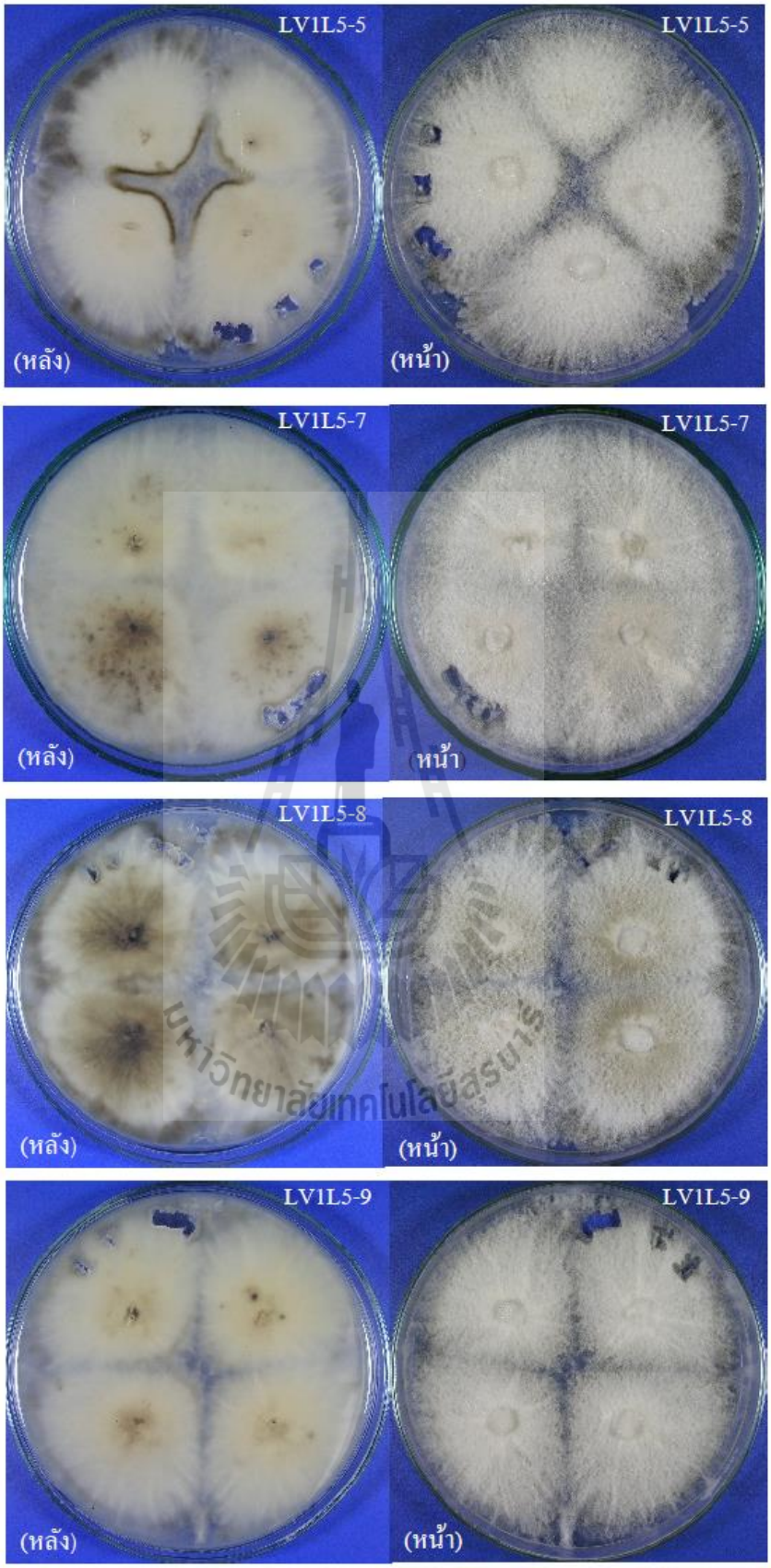
รูปผนวกที่ 6 (ต่อ) ลักษณะทางสัณฐานของเชื้อราต่างไอโซเลทที่แยกได้จาก**ใบ**ของว่านขันหมากที่มีขนาด**ต้นใหญ่**



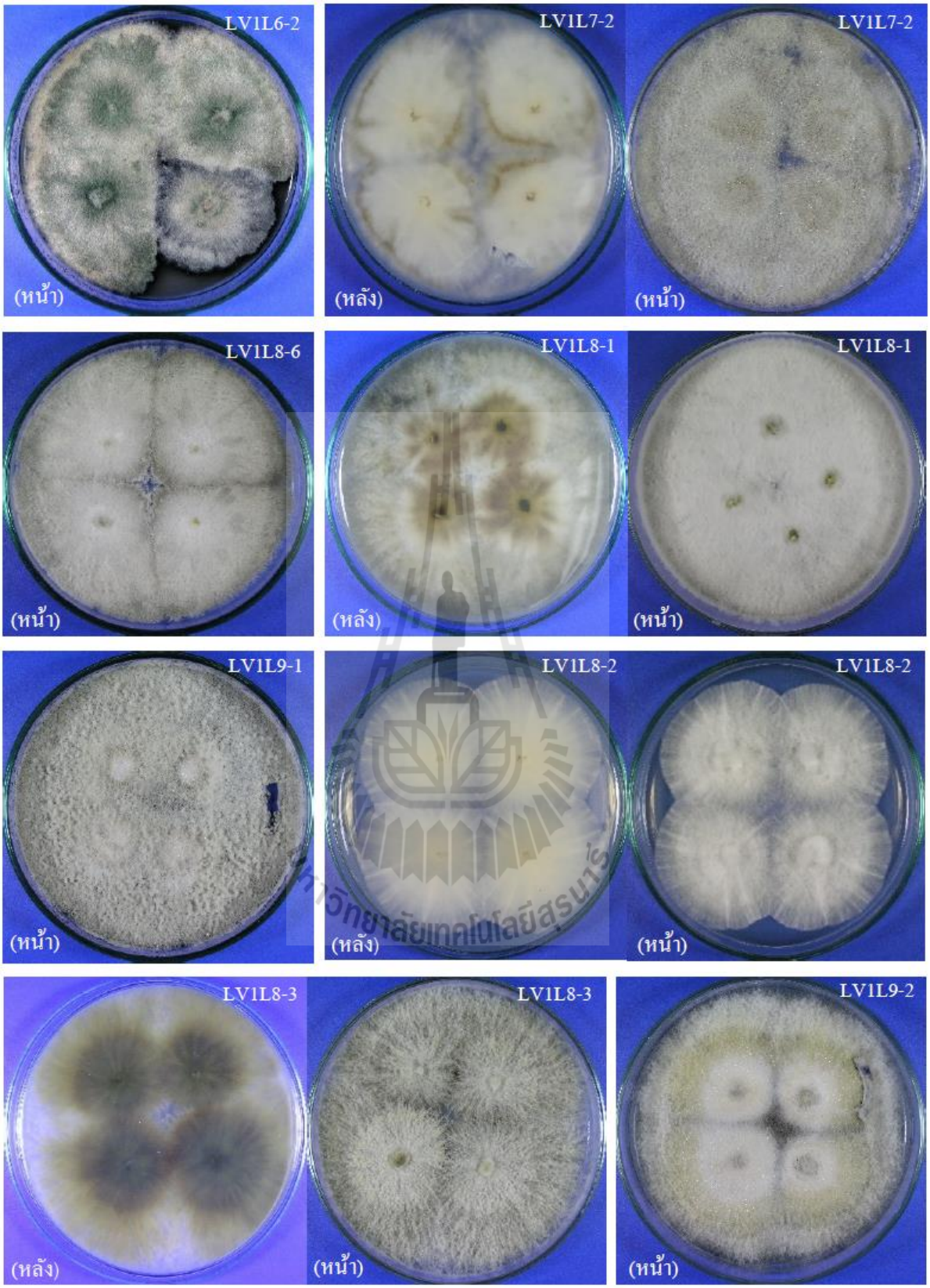
รูปผนวกที่ 6 (ต่อ) ลักษณะโคโลนีของเชื้อราต่างไอโซเลทที่แยกได้จาก**ใบ**ของว่านขันหมากที่มีขนาด**ต้นใหญ่**



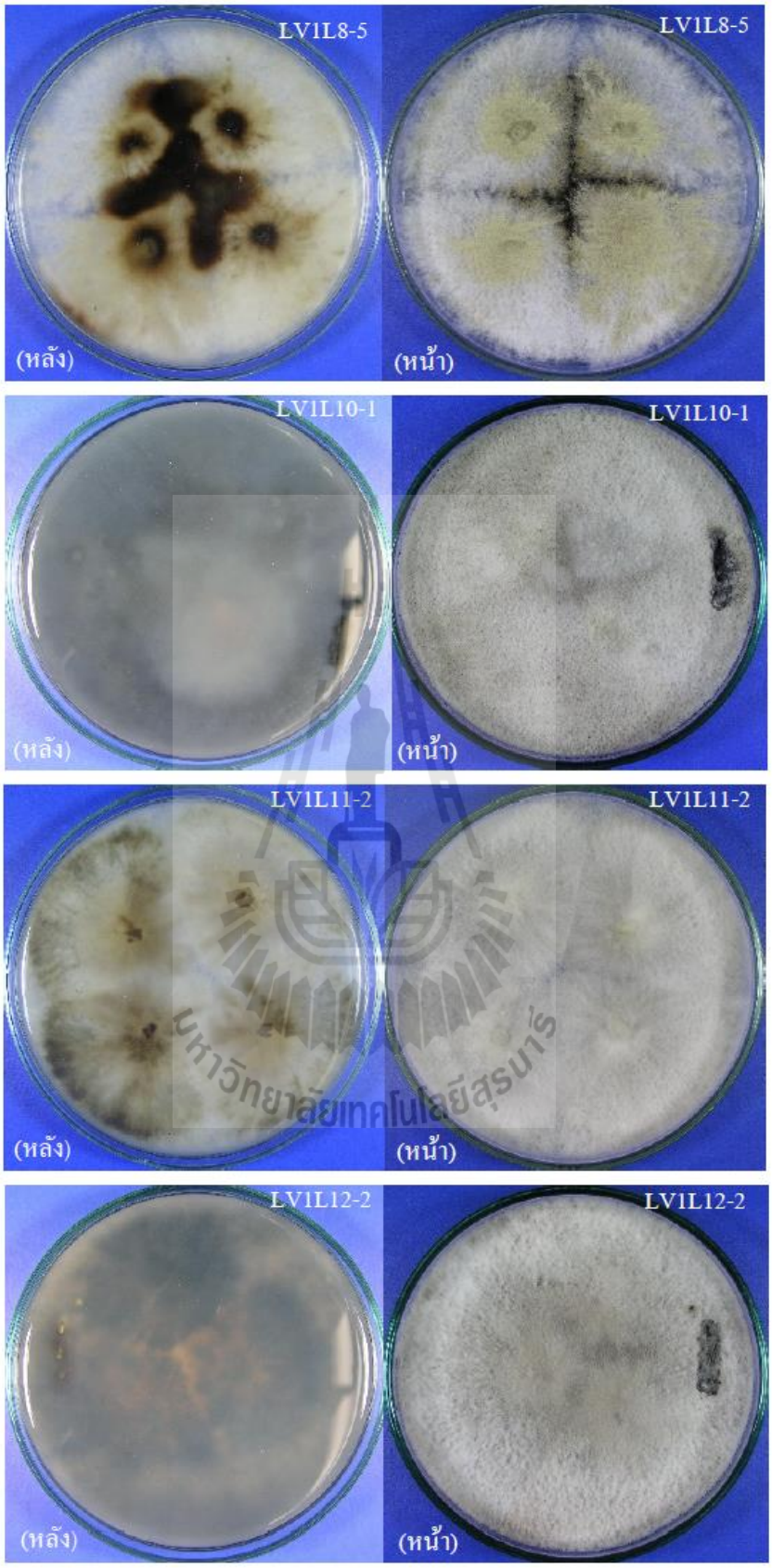
รูปผนวกที่ 6 (ต่อ) ลักษณะทางสัณฐานของเชื้อราต่างไอโซเลทที่แยกได้จาก**ใบ**ของว่านขันหมากที่มีขนาด**ต้นใหญ่**



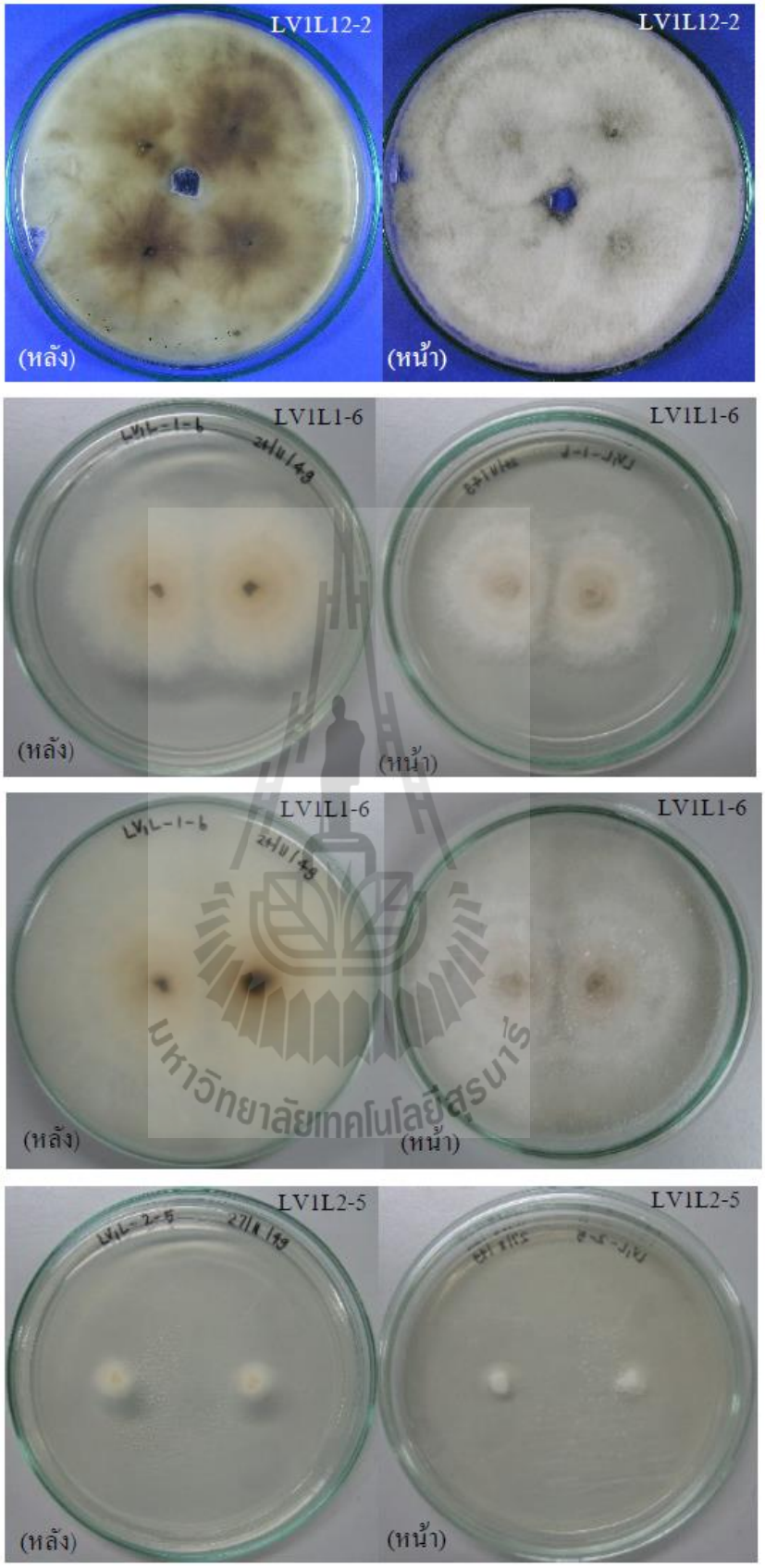
รูปผนวกที่ 6 (ต่อ) ลักษณะทางสัณฐานของเชื้อราต่างไอโซเลทที่แยกได้จาก**ใบ**ของว่านขันหมากที่มีขนาด**ต้นใหญ่**



รูปผนวกที่ 6 (ต่อ) ลักษณะทางสัณฐานของเชื้อราต่างไอโซเลทที่แยกได้จาก**ใบ**ของว่านขันหมากที่มีขนาด**ต้นใหญ่**

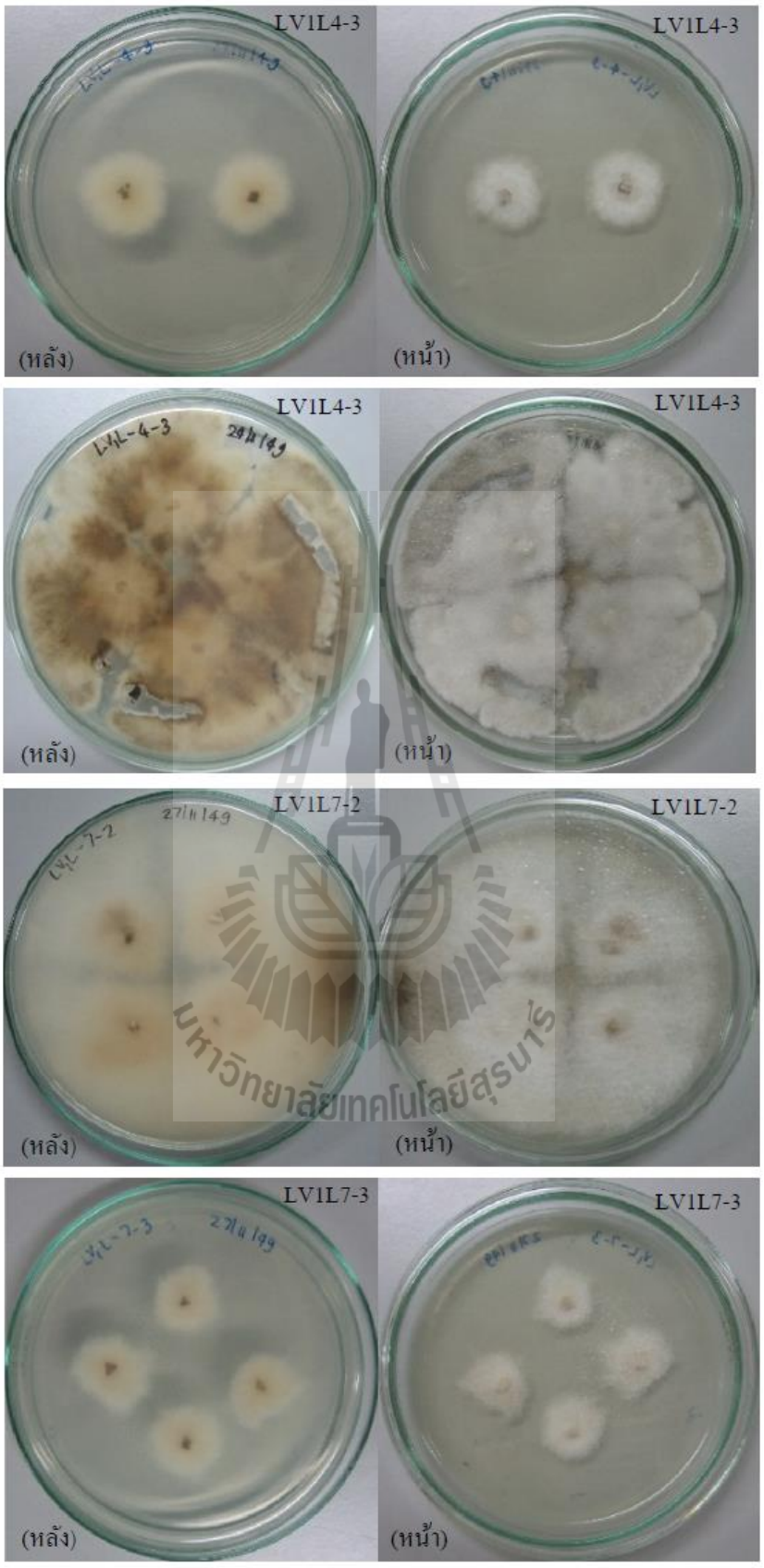


รูปผนวกที่ 6 (ต่อ) ลักษณะทางสัณฐานของเชื้อราต่างไอโซเลทที่แยกได้จาก**ใบ**ของว่านขันหมากที่มีขนาด**ต้นใหญ่**

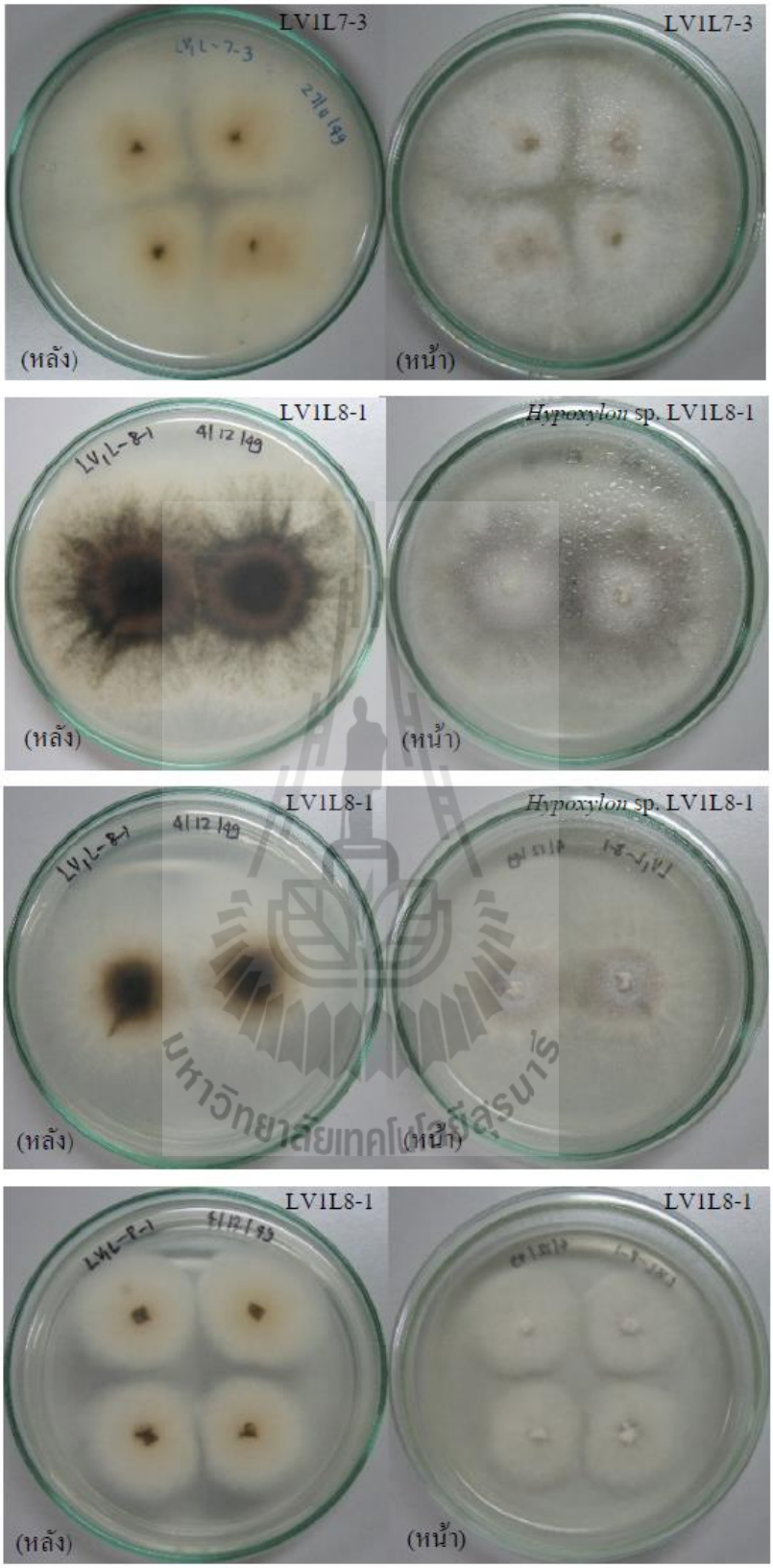


รูปผนวกที่ 6 (ต่อ) ลักษณะทางสัณฐานของเชื้อราต่างไอโซเลทที่แยกได้จาก**ใบ**ของว่านขันหมากที่มีขนาด**ต้นใหญ่**

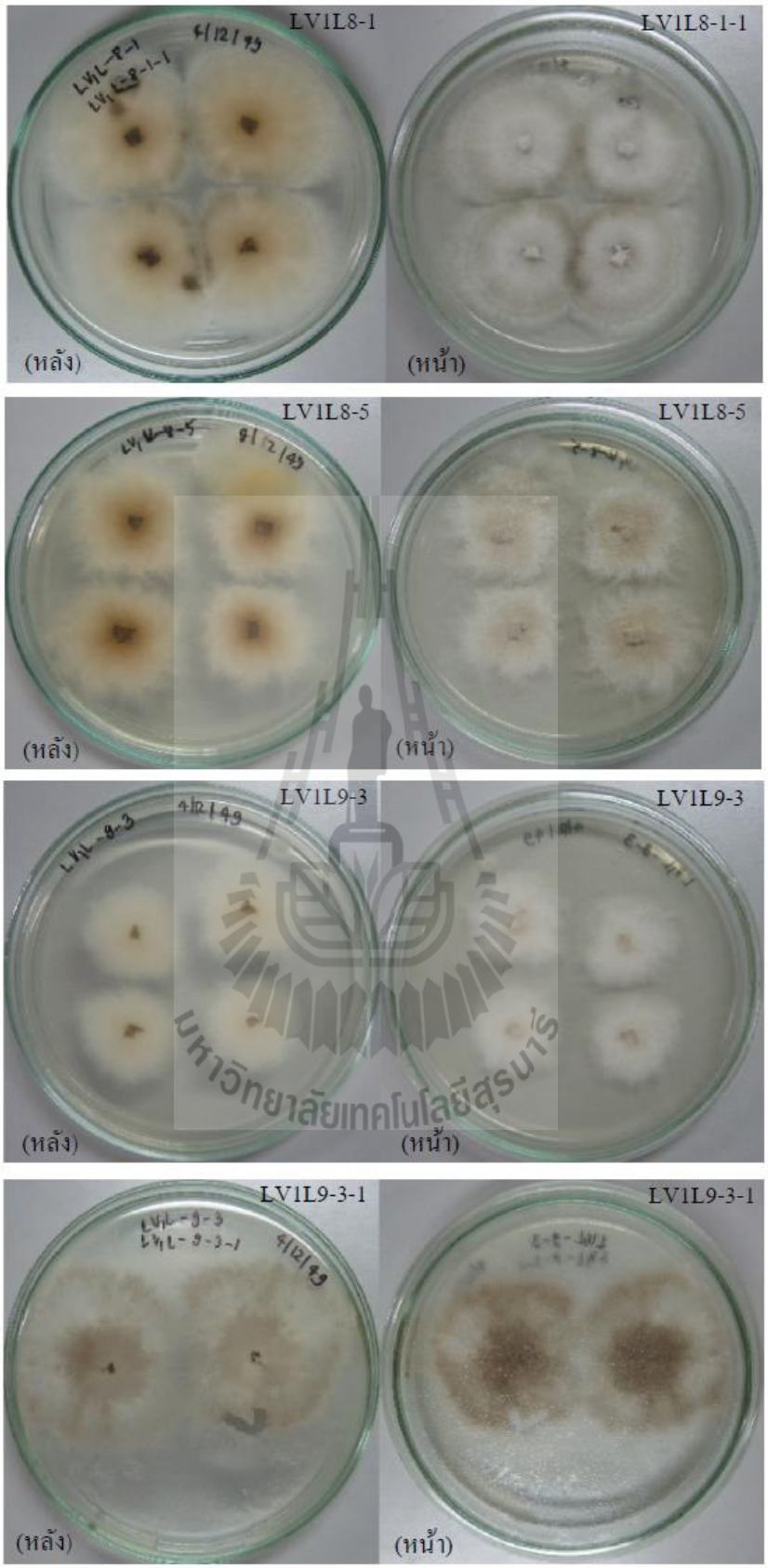
รูปผนวกที่ 6 (ต่อ) ลักษณะทางสัณฐานของเชื้อราต่างไอโซเลทที่แยกได้จาก**ใบ**ของว่านขันหมากที่มีขนาด**ต้นใหญ่**



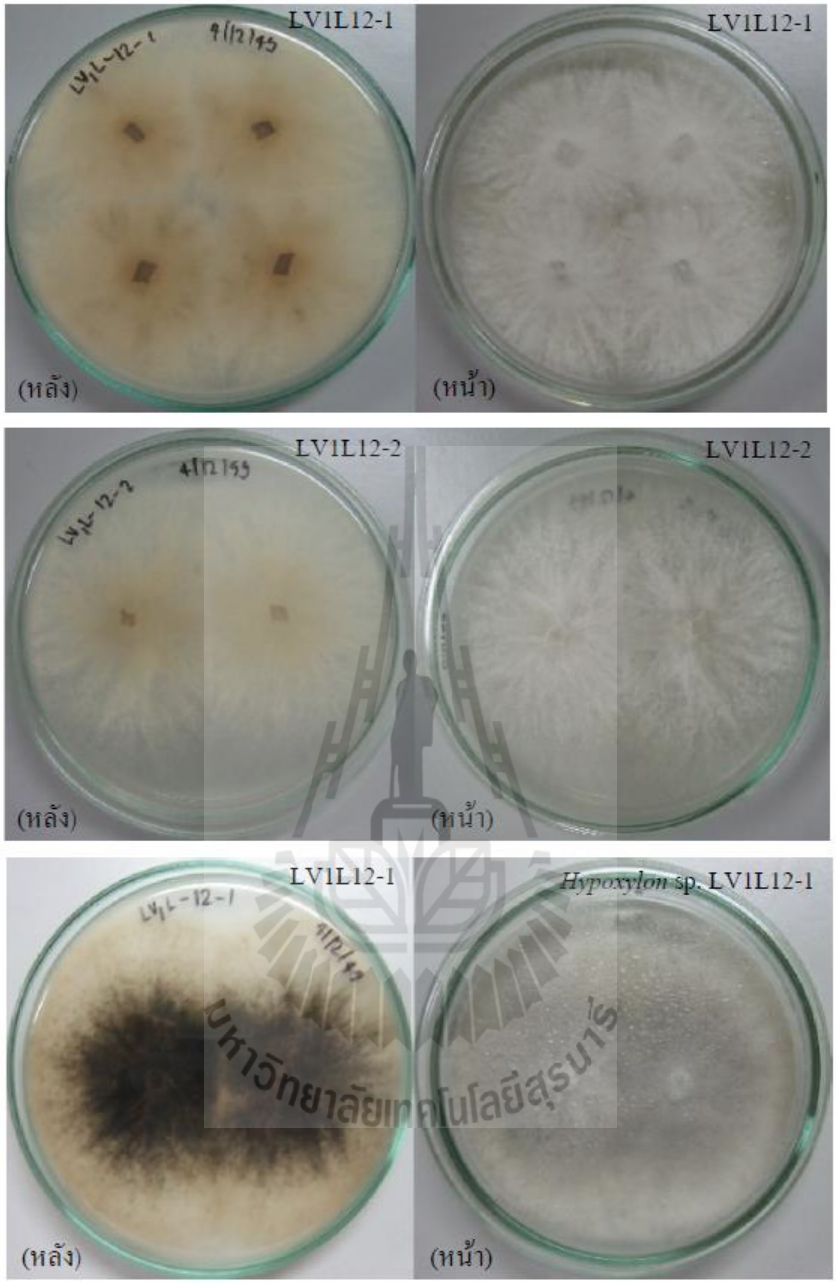
รูปผนวกที่ 6 (ต่อ) ลักษณะทางสัณฐานของเชื้อราต่างไอโซเลทที่แยกได้จาก**ใบ**ของว่านขันหมากที่มีขนาด**ต้นใหญ่**



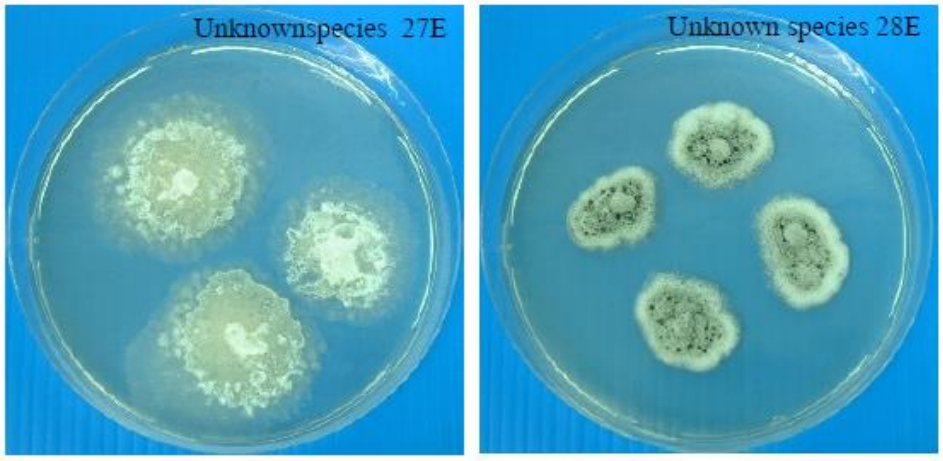
รูปผนวกที่ 6 (ต่อ) ลักษณะทางสัณฐานของเชื้อราต่างไอโซเลทที่แยกได้จาก**ใบ**ของว่านขันหมากที่มีขนาด**ต้นใหญ่**



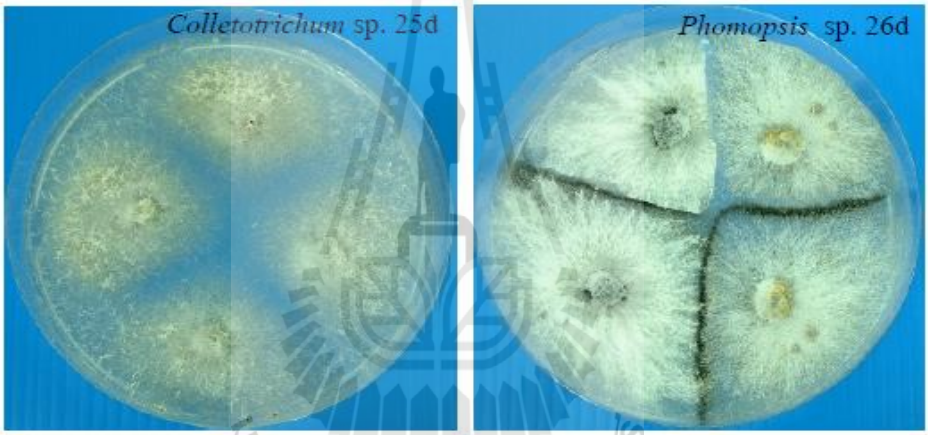
รูปผนวกที่ 6 (ต่อ) ลักษณะทางสัณฐานของเชื้อราต่างไอโซเลทที่แยกได้จาก**ใบ**ของว่านขันหมากที่มีขนาด**ต้นใหญ่**



รูปผนวกที่ 6 (ต่อ) ลักษณะทางสัณฐานของเชื้อราต่างไอโซเลทที่แยกได้จาก**ใบ**ของว่านขันหมากที่มีขนาด**ต้นใหญ่**

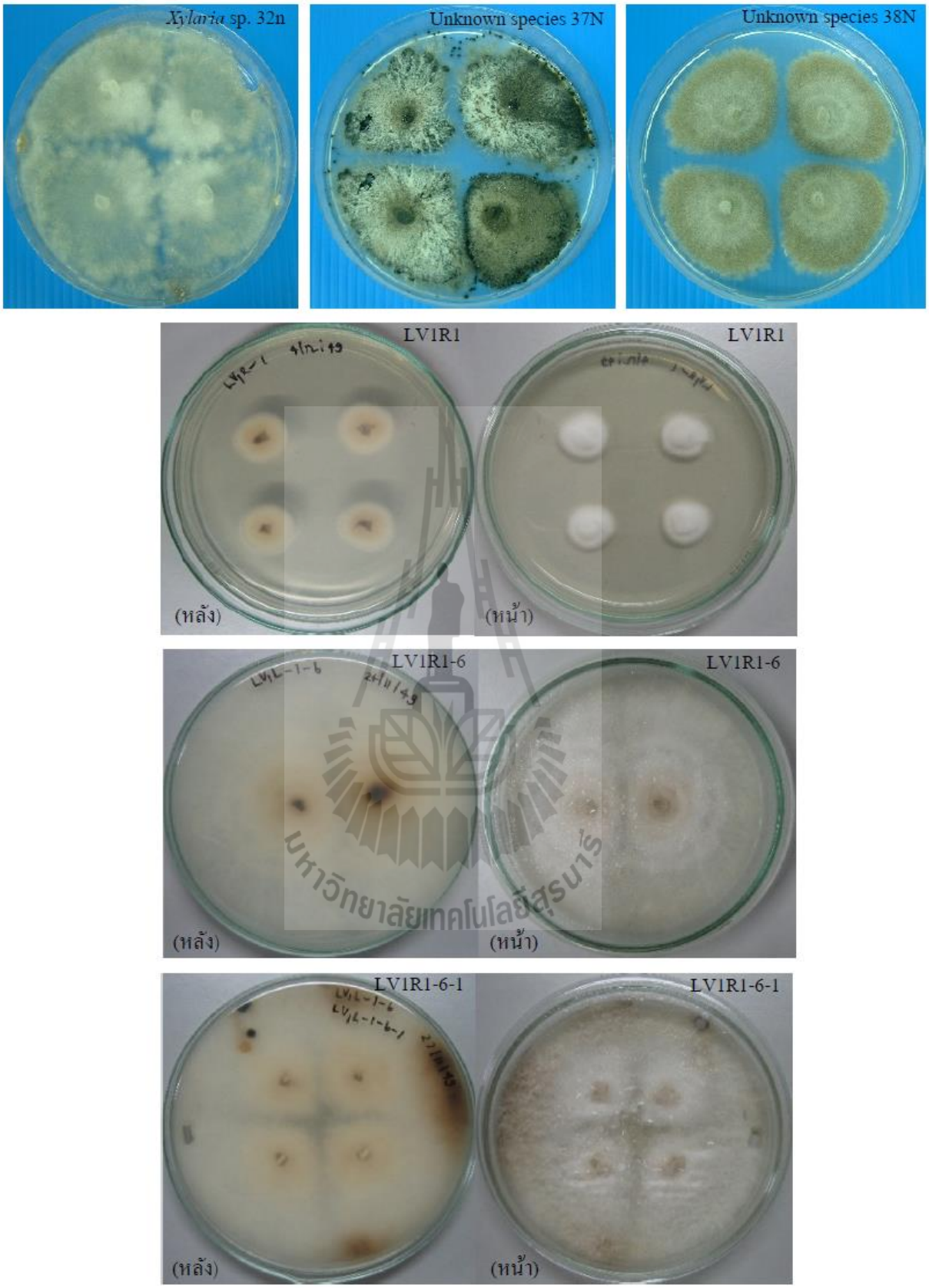


รูปผนวกที่ 7 ลักษณะโคโลนีของเชื้อราต่างไอโซเลทที่แยกได้จาก**ก้านใบ**ของว่านขันหมากที่มีขนาด**ต้นใหญ่**

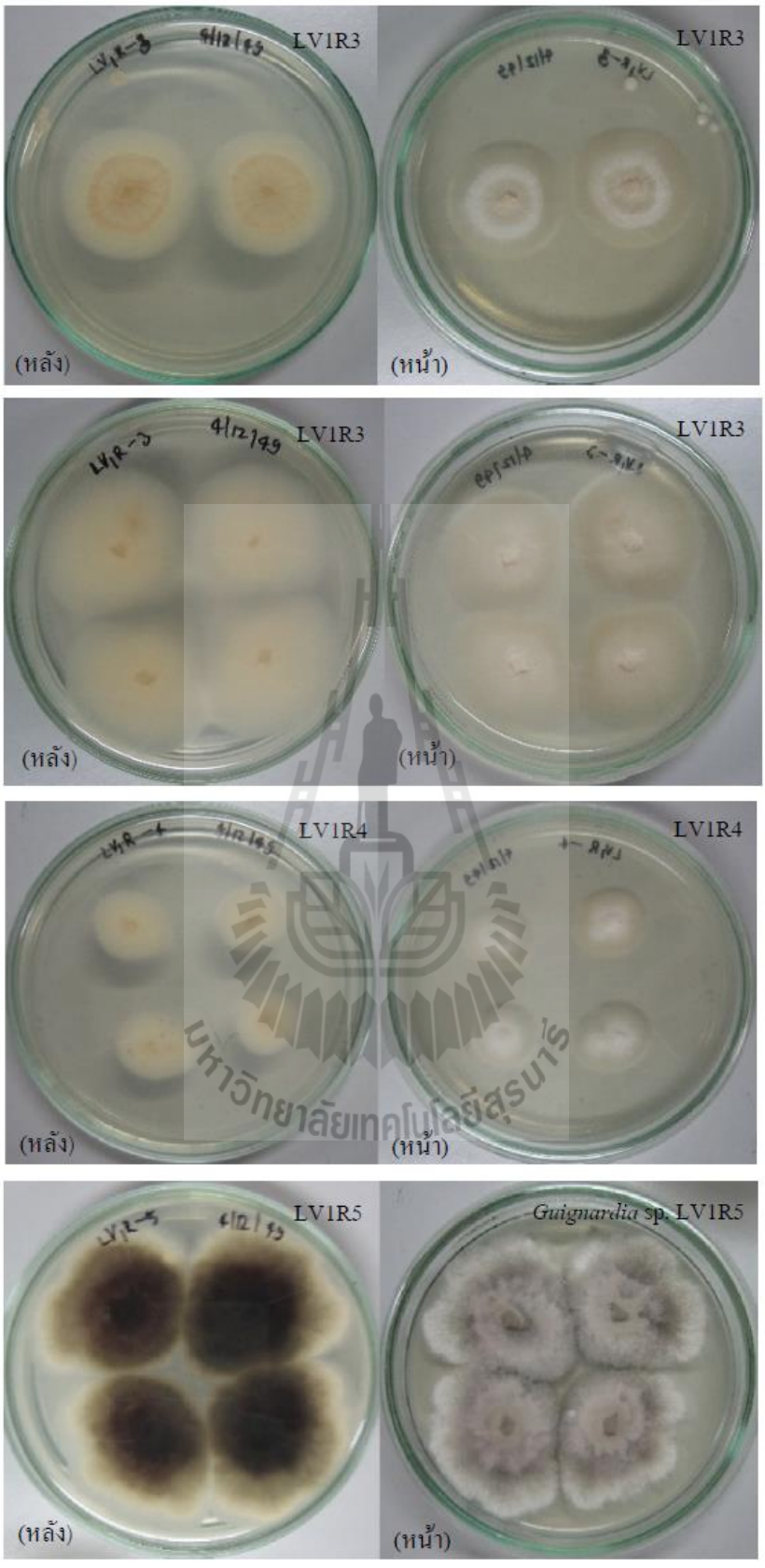


รูปผนวกที่ 8 ลักษณะโคโลนีของเชื้อราต่างไอโซเลทที่แยกได้จาก**ลำต้น**ของว่านขันหมากที่มีขนาด**ต้นใหญ่**

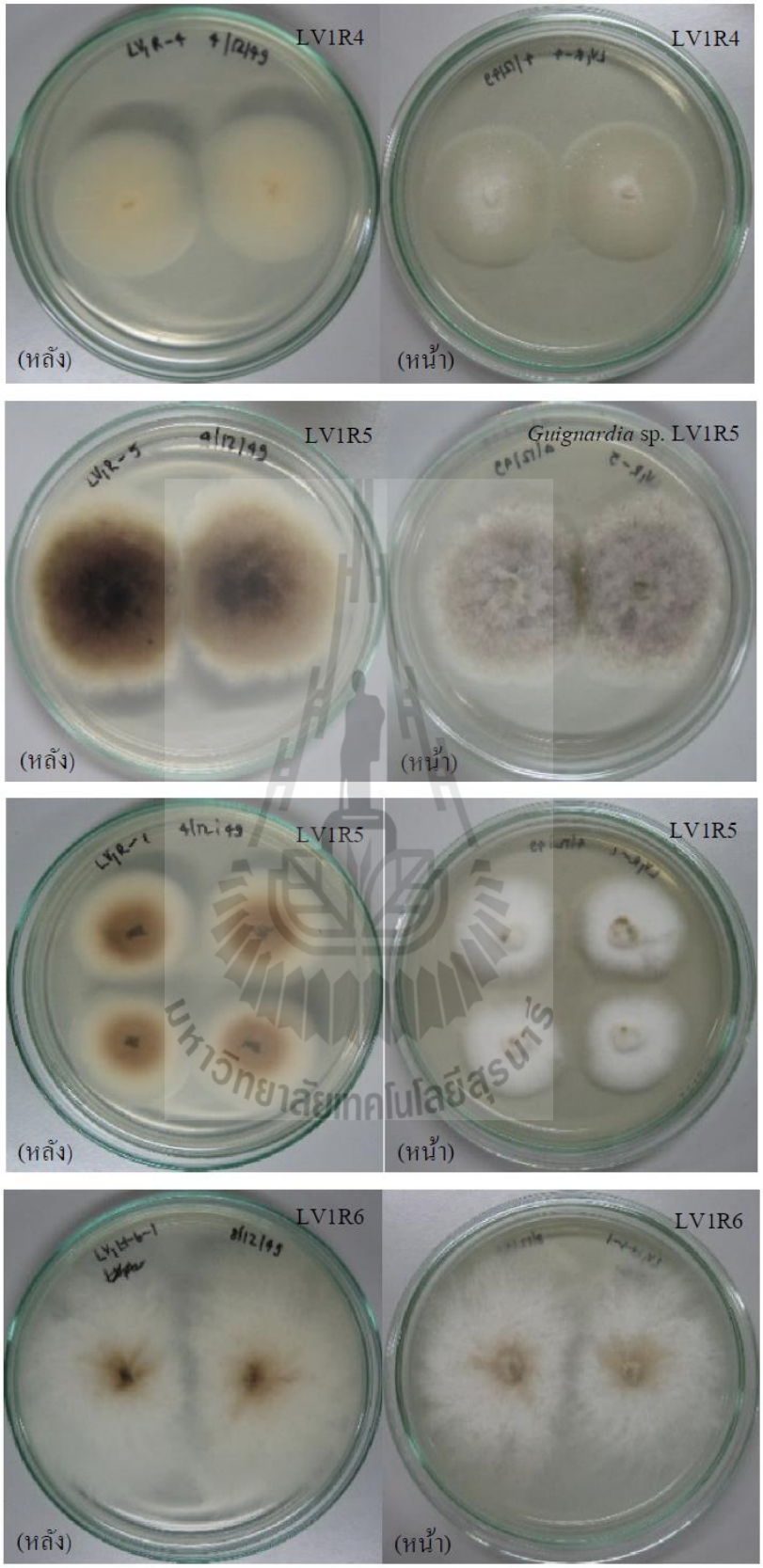
รูปผนวกที่ 9 ลักษณะโคโลนีของเชื้อราต่างไอโซเลทที่แยกได้จาก**โคนต้น**ของว่านขันหมากที่มีขนาด**ต้นใหญ่**



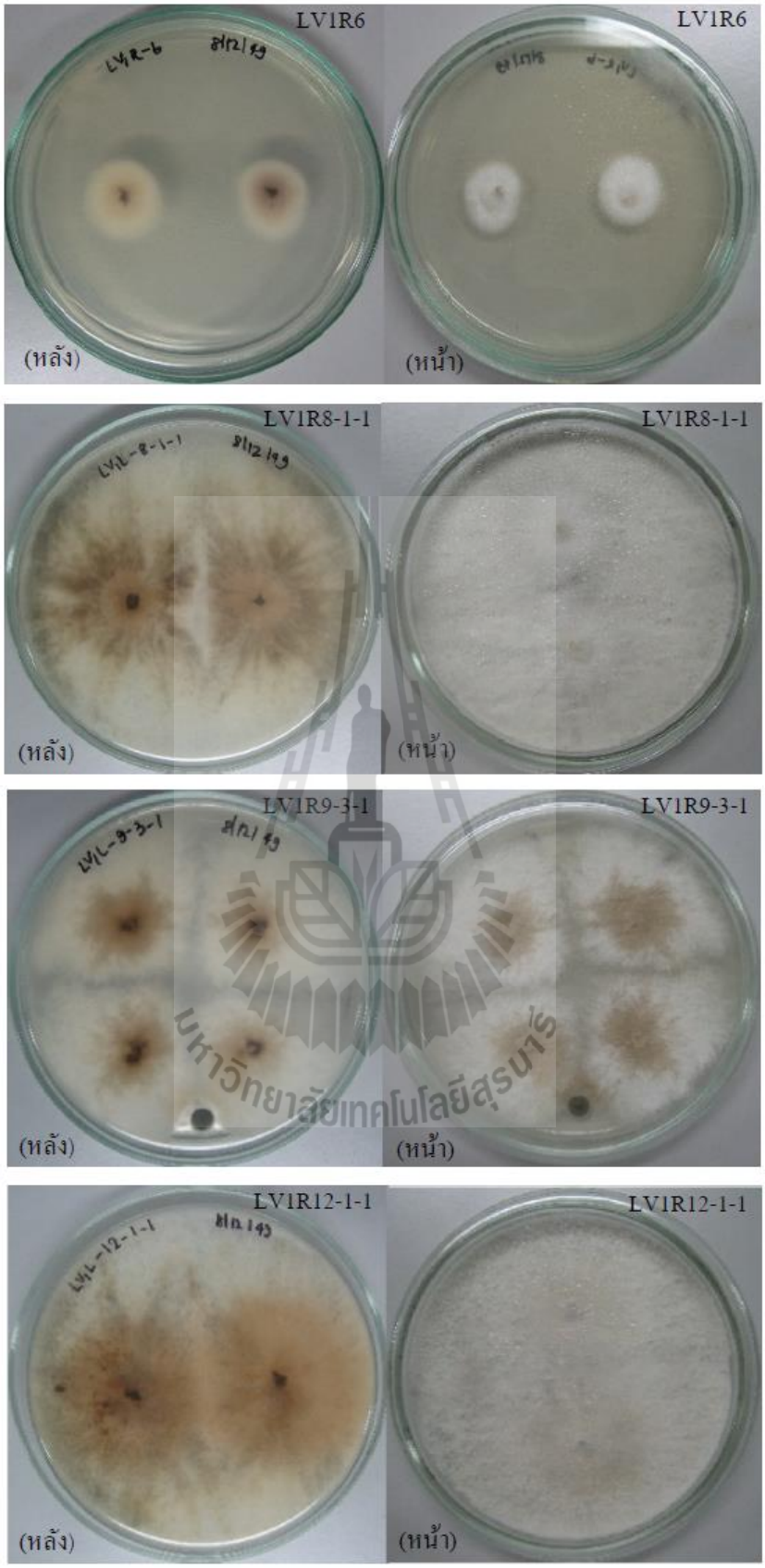
รูปผนวกที่ 10 ลักษณะทางสัณฐานของเชื้อราที่แยกได้จาก**ราก**ของว่านขันหมากที่มีขนาด**ต้นใหญ่**



รูปผนวกที่ 10 (ต่อ) ลักษณะทางสัณฐานของเชื้อราที่แยกได้จาก**ราก**ของว่านขันหมากที่มีขนาด**ต้นใหญ่**



รูปผนวกที่ 10 (ต่อ) ลักษณะทางสัณฐานของเชื้อราที่แยกได้จาก**ราก**ของว่านขันหมากที่มีขนาด**ต้นใหญ่**



รูปผนวกที่ 10 (ต่อ) ลักษณะทางสัณฐานของเชื้อราที่แยกได้จาก**ราก**ของว่านขันหมากที่มีขนาด**ต้นใหญ่**

1 TGTAGGTCNA TATGCTTGTC TCAAAGATTN AAGCCCATGC ATGTCTTAAG
51 TATAAGCATT TATMCAGCGA AACTGCGAAT GGCTCATTAT ATAAGTTATC
101 GTTTATTTGA TAGTACCTTA CTACTTGGAT AACCGTGGTA ATTCTAGAGC
151 TAATACATGC TAAAAATCCC GACTTACGAA GGGATGTATT TATTAGATTA
201 AAAACCAATG CCCTTCGGGG CTCACTTGGT GATTCATAAT AACTTCTCGA
251 ATCGCATGGC CTTGCGCCGG CGATGGTTCA TTCAAATTTC TTCCCTATCA
301 ACTTTCGATG CTAGAGTAGT GTTCTAGCAT GGTTACAACG GGTAACGGAG
351 GGTTAGGGCT CGACCCCGGA GAAGGAGCCT GAGAAACGGC TACTACATCC
401 AAGGAAGGCA GCAGGCGCGC AAATTACCCA ATCCCGACAC GGGGAGGTAG
451 TGACGATAAA TACTGATACA GGGCTCTTTT GGGTTTAATT GGAATGAGTA
501 CATTTAAATC CCTTAACGAG GAACAATTGG AGGGCAAGTC TGGTGCCAGC
551 AGCCGCGGTA ATTCCAGCTC CAATAGCGTA TATTAAAGTT GTTGTGGTTA
601 AAAAGCTCGT AGTAGAACCT TGGGCCTGGC TGGCCGGTCC GCCTCACCGC
651 GTGCACTGGT CCGGCCGGGC CTTTCCCCCT GTGGAACCTC ATGCCCTTCA
701 CTGGGTGTGT GGGAAAACAG GCTTTTACTT TGAAAAAATA GAGTGCTCCA
751 GGCAGGCCTA TGCTCGGAAT ACATTAGCAT GGAATAATAG AATAGGACGT
801 GTGGTTCTAT TTTGTTGGTT TCTAGGACCG CCGTAATGAT TAATAGGGAC
851 AGTCGGGGGC ATCAGTATTC AATTGTCAGA GGTGAAATTC TTGGATTTAT
901 TGAAGACTAA CTACTGCGAA AGCATTTGCC AAGGATGTTT TCATTTATCA
951 GGAACGAAAG TTAGGGGATC GAAGACGATC AGATACCGTC GTAGTCTTAA
1001 CCATAAACTA TGCCGACTAG GGATCGGACG ATGTTATTTT TTGACTCGTT
1051 CGGCACCTTA CGAGAAATCA AAGTGCTTGG GCTCCAGGGG GAGTATGGTC
1101 GCAAGGCTGA AACTTAAAGA AATTGACGGA AGGGCACCAC CAGGGGTGGA
1151 GCCTGCGGCT TAATTTGACT CAACACAAAA AAAACTCCAC CAGGTGCCTA
1201 GACACAA

รูปผนวกที่ 11 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rDNA (Partial sequence, PCR primers NS1/SR2) ของเชื้อรา Endophyte, *Glomerella cingulata* (F3) 96% Identity ที่แยกได้จาก**ใบ**ว่านขันหมาก**ต้นเล็ก**

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

```
1     TGTAGTCATA  TGCTTGTCTC  AAAGATTAAG  CCATGCATGT  CTATGTATAA
51    GCACTTATAC  AGCGAAACTG  CGAATGGCTC  ATTATTTAAG  TTATCGTTTA
101   TTTGATAGTA  CCTTACTACT  TGGATAACCG  TGGTAATTCT  AGAGCTAATA
151   CATGCTAAAA  ATCCCGACTT  CGGAAGGGAT  GTATTTATTA  GATTAAAAAC
201   CAATGCCCTT  CGGGGCTCAC  TGGTGATTCA  TAATAACTTC  TCGAATCGCA
251   TGGCCTTGCG  CCGGCGATGG  TTCATTCAAA  TTTCTTCCCT  ATCAACTTTC
301   GATGCTAGAG  TAGTGTTCTA  GCATGGTTAC  AACGGGTAAC  GGAGGGTTAG
351   GGCTCGACCC  CGGAGAAGGA  GCCTGAGAAA  CGGCTACTAC  ATCCAAGGAA
401   GGCAGCAGGC  GCGCAAATTA  CCCAATCCCG  ACACGGGGAG  GTAGTGACGA
451   TAAATACTGA  TACAGGGCTC  TTTTGGGTCT  TGTAATTGGA  ATGAGTACAA
501   TTTAAATCCC  TTAACGAGGA  ACAATTGGAG  GGCAAGTCTG  GTGCCAGCAG
551   CCGCGGTAAT  TCCAGCTCCA  ATAGCGTATA  TTAAAGTTGT  TGGTGGTTAA
601   AAAGCTAGTA  GTAGAACCTT  GGGCCTGGCT  GGCCGGTCCG  CCTCACCGCG
651   TGCACTGGTC  CGGGCCGGGC  CTTTCCCTCT  GTGGAACCGC  ATGCCCTTCA
701   CTGGGTGTGC  CGGGGAAACA  GGACTTTTAC  TTTGAAAAAA  TTAGAGTTTT
751   TCAGGCAGGC  NTTATGCTCG  AATACATTAG  GCATGGAATA  ATAGAATAGG
801   ACGTGTGGTT  CTATTTTGTT  GGTTTCTAGG  ACCGCCGTAA  TGATTAATAG
851   GGACAGTCGG  GGGCATCAGT  ATTCAATTGT  CAGAGGTGAA  ATTCTTGGAT
901   TTATTGAAGA  CTAACTACTG  CGAAAGCATT  TGCCAAGGAT  GTTTTCATTT
951   ATCAGGAACG  AAAGTTAGGG  GATCGAAGAC  GATCAGATAC  CGTCGTAGTC
1001  TTAACCATAA  ACTATGCCGA  CTAGGGATCG  GACGATGTTA  TTTTTTGACT
1051  CGTTCGGCAC  CTTACGAGAA  ATCAAAGTGC  TTGGGCTCCA  GGGGGAGTAT
1101  GGTCGCAAGG  CTGAAACTTA  AAGAAATTGA  CGGAAGGGCA  CCACCAGGGG
1151  TGGAGCCTGC  GGCTTAATTT  GACTCAACAC  AAARAAACTC  ACCAGGTCCA
1201  GACACA
```

รูปผนวกที่ 12 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rDNA (Partial sequence, PCR primers NS1/SR2) ของเชื้อรา Endophyte, *Collectotrichum* sp.4 (14h1) 99% Identity ที่แยกได้จาก**ใบ**ว่านขันหมาก**ต้นเล็ก**

```
1     CTATACAGCG  AAACTGCGAA  TGGCTCATTT  TAAGTNACGT  TCGTGATAGT
51    ACCTTACTAC  TTGGATAACC  GGGTAATTTA  GAGCCAACAT  GCACATCCCG
101   ACTTACGAAG  GGATGTATTT  ATTAGATTAA  AAACCAATGC  CCTTCGGGGC
151   TCACTGGTGA  TTCATAATAA  CTTCTCGAAT  CGCATGGCCT  GCGCCGGCGA
201   TGGTTCATTC  AAATTTCTTC  CCTATCAACT  TTCGATGCTA  GAGTAGTGTT
251   CTAGCATGGT  TACAACGGGT  AACGGAGGGT  TAGGGCTCGA  CCCCGGAGAA
301   GGAGCCTGAG  AAACGGCTAC  TACATCCAAG  GAAGGCAGCA  GGCGCCCAAA
351   TTACCCAATC  CCGACACGGG  GAGGTAGTGA  CGATAAATAC  TGATACAGGG
401   CTCTTTTGGG  TCTTGTAATT  GGAATGAGTA  CAATTTAAAT  CCCTTAACGA
451   GGAACAATTG  GAGGGCAAGT  CTGGTGCCAG  CAGCCGCGGT  AATTCCAGCT
501   CCAATAGCGT  ATATTAAAGT  TGTTGTGGTT  AAAAAGCCGT  AGTACCTTGG
551   GCCTGGCTGC  CGGTCCGCCT  CACCGCGTGC  ACTGGTCCGG  CCGGGCCTTT
601   CCCCCTGTGG  AACCTCATGC  CCTTCACTGG  GTGTGTGGGA  AAACAGGRCT
651   TTTACTTTGA  AAAAATTAGA  GTGCTCCAGG  CAGGCCTATG  CTCGAATACA
701   TTAGCATGGA  ATAATAGAAT  AGGACGTGTG  GTTCTATTTT  GTTGGTTTCT
751   AGGACCGCCG  TAATGATTAA  TAGGGACAGT  CGGGGGCATC  AGTATTCAAT
801   TGTCAGAGGT  GAAATTCTTG  GATTTATTGA  AGACTAACTA  CTGCGAAAGC
851   ATTTGCCAAG  GATGTTTTCA  TTTATCAGGA  ACGAAAGTTA  GGGGATCGAA
901   GACGATCAGA  TACCGTCGTA  GTCTTAACCA  TAAACTATGC  CGACTAGGGA
951   TCGGACGATG  TTATTTTTTG  ACTCGTTCGG  CACCTTACGA  GAAATCAAAG
1001  TGCTTGGGCT  CCAGGGGGAG  TATGGTCGCA  AGGCTGAAAC  TTAAAGAAAT
1051  TGACGGAAG   GCACCACCAG  GGGTGGAGC   ATGCGGCTTA  ATTTGACTCA
1101  ACACGGGGAA  ACTCACCAGG  TCCGGGACAC  AATGAGG
```

รูปผนวกที่ 13 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rDNA (Partial sequence, PCR primers NS1/SR2) ของเชื้อรา Endophyte, *Collectotrichum* sp. 6 (18G) ที่แยกได้จาก**ใบ**ว่านขันหมาก**ต้นเล็ก**

```
1    GGTAAATGCC CGGACCCGGG AGTTTTCCCG TGTTGAGTCA AATTAAGCCG
51   TTCTCCACTC CTGGTGGTGC CCTTCCGTCA ATGCTTTAAG TTTCAGCCTT
101  GCGACCATAC TCCCCCAGAA CCCAAAAACT TTGATTTCTC GTACCGCGCC
151  GATCGAGCCA GTGAAATGAG CATCGACCGA TTCGGAGTCG GCATAGTTTA
201  CTGTTAAGAC TACAACGGTA TCTAATCGTT TTCGATACCC TAACCTTCGT
251  TCTTGATTAA TGAAAACATT CTTGGCAAAT GCTTTCGCAG TAGGAAGTCT
301  TTGCACAATC CAAGAATTTC ACCTCTAGCG TGCAAATACT AATGCCCCCG
351  GCTGTCCCTT TTAATCATTA CGGCAGTTCT AGAAACCAAC AAAATAGAAC
401  CGCACCGTCC TATTCTGTTA TTCCAGCTAA ATATTACGGC CTATGGCTGC
451  TTTGAACACT TTTATTTTTC AAAGTAATAG TCCTGGTTCC GGACCACCCG
501  AAGGCGGCCG TTCACCAAGA AGGAAGTCTC GGCCGTCAAG TACATGCAAT
551  GAAGCAGACC CAGCGTCCGA GACCAAACTT CAACTACGAG CTTTTTAACT
601  GCACACTTTA ATATACGCTA TTGGAGCTGG AATTACCGCG GCTGCTGGCA
651  CCAGACTTGC CCTCCAATCG TTCCTCGTTA AGGGATTTAA ATTGTACTCA
701  TTCCAATTAC AAGTACCCAA AGGGCCCTGC ATTATTTTAT TGTCACTACC
751  TCCCCGTGTC GGGATTGGGT AATTTGCGCG CCTGCTGCCT TCCTTGGATG
801  TGGTAGCCGT TTCTCAGGCT CCTTCCGGAA TCGAACCCTT TTCCCCGTTA
851  CCCGTTGCAA CCATGGTAGG CCTCTATCCT ACCATCGACA GTTGATAGGG
901  CAGATATTTG AATGAAGCAT CGCCAGCACA AGGCCGTGCG ATTCGAGAAG
951  TTATTATGAA TCACCAAACT CCGAGGAGGA TGGTTTTTAT CTAATAAATA
1001 CACCCCTTCC AGAAGTCGGG GCTTTTTACG CATGTATTAG CTCTAGAATT
1051 ACCACAGTTA TCCATGTAGC AAGAAACATC AAATAAACTA TAACTGATTA
1101 AATGAGCCAT TCGCAGTTTC ACAGTATAAG GCG
```

รูปผนวกที่ 14 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rDNA (Partial sequence, PCR primers NS1/SR2) ของเชื้อรา Endophyte, *Collectotrichum* sp. 1 (1M) ที่แยกได้จาก **ก้าน**ว่านขันหมาก**ต้นเล็ก**

```
1    AAAAGCTCTC AATCTGTCTA GTGTCGGACC TGGTGAGTTT CCCCGTGTTG
51   AGTCAAATTA AGCCGCGCTC CACCCCTGGT GGTGCCCTTC CGTCAAGCTT
101  TAAGTTTCAG CCTTGCGACC ATACTCCCCC TGGAGCCCAA GCACTTTGAT
151  TTTCTCGTAA GGTGCCGAAC GAGTCAAAAA ATAACATCGT CCGATCCCTA
201  GTCGGCATAG TTTATGGTTA AGACTACGAC GGTATCTGAT CGTCTTCGAT
251  CCCCTAACTT TCGTTCCTGA TAAATGAAAA CATCCTTGGC AAATGCTTTC
301  GCAGTAGTTA GTCTTCAATA AATCCAAGAA TTTCACCTCT GACAATTGAA
351  TACTGATGCC CCCGACTGTC CCTATTAATC ATTACGGCGG TCCTAGAAAC
401  CAACAAAATA GAACCACACG TCCTATTCTA TTATTCCATG CTAATGTATC
451  GAGCATAGGC CTGCCTGGAG CACTCTAATT TTTTCAAAGT AAAAGTCCTG
501  TTTTCCCACA CACCCAGTGA AGGGCATGAG GTTCCACAGG GGGAAAGGCC
551  CGGCCGGACC AGTGCACGCG GTGAGGCGGA CCGGCCAGCC AGGCCCAAGG
601  TTCTACTACG AGCTTTTTAA CCACAACAAC TTTAATATAC GCTATTGGAG
651  CTGGAATTAC CGCGGCTGCT GGCACCAGAC TTGCCCTCCA ATTGTTCCTC
701  GTTAAGGGAT TTAAATTGTA CTCATTCCAA TTACAAGACC CAAAAGAGCC
751  CTGTATCAGT ATTTATGACT ACCTCCCCGT GTCGGGATTG GGTAATTTGC
801  GCGCCTGCTG CCTTCCTTGG ATGTAGTAAG CCGTTTCTCA GGCTCCTTCT
851  CCGGGGTCGA GCCCTAACCC TCCGTTACCC GTTGTAACCA TGCTAGAACA
901  CTACTCTAGC ATCGAAAGTT GATAGGGAAG AAATTTGAAT GAACCATCGC
951  CGGCGCAAGG CCATGCCGAT TCGAGAAGTT ATTATGGAAT CACCAAGTGA
1001 GCCCCGAAGG GCATTGGTTT TTAATCTAAT AAATACATCC CTTTCGTAAA
1051 GTCGGGGATT TTTTAAGCAT GGTATTAAGC TCTTAGAAAT TACCCACGGT
1101 TATTCCAAGT AGTAAGGTAC TATCAAATAA ACGATAACTT AAAATGAGCC
1151 ATTCGCAGTT TCGCTGTATA AGCTTATACG ACATGCAGGC TATTGAGACA
1201 AGCATTTGAC TACA
```

รูปผนวกที่ 15 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rDNA (Partial sequence, PCR primers NS1/SR2) ของเชื้อรา Endophyte, *Phomopsis* sp. 2 (3M) ที่แยกได้จาก**ก้าน**ว่านขันหมาก**ต้นเล็ก**

```
1    AAATCTTGTC TCAAAGATTA ACCATGCAT  GTCTAAGTAT AAGCAATTAT
51   ACAGCGAAAC TGCGAATGGC TCATTATATA AGTTATCGTT TATTTGATAG
101  TACCTTACTA CTTGGATAAC CGTGGTAATT CTAGAGCTAA TACATGCTAA
151  AAATCCCGAC TTCGGAAGGG ATGTATTTAT TAGATTAAAA ACCAATGCCC
201  TTCGGGGCTC ACTGGTGATT CATAATAACT TCTCGAATCG CATGGCCTTG
251  CGCCGGCGAT GGTTCATTCA AATTTCTTCC CTATCAACTT TCGATGCTAG
301  AGTAGTGTTC TAGCATGGTT ACAACGGGTA ACGGAGGGTT AGGGCTCGAC
351  CCCGGAAAG  GAGCCTGAGA AACGGCTACT ACATCCAAGG AAGGCAGCAG
401  GCGCGCAAAT TACCCAATCC CGACTCGGGG AGGTAGTGAC GATAAATAGT
451  ATACAGGGCT CTTTTGGGTT GTAATTGGAA TGAGTACAAT TTAAATCCCT
501  TAACGAGGAA CAATTGGAGG GCAGTCTGGT GCCAGCAGCC GCGGTAATTC
551  CAGCTCCAAG CGGTTGTTAG TGGTTAAAAA GCTCGTAGAG AACCTTGGGC
601  CTGGCTGGCC GGTCCGCCTC ACCGCGTGCA CTGGTCCGGC CGGGCCTTTC
651  CCTCTGTGGA ACCGCATGCC CTTCACTGGG TGTGCCGGGG AAACAGGACT
701  TTACTTTGAA AAATTAGAGT GCTCCAGGCA GGCCTATGCT CGAATCCATT
751  AGCATGGAAT AATAGAATAG GACGTGTGGT TCTATTTTGT TGGTTTCTAG
801  GACCGCCGTA ATGATTAATA GGGACAGTCG GGGGCATCAG TATTCAATTG
851  TCAGAGGTGA AATTCTTGGA TTTATTGAAG ACTAACTACT GCGAAAGCAT
901  TTGCCAAGGA TGTTTTCATT TATCAGGAAC GAAAGTTAGG GGATCGAAGA
951  CGATCAGATA CCGTCGTAGT CTTAACCATA AACTATGCCG ACTAGGGATC
1001 GGACGATGTT ATTTTTTGAC TCGTTCGGCA CCTTACGAGA AATCAAAGTG
1051 CTTGGGCTCC AGGGGGAGTA TGGTCGCAAG GCTGAAACAT AAAGCCCATT
1101 GACGGAAGGG CACCACCAGG GGTGGAGCAT GCGGCTTAAT AAACTCAACA
1151 CGAGGAAACT CACCAGGTCC GGGACACTTT ACC
```

รูปผนวกที่ 16 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rDNA (Partial sequence, PCR primers NS1/SR2) ของเชื้อรา Endophyte, *Phomopsis* sp. 3 (4J) ที่แยกได้จาก**ลำต้น**ว่านขันหมาก**ต้นเล็ก**

```
1    CTCGTAAGGT GCCTGAGCGG GTCAAATATA ACACCGTTTT GATCCTAGTC
51   GGCATAGTTT ATGGTTAAGA CTACGACGGG ATCTGATGCT TCGATCCCCT
101  AACTTTCGTT CCTGATTAAT GAAAACATCC TTGGTGAATG CTTTCGCAGT
151  AGTTAGTCTT CAATAAATCC AAGAATTTCA CCTCTGACAA TTGAATACTG
201  ACACCCCCGA CTGTCCCTAT TAATCATTAC GGCGGTCCTA GAAACCAACA
251  AAATAGAACC ACACGTCCTA TTCTATTATT CCATGCTGAT GTATTCGAGC
301  ATAGGCCTGC TTTGAACACT CTAATTTTTT CACAGTAAAA GTCCTGGTTC
351  CCCACCACAC CTAATGAAAG GCATGGGGCT CCCCAGAGGG AAAGGCCCGG
401  CCGAACCAGT GCACGCGGTG AGGCGGACCG GCCAGCCAGG CCCAAGGTTC
451  AACTACGAGC TTTTTAACTG CAACAACTTT AATATACGCT ATTGGAGCTG
501  GAATTACCGC GGCTGCTGGC ACCAGACTTG CCCTCCAATT GTTCCTCGTT
551  AAGGGATTTA AATTGTACTC ATTCCAATTA CAAGACCCAA AAGAGCCCTG
601  TATCAGTATT TATTGTCACT ACCTCCCCGT GTCGGGATTG GGTAATTGGC
651  GGCCTGCTGC CTTCCTTGGA TGTAGTAGCC GTTTCTCAGG CTCCTTCTCC
701  GGGGTCGAGC CCTAACCCTC CGTTACCCGT TGTAACCATG GCAGGCCAAG
751  ACCCTGCCAT CGAAAGTTGA TAGGGCAGAA ATTTGAATGA ACCATCGCCG
801  GCGCAAGGCC ATGCGATTCG TGAAGTTATT ATGAATCACC AGAAAGCCCC
851  GAGGGGCATT GGTTTTTAAT CTAATAAATA CATCCCCCGT GAGTCGGGAT
901  TTTTAGCATG TACCAGCTCT AGAATTACCA CGGTTATCCA AGTAGTAAGG
951  TAAATCAAAT AAAAATAACT GATTAAATGA GCCCATTCGC AGGTCGCTGT
1001 ATCCTAAATA TGCTGGACAT TCCATCC
```

รูปผนวกที่ 17 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rDNA (Partial sequence, PCR primers NS3/SR2) ของเชื้อรา Endophyte, *Rosellinia* sp. 2 (16J1) ที่แยกได้จาก**ลำต้น**ว่านขันหมาก**ต้นเล็ก**

```
1    AATGTCCCAG  TTATTCATGA  TACGGCGACC  CTGCGAATGG  CTCATTAAAT
51   CAGTTATTGT  TTATTTGATT  GTACCTTACT  ACTTGGATAA  CCGTGGTAAT
101  TCTAGAGCTA  TACATGCTAA  AAATCCCGAC  TCACGAGGGA  TGTATTTATT
151  AGATTAAAAA  CCAATGCCCC  TCGGGGCTTA  CTGGTGATTC  ATAATAACTT
201  CTCGAATCGC  ATGGCCTTGC  GCCGGCGAT   GGTTCATTCA  AATTTCTGCC
251  CTATCAACTT  TCGATGGCAG  GGTCTTGGCC  TGCCATGGTT  ACAACGGGTA
301  ACGGAGGGTT  AGGGCTCGAC  CCCGGAGAAG  GAGCCTGAGA  AACGGCTACT
351  ACATCCAAGG  AAGGCAGCAG  GCGCSCAAAT  TACCCAATCC  CGACACGGGG
401  AGGTAGTGAC  AATAAATACT  GATACAGGGC  TCTTTTGGGT  CTTGTAATTG
451  GAATGAGTAC  AATTTAAATC  CCTTAACGAG  GAACAATTGG  GGCAAGTCTG
501  GTGCCAGCAG  CCGCGGGTAA  TTCCAGCTTC  AATAGCGTAT  ATTAAAGTTG
551  TTGCAGTTAA  AAAGCTCGTA  GTTGAACCTT  GGGCCTGGCT  GGCCGGTCCG
601  CCTCACCGCG  TGCACTGGTT  CGGCCGGGCC  TTTCCCTCTG  GGGAGCCCTA
651  TGCCCTTCAC  TGGGTGTAGT  GGGGAACCAG  GACTTTTACT  GTGAAAAAAT
701  TAGAGTGTTC  AAAGCAGGCC  TATGCTCGAA  TACATCAGCA  TGGAATAATA
751  GAATAGGACG  TGTGGTTCTA  TTTTGTTGGT  TTCTAGGACC  GCCGTAATGA
801  TTAATAGGGA  CAGTCGGGGG  CATCAGTATT  CAATTGTCAG  AGGTGAAATT
851  CTTGGATTTA  TTGAAGACTA  ACACTGCGAA  AGCATTTGCC  AAGGATGTTT
901  TCATTAATCA  GGAACGAAAG  TTAGGGGATC  GAAGACGATC  AGATCCGTCG
951  TAGTCTTAAC  CATAAACTAT  GCCGACTAGG  GATCGGACGA  TGTTATTTTT
1001 GACTCGTTCG  GCATACGAGA  AATCAAAGT
```

รูปผนวกที่ 18 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rDNA (Partial sequence, PCR primers NS1/SR2) ของเชื้อรา Endophyte, *Xylariaceae* sp. 5 (49T) ที่แยกได้จาก**โคนต้น**ว่านขันหมาก**ต้นเล็ก**

```
1    ATAACATCGT  CCGATCCCTA  GTCGGCATAG  TTTATGGTTA  AGACTACGAC
51   GGTATCTGAT  CGTCTTCGAT  CCCCTAACTT  TCGTTCCTGA  TTAATGAAAA
101  CATCCTTGGC  AAATGCTTTC  GCAGTAGTTA  GTCTTCAATA  AATCCAAGAA
151  TTTCACCTCT  GACAATTGAA  TACTGATGCC  CCCGACTGTC  CCTATTAATC
201  ATTACGGCGG  TCCTAGAAAC  CAACAAAATA  GAACCACACG  TCCTATTCTA
251  TTATTCCATG  CTGATGTATT  CGAGCATAGG  CCTGCTTTGA  ACACTCTAAT
301  TTTTTCACAG  TAAAAGTCCT  GGTTCCCCAC  TACACCCAGT  GAAGGGCATA
351  GGGCTCCCCA  GAGGGAAAGG  CCCGGCCAAA  CCAGTGCACG  CGGTGAGGCG
401  GACCGGCCAG  CCAGGCCCAA  GGTTACGAAC  TACGAGCTTT  TTAATTGCAA
451  CAACTTTAAT  ATACGCTATT  GGAGCTGGAA  TTACCGCGGC  TGCTGGCACC
501  AGACTTGCCC  TCCAATTGTT  CCTCGTTAAG  GGATTTAAAT  TGTACTCATT
551  CCAATTACAA  GACCCAAAAG  AGCCCTGTAT  CAGTATTTAT  TGTCACTACC
601  TCCCCGTGTC  GGGATTGGGT  AATTTGCGCG  CCTGCTGCCT  TCCTTGGATG
651  TAGTAGCCGT  TTCTCAGGCT  CCTTCTCCGG  GGTCGAGCCC  TAACCCTCCG
701  TTACCCGTTG  TAACCATGGC  AGGCCAAGAC  CCTGCCATCG  AAAGTTGATA
751  GGGCAGAAAT  TTGAATGAAC  CATCGCCGGC  GCAAGGCCAT  GCGATTCGAG
801  AAGTTATTAT  GAATCACCAG  TAAGCCCCGA  GGGGCATTGG  TTTTTAATCT
851  AATAAATACA  TCCCTCCGTG  AGTCGGGATT  TTTAGCATGT  TTAGCTCTAG
901  AATTACCACG  GTTATCCAAG  TAGTAAGGTA  CTATCAGGTA  AACGATAACT
951  GA
```

รูปผนวกที่ 19 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rDNA (Partial sequence, PCR primers NS1/SR2) ของเชื้อรา Endophyte, *Phomopsis* sp. 2 (46R) ที่แยกได้จาก**ราก**ว่านขันหมาก**ต้นเล็ก**

```
1    CGGAGCAAAA GCGACTSCGG TTTACTCCTG GTGGGTGCCC TTCCCGTCAA
51   TTTCTTTAAA GTTTCAAGCC CTTGCGACCA ATACTCCCCC CAGACCCAAA
101  CTCGATTTCT CGTAAGGTGC CTGAACGAGT CAAAAATAAC ATCGTCGATC
151  CCTAGTCGGC ATAGTTTATG GTTAAGACTA CGACGGTATC TGATCGTCTT
201  CGATCCCCTA ACTTTCGTTC CTGATTAATG AAAACATCCT TGGCAAATGC
251  TTTCGCAGTA GTTAGTCTTC AATAAATCCA AGAATTTCAC CTCTGACAAT
301  TGAATACTGA TGCCCCCGAC TGTCCCTATT AATCATTACG GCGTCCTAGA
351  AACCAACAAA ATAGAACCAC ACGTCCTATT CTATTATTCC ATGCTGATGT
401  ATTCGAGCAT AGGCCTGCTT TGAACACTCT AATTTTTTCA CAGTAAAAGT
451  CCTGGTTCCC CACTACACCC AGTGAAGGGC ATAGGGCTCC CCAGAGGGAA
501  AGGCCCGGCC AAACCAGTGC ACGCGGTGAG GCGGACCGGC CAGCCAGGCC
551  CAAGGTTCAA CTACGAGCTT TTTAACTGCA ACAACTTTAA TATACGCTAT
601  TGGAGCTGGA ATTACCGCGG CTGCTGGCAC CAGACTTGCC CTCCAATTGT
651  TCCTCGTTAA GGGTTTAAAT TGTACTCTCC ATTACAAGAC CCAAAAAGAG
701  CCCTGTATCA GTATTTATTG TCACTACCCC CCTGTCGGGA TTGGGTAATT
751  TGCGCGCCTG CTGCCTTTCC TTGGATGTAG TAGCCGTTTC TCAGGCTCCT
801  TCTCCGGGGT CGAGCCCTAA CCCTCCGTTA CCCGTTGTAA CCATGGCAGG
851  CCAAGACCCT GCCATCGAAA GTTGATAGGG CAGAAATTTG AATGAACCAT
901  CGCCGGCGCA AGGCCATGCG ATTCGAGAAG TTATTATGAA TCACCAGTAA
951  GCCCCGAGGG GCATTGGTTT TTAATCTAAT AAATACATCC CTCGTGAGTC
1001 GGGATTTTTA GCATGTACCC GCTCTAGAAT TACCACGGTT ATCCAAGTAG
1051 TAAGGTACAA TCAAATAAAC AATAACTGAT TAAATGAGCC ATTCGCAGGG
1101 CGCCGTCCC
```

รูปผนวกที่ 20 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rDNA (Partial sequence, PCR primers NS1/SR2) ของเชื้อรา Endophyte, *Xylaria* sp. 1 (51R) ที่แยกได้จาก**ราก**ว่านขันหมาก**ต้นเล็ก**

```
1    AAAGCTTGTT TCAAAGATTA ACCATGCTTC GTATAGCTTA TACCGCGAAA
51   CTGCGAATGG CTCATTATTA AGTTATCGTT TATTTGATAG TACCTTACTA
101  CTTGGATAAC CGTGGTAATT CTAGAGCTAA TACATGCTAA AAATCCCGAC
151  TTCGGAAGGG ATGTATTTAT TAGATTAAAA ACCAATGCCC TTCGGGGCTC
201  ACTTGGTGAT TCATAATAAC TTCTCGAATC GCATGGCCTT GCGCCGGCGA
251  TGGTTCATTC AAATTTCTTC CCTATCAACT TTCGATGCTA GAGTAGTGTT
301  CTAGCATGGT TACAACGGGT AACGGAGGGT TAGGGCTCGA CCCCGGAGAA
351  GGAGCCTGAG AAACGGCTAC TACATCCAAG GAAGGCAGCA GGCGCGCAAA
401  TTACCCAATC CCGACACGGG GAGGTAGTGA CGATAAATAC TGGATACAGG
451  GCTCTTTTGG GTCTTTAATT GGAATGAGTC AATTAAATCC CTAACGAGGA
501  CAATTGGAGG GCAAGTCTGG TGCCAGCAGC CGCGGTAATT CCAGCTCCAA
551  TAGCGTATAT TAAAGTTGTT GAGTAAACAT AGTAAACCTT GGGCCTGGCT
601  GGCCGGTCCG CCTCACCGCG TGCACTGGTC CGGCCGGGCC TTTCCCTCTG
651  TGAACCGCAT GCCCTTCACT GGGTGTGCCG GGGAAACAGG CTTTTACTTT
701  GAAAAAATTA GTGCTCCAGG CAGGCCTATG CTCGAATACA TTAGCATGGA
751  ATAATAGAAT AGGACGTGTG GTTCTATTTT GTTGGTTTCT AGGACCGCCG
801  TAATGATTAA TAGGGACAGT CGGGGGCATC AGTATTCAAT TGTCAGAGGT
851  GAAATTCTTG GATTTATTGA AGACTAACTA CTGCGAAAGC ATTTGCCAAG
901  GATGTTTTCA TTTATCAGGA ACGAAAGTTA GGGGATCGAA GACGATCAGA
951  TACCGTCGTA GTCTTAACCA TAAACTATGC CGACTAGGGA TCGGACGATG
1001 TTATTTTTTG ACTCGTTCGG CACCTTACGA GAAATCAAAG TGCTTGGGCT
1051 CCAGGGGGAG TATGGTCGCA AGGCTGAAAC TTAAAGAAAT TGACGGAAGG
1101 GCACCACCAG GGGTAAACCG TAGCCGTTTC GCTTGCCCCA ACAGCGAGCC
1151 CCGCAAAGGG TCCGGTGGAC ACCCCACAAA TCGCTAGTCA CCGCTCGCCG
1201 GGGCGACATC CCATTGCGGG AAACCCTCAG GTTGGCCTTC TAACACCCCC
1251 AAAGGACCCT TTGGGGGGGG TAACGCCCCG GTCAGGAAAC TTCCGTTATG
1301 AGATTACCAA TTTAGGAAGG ATTCCAGGGA AGGTTAAACT TCGGTTTGGG
1351 GCCCCCCCCC CC
```

รูปผนวกที่ 21 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rDNA (Partial sequence, PCR primers NS1/SR2) ของเชื้อรา Endophyte, *Phomopsis* sp. 15 (31a) ที่แยกได้จาก**ใบ**ว่านขันหมาก**ต้นใหญ่**

```
1    AGCTCCATGT  AGCCCGTGTA  GAGCGCGCAA  AGGTGTCGGT  CTTATAGCGA
51   TATAAGGCTT  AAGGTACGTG  CCAGTCCCCG  TAGAAATACG  GGCTAGATAT
101  AAGAGCGCCC  GCCGCGTGAA  GATATCTAGG  TGCTGTTATG  ACGAATAACA
151  GCGCTGTAAA  CAAATAAAAA  CGGCCAGCAG  CCGCGGTAAT  TCCAGCTCCA
201  ATAGCGTATA  TTAAAGTTGT  TGCAGTTAAA  AAGCTCGTAT  AACCTTGGGC
251  CTGGCGGCCG  GTCCGCCTCA  CCGCGTGCAC  TGGTTCGGCC  GGGCTTTCCC
301  TCTGGGGAAC  CCCATGCCCT  TCACTGGGTG  TGGCGGGGAA  CCAGGACTTT
351  TACTGTGAAA  AAATAAAGTT  TCAAAGCAGG  CCTATGCTCG  AATCATCCGA
401  ATATAGAATA  GGACGCGCGG  TTCTATTTTG  TTGGTTTCTA  GGACCGCCGT
451  AATGATTAAT  AGGGACAGTC  GGGGGCATCA  GTATTCAATT  GTCAGAGGTG
501  AAATTCTTGG  ATTTATTGAA  GACTAACTAC  TGCGAAAGCA  TTTGCCAAGG
551  ATGTTTTCAT  TAATCAGGAA  CGAAAGTTAG  GGGATCGAAG  ACGACAGATG
601  TGTGTTTAAC  CCAATAAAAC  TTAATGCCCG  ACTTAAGGGA  TCGGGGACGA
651  TGGTTATTTT  TTTGAACTTC  GGTTCGGGCA  CCCTTTACGG  AGAAAATCAA
701  AAGTCTTTTG  GGGTTCTTGG  GGGGAGTAAT  GGTCGCAAGG  CTTGAAACTT
751  TAAAGAAATT  GACGGAAGGG  CACCACCAGG  GGTAAACCAG  ATTCCGCAAG
801  CGTCTCTGCC  CCCTAAAGCG  GTCTGGAATA  CAGAAGGGTC  GGGGCCCTAC
851  ATACCGCTAG  TCGCTACCCT  GTAGCGGCGA  CATCCCTAAA  GGCGGGAAAA
901  CCCTTAAACT  TAGCGACCAA  ACCGCCCTAG  AAAAGGGCGG  GGCCGGGCGT
951  AACGGCTCCG  GGTACGGTAA  CACTGCTGAG  AGGTTGGGCC  ACTCGCAGCC
1001 AAGCCCCTTA  ACTGGGGAAG  GTTCAGAGAC  TAGATAGGGG  TGGGCGTTAT
1051 ACCGGAGCTA  CCCTGTAGCT  ACCCTGTAAT  GCCTAAGATA  TAGTCCGTCC
1101 ACAGGCGAAA  GCCATCGTGG  TAAAGTTAGT  AATAATTCGG  GAGCCTGCGG
1151 CTAATTTGAC  TCCAACACAG  TTAAACTCCA  CC
```

รูปผนวกที่ 22 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rDNA (Partial sequence, PCR primers NS1/SR2) ของเชื้อรา Endophyte, *Collectotrichum* sp. 10 (34a) 96% Identity ที่แยกได้จาก**ใบ**ว่านขันหมาก**ต้นใหญ่**

```
1    GTACACTGGC  CGCCTGCATG  TCCCTTGTAT  ACGCCCATTA  TACTGTGAAA
51   CTGCGAATGG  CTCATTTAAT  CAGTTATAGT  TTATTTGATG  TTTCTTGCTA
101  CATGGATAAC  TGTGGTAATT  CTAGAGCTAA  TACATGCGTA  AAAAGCCCCG
151  ACTTCTGGAA  GGGGTGTATT  TATTAGATAA  AAACCATCCT  CCTCGGAGTT
201  TGGTGATTCA  TAATAACTTC  TCGAATCGCA  CGGCCTTGTG  CTGGCGATGC
251  TTCATTCAAA  TATCTGCCCT  ATCAACTGTC  GATGGTAGGA  TAGAGGCCTA
301  CCATGGTTGC  AACGGGTAAC  GGGGAATAAG  GGTTCGATTC  CGGAGAGGGA
351  GCCTGAGAAA  CGGCTACCAC  ATCCAAGGAA  GGCAGCAGGC  GCGCAAATTA
401  CCCAATCCCG  ACACGGGGAG  GTAGTGACAA  TAAATAACAA  TGCAGGGCCC
451  TTTTGGGTCT  TGTAATTGGA  ATGAGTACAA  TTTAAATCCC  TTAACGAGGA
501  ACGATTGGAG  GGCAAGTCTG  GTGCCAGCAG  CCGCGGTAAT  TCCAGCTCCA
551  ATAGCGTATA  TTAAAGTTGT  TGCAGTTAAA  AAGCTCGTAG  TTGAAGTTTG
601  GTCTCGGACC  CTGGGTCTGC  TTCATTGCAT  GTACTTGACG  GTCCGAGACT
651  TCCTTCTTGG  TGAACGGCCG  CCTTCGGGTG  GTCCGGAACC  AGGACTATTA
701  CTTTGAAAAA  ATTAGAGTGT  TCAAAGCAGG  CCATAGGCCC  GAATATATTA
751  GCATGGAATA  ACAAATAGGA  CGTGCGGTTC  TATTTTGTTG  GTTTCTAAAC
801  TGCCGTAATG  ATTAAAAGGG  ACAGCCGGGG  GCATTAGTAT  TTGCACGCTA
851  GAGGTGAAAT  TCTTGGATTG  TGCAAAGACT  TCCTACTGCG  AAAGCATTTG
901  CCAAGAATGT  TTTCATTAAT  CAAGAACGAA  GGTTAGGGTA  TCGAAAACGA
951  TTAGATACCG  TTGTAGTCTT  AACAGTAAAC  TATGCCGACT  CCGAATCGGT
1001 CGATGCTCAT  TTCACTGGCT  CGATCGGCGC  GGTACGAGAA  ATCAAAGTTT
1051 TTGGGTTCTG  GGGGGAGTAT  GGTCGCAAGG  CTGAAACTTA  AAGAATTGAC
1101 GGAAGGGCAC  CACCAGGAGT  GGAGCAGCGG  CTTAATAAAC  TCAACACGGG
1151 AAAACTCACC  GGGTCCGGAC  ATAGTAAGGA  AGACAGAT
```

รูปผนวกที่ 23 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rDNA (Partial sequence, PCR primers NS1/SR2) ของเชื้อรา Endophyte, *Phomopsis* sp. 8 (17b) ที่แยกได้จาก**ใบ**ว่านขันหมาก**ต้นใหญ่**

```
1    GTGTCCCGGA CCTGGTGAGT TTCCCCGTGT TGAGTCAAT  TAAGCCGCAT
51   GCTCCACCCC TGGTGGTGCC CTTCCGTCAA TNNCTTTAAG TTTCAGCCTT
101  GCGACCATAC TCCCCCTGGA GCCCAAGCAC TTTGATTTCT CGTAAGGTGC
151  CGAACGAGTC AAAAAATAAC ATCGTCCGAT CCCTAGTCGG CATAGTTTAT
201  GGTTAAGACT ACGACGGTAT CTGATCGTCT TCGATCCCCT AACTTTCGTT
251  CCTGATAAAT GAAAACATCC TTGGCAAATG CTTTCGCAGT AGTTAGTCTT
301  CAATAAATCC AAGAATTTCA CCTCTGACAA TTGAATACTG ATGCCCCCGA
351  CTGTCCCTAT TAATCATTAC GGCGGTCCTA GAAACCAACA AAATAGAACC
401  ACACGTCCTA TTCTATTATT CCATGCTAAT GTATTCGAGC ATAGGCCTGC
451  CTGGAGCACT TCTAATTTTT TCAAAGTAAA AATATAGTTT CGCCAACACA
501  CCCAGTGAAG GGCATGCGGT TAGACTATGG TGGGAGCCCG GCCGGACCAG
551  TACACGCGGT GAGGCGGACC GGTAGCCAGG CCCAAGGTTT TACTACGAGC
601  TTTTTACCAC AACAACTTTA ATATACGCTA TTGGAGCTGG AATTACCGCG
651  GCTGCTGGCA CCAGACTTGC CCTCCAATTG TTCCTCGTTA AGGGATTTAA
701  ATGTACTCAT TCCAATTCAC CCAAAAGGAG CCCTGTCAGT ATTTATCGTC
751  ACTACCTCCC CGTGTCGGGA TTGGGTAATT TGCGCGCCTG CTGCCTTCCT
801  TGGATGTAGT AGCCGTTTCT CAGGCTCCTT CTCCGGGGTC GAGCCCTAAC
851  CCTCCGTTAC CCGTTGTAAC CATGCTAGAA CACTACTCTA GCATCGAAAG
901  TTGATAGGGA AGAAATTTGA ATGAACCATC GCCGGCGCAA GGCCATGCGA
951  TTCGAGAAGT TATTATGAAT CACCAGTGAG CCCCGAAGGG CATTGGTTTT
1001 TAATCTAATA AATACATCCC TTCCGAAGTC GGGATTTTTA GCATGTATTA
1051 GCTCTAGAAT TACCACGGTT ATCCAAGTAG TAAGGTACTA TCAGATAAAC
1101 GATAACTTAT AAATGAGCCA TTCGCAGTTT CGCTGTATAA TTGCTTATAC
1151 TTAGACATGC ATGGCTTAAT CTTTGAGACA AGTTTTCCCC TCCC
```

รูปผนวกที่ 24 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rDNA (Partial sequence, PCR primers NS1/SR2) ของเชื้อรา Endophyte, *Phomopsis* sp. 12 (24B) ที่แยกได้จาก**ใบ**ว่านขันหมาก**ต้นใหญ่**

```
1    AGTGTCTGGA CCTGGTGATT CAAACTGTGT TAGAGTCACA GCCGCAGGCT
51   CCACGCCTGG TGGTGCCCTT CCGTCAATTT CTTTAAGTTT CAGCCTTGCG
101  ACCATACTCC CCCCAAACCC AAAGACTTTG ATTTCTCGTA AGGTGCCGAG
151  CGAGTCAAAA TAATAACATC GCCCGATCCC TAGTCGGCAT AGTTTACGGT
201  TAAGACTACG ACGGTATCTG ATCGTCTTCG ATCCCCTAAC TTTCGTTCAC
251  TGATTAATGA AAACATCCTT GGCAAATGCT TTCGCAGTAG TTAGTCTTCA
301  ATAAATCCAA GAATTTCACC TCTGACAATT GAATACTGAT GCCCCCGACT
351  ATCCCTATTA ATCATTACGG CGGTCCTAGA AACCAACAAA ATAGGACCGC
401  ACGTCCTATT CTATTATTCC ATGCTAATGT ATTCGAGCAA AGGCCTGCTT
451  TGAACACTCT AATTTTTTCA AAGTAAAAGT CCTGGTTCCC CGACACACCC
501  AGTGAAGGGC ATGCGGATCC CCAGAAGGAA AGGCCCGGCC GGACCAGTAC
551  ACGCGGTGAG GCGGACCGGC CAGCCAGGCC CAAGGTTCAA CTACGAGCTT
601  TTTAACTGCA ACAACTTTAA TATACGCTAT TGGAGCTGGA ATTACCGCGG
651  CTGCTGGCAC CAGACTTGCC TCCAATTGTT CCTCGTTAAG GATTTAAATT
701  GACTCATTCC AATTACAAGA CTCGAAAGAG CCCTGTATCA GTATTTATTG
751  TCACTACCTC CCCGTGTCGG GATTGGGTAA TTTGCGCGCC TGCTGCCTTC
801  CTTGGATGTG GTAGCCGTTT CTCAGGCTCC CTCTCCGGAA TAGAACCCTA
851  ATTCCCCGTT ACCCGTTGCT ACCATGGTAG GCCACTATCC TACCATCGAA
901  AGTTGATAGG GCAGAAATTT GAATGAACCA TCGCCGGCGC AAGGCCATGC
951  GATTCGTTAA GTTATCATGA ATCACCAAGG AGCCCCGAAG GGCATTGGTT
1001 TTTTATCTAA TAAATACACC CCTTCGAAGT CGAGGTTTTT AGCATGTATT
1051 AGCTCTAGAA TTACCACGGT TATCCAAGTA GTAAGGTACT ATCAAATAAA
1101 CGAAACTGAT TTAATGAGCC ATTCGCAGTT TCACAGTATA GATG
```

รูปผนวกที่ 25 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rDNA (Partial sequence, PCR primers NS1/SR2) ของเชื้อรา Endophyte, *Guignardia mangiferae* (9บ ขญ) 99% Identity ที่แยกได้จาก**ใบ**ว่านขันหมาก**ต้นใหญ่**

```
1    CTTGTCTCAA  AGATTAAGCC  ATGCATGTCT  AAGTATAAGC  ACTCATACTG
51   TGAAACTGCG  AATGGCTTTA  ATCAGTTATC  GATTTGATAG  TACCTTACTA
101  CTTGGATACC  CGTGGTAATT  CTAGAGCTAA  TACATGCTAA  AAACCCCAAC
151  TTCGGAAGGG  GTGTGTTTAT  TAGATAAAAA  ACCAATGCCC  TTCGGGGCTG
201  CTTGGTGATT  CATGATAACC  AAACGAATCG  CATGGCCTTG  AGCCGGCGAT
251  GGTTCATTCA  AATTTCTGCC  CTATCAACTT  TCGATGGTAG  GATCTGGGCC
301  TACCATGGTA  TCAACGGGTA  ACGGGGAATT  AGGGTTCGAT  TCCGGAGAGG
351  GAGCCTGAGA  AACGGCTACC  ACATCCAAGG  AAGGCAGCAG  GCGCGCAAAT
401  TACCCAATCC  CGACGCGGGG  AGGTAGTGAC  AATAAATACT  GATACAGGGC
451  TCTTTAGGGT  CTTGTAATTG  GAATGAGTAC  AATTTAAACC  CCTTAACGAG
501  GAACAATTGG  AGGGCAAGTC  TGGTGCCAGC  AGCCGCGGTA  ATTCCAGCTC
551  CAATAGCGTA  TATTAAAGTT  GTTGCATAAA  AAGCTCGTGT  GACCTTGGGC
601  CAGCGCCGGT  CCGCCTTACC  GCGTGCACTG  GTTTGGCCGG  GCCCTTTCCT
651  CTGGCAAACC  GCATGCCCTT  CACTGGGCGT  GTCGGGGAAC  CAGGAGTTTT
701  ACTTTGAAAA  AATAAGAGTG  TTCAAAGCAG  GCCTTTGCTC  GGATACATTA
751  GCATGGAATA  ATAGAATAGG  ACGCGTGGTT  CTATTTTGTT  GGTTTCTAGA
801  ACCGCCGTAA  TGATTAATAG  GGACAGTCGG  GGGCATCAGT  ATTCAGACGC
851  GAGAGGTGAA  ATTCTTAGAC  CGTCTGAAGA  CTAACTACTG  CGAAAGCATT
901  TGCCAAGGAT  GTTTTCATTA  ATCAGTGAAC  GAAAGTTGGG  GGATCGAAGA
951  CGATCAGATA  CCGTCGTAGT  CTCAACCGTA  AACTATGCCG  ACTAGGGATC
1001 GGGCGACGTT  CCAATTATGA  CTCGCCCGGC  ACCTTACGAG  AAATCAAAGT
1051 TTTTGGGTTC  TGGGGGGAGT  ATGGTCGCAA  GGCTGAAACT  TAAAGAAATT
1101 GACGGAAGGG  CACCACCAGG  CGTGGAGCCT  GCGGCTTAAT  TTGACTCAAC
1151 ACAAAAAAAC  TCCACCAGGT  CCAGACACAA  GGAGGCTTG
```

รูปผนวกที่ 26 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rDNA (Partial sequence, PCR primers NS1/SR2) ของเชื้อรา Endophyte, *Ascomycete* sp. (41m) 97% Identity ที่แยกได้จาก**ก้าน**ว่านขันหมาก**ต้นเล็ก**

```
1    CATACAGGCG  AAACGCGAAT  GGCTTCATTA  TAAGTTATCC  GTTATTGATA
51   GTACCTTTAC  CACTTGTAAC  CGGGAATTTA  GAGCAATGAC  TGCTAAAAAT
101  GCCCGACTTA  CGAAGGGATG  TATTTATTAA  GATTAAAAAC  CAATGCCCTT
151  ACGGGGCTCA  CTGGTGGATT  CATGAATAAA  CTTCTCCGAA  TGCGCATGGG
201  CCTTGCGCCG  GCGATGGGTT  CATTCCAAAT  TTCTTCCCCT  ATCCAACTTT
251  CCGATGCTAG  AGTAGTGTTC  TAAGCATGGG  TTACAACGGG  TAAACGGAGG
301  GTTAGGCTCC  GACCCCGGAG  AAGGAGCCTG  GAGAAACGGC  TACTACATCC
351  AAGGAAGGCA  GCAGGCGCGC  AAATTACCCA  ATCCCGACAC  GGGGAGGTAG
401  TGACGATAAA  TACTGATACA  GGGCTCTTTT  GGGTCTTGTA  ATTGGAATGA
451  GTACAATTTA  AATCCCTTAA  CGAGGAACAA  TTGGAGGGCA  AGTCTGGTGC
501  CAGCAGCCGC  GGTAATTCCA  GCTCCAATAG  CGTATATTAA  GTTGTTRTGG
551  TTAAAAGTCG  TAGTATAACC  TTGGGCCTGG  CTGGCCGGTC  CGCCTCACCG
601  CGTGCACTGG  TCCGGCCGGG  CCTTTCCCCC  TGTGGAACCT  CATGCCCTTC
651  ACTGGGTGTG  TGGGAAAACA  GGCTTTTACT  TTGAAAAAAT  TAGAGTGCTC
701  CAGGCAGGCC  TATGCTCGAA  TCATTAGCAT  GGAATAATAG  AATAGGACGT
751  GTGGTTCTAT  TTTGTTGGTT  TCTAGGACCG  CCGTAATGAT  TAATAGGGAC
801  AGTCGGGGGC  ATCAGTATTC  AATTGTCAGA  GGTGAAATTC  TTGGATTTAT
851  TGAAGACTAA  CTACTGCGAA  AGCATTTGCC  AAGGATGTTT  TCATTTATCA
901  GGAACGAAAG  TTAGGGGATC  GAAGACGATC  AGATACCGTC  GTAGTCTTAA
951  CCATAAACTA  TGCCGACTAG  GGATCGGACG  ATGTTATTTT  TTGACTCGTT
1001 CGGCACCTTA  CGAGAAATCA  AAGTGCTTGG  GCTCCAGGGG  GAGTATGGTC
1051 GCAAGGCTGA  AACTTAAAGA  AATTGACGGA  GGCACCACCA  GGGGTGGAGC
1101 CTGCGGCTTA  ATTTGACTCA  ACACGGGGAA  ACTCACCAGG  TCCAGACACA
1151 TGAGGAAAGA  CAGATTGGGA  GCTCC
```

รูปผนวกที่ 27 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rDNA (Partial sequence, PCR primers NS1/SR2) ของเชื้อรา Endophyte, *Glomerella cinguiata* (2ล ขญ) 93% Identity ที่แยกได้จาก**ลำต้น**ว่านขันหมาก**ต้นใหญ่**

```
1    ATAAACGGCG AAACTGCGAA TGGCTCATTT TATCAGTTAT CGTATATTTG
51   ATAGTACCTA CTACATGGAT AACCGTGGTA ATTCTAGAGC TAATACATGC
101  TTAAAATCCC GACTTCGGAA GGGATGTATT TATTAGATTA AAAACCAATG
151  CCCTTCGGGG CTCACTTGGT GATTCATAAT AACTTCTCGA ATCGCATGGC
201  CTTGCGCCGG CGATGGTTCA TTCAAATTTC TGCCCTATCA ACTTTCGACG
251  GCTGGGTCTT GGCCAGCCGT GGTTACAACG GGTAACGGAG GGTTAGGGCT
301  TGACCCCGGA GAAGGAGCCT GAGAAACGGC TACTACATCC AAGGAAGGCA
351  GCAGGCGCGC AAATTACCCA ATCCCGACTC GGGGAGGTAG TGACAATAAA
401  TACTTGATAC AGGGCTCTTT TGGGTCTTGT AATTGGAATG AGTACAATTT
451  AAATCCCTTA ACGAGGAACA ATTGGAGGGC AAGTCTGGTG CCAGCAGCCG
501  CGGTAATTCC AGCTCCAATA GCGTATATTA AAGTTGTTGC AGTTAAAAAG
551  CTCGTAGTTG AACCTTGGGC CTGGCTCGGC CGGTCTGCCT CACCGCATGC
601  ACTGGTCCGG CCGGGCTTTC CTCTGGGGAG CCGCATGCCT TCACTGGGTG
651  TGTCGGGGAA CTCAGGACTT TTACTGTGAA AAAATTAGAG TGTTCAAAGC
701  AGGCATATGC TCGAATACAT TAGCATGAAT AATAGAATAG GACGTCGCGG
751  TTCTATTTTG TTGGTTTCTA GACCGCCGTA TTTAATAGGG ACAGTCGGGG
801  GCTCAGTATT CATCGTCAAG GTAAATTCTT GGATCGATTG AAGACTAACT
851  ACTGCGAAAG CATTTGCCAG ATGTTTTCAT TAATCAGGAA CGAAAGTTAG
901  GGGATCGAAA CGATCAGATA CCGTTGTAGT CTTAACCATA AACTATGCCG
951  ACTAGGGATC GGGCGGTGTT ATTTCTTGAC CCGCTCGGCA CCTTACACGA
1001 AAGTAAAGTT TTTGGGTTCT GGGGGGAGTA TGGTCGCAAG GCTGAAACTT
1051 AAAGACCTTG ACGGAAGGGC ACCACAAGGG GTGGAGCAAC GGCTTAATAA
1101 AACTCAACAC GGGGAAACTC ACCAGGTCCG GGACACTTCT ACG
```

รูปผนวกที่ 28 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rDNA (Partial sequence, PCR primers NS1/SR2) ของเชื้อรา Endophyte, *Phomopsis* sp. (4ล ขญ) 98% Identity ที่แยกได้จาก**ลำต้น**ว่านขันหมาก**ต้นใหญ่**

```
1    CCCCCCCTTT CCCAAGCACT TTATTTCTCG TAAGGGCCGA ACGAGTCAAA
51   AAATAACATC GTCCGATCCC TAGTCGGCAT AGTTTATGGT TAAGACTCGA
101  CGGTATCTGA TCGTCTTCGA TCCCCTAACT TTCGTTCCTG ATAAATGAAA
151  ACATCCTTGG CAAATGCTTT CGCAGTAGTT AGTCTTCAAT AAATCCAAGA
201  ATTTCACCTC TGACAATTGA ATACTGATGC CCCCGACTGT CCCTATTAAT
251  CATTACGGCG GTCCTAGAAA CCAACAAAAT AGAACCACAC GTCCTATTCT
301  ATTATTCCAT GCTAATGTAT TCGAGCATAG GCCTGCCTGG AGCACTCTAA
351  TTTTTTCAAA GTAAAAGTCC TGTTTCCCCG GCACACCCAG TGAAGGGCAT
401  GCGGTTCCAC AGAGGGAAAG GCCCGGCCGG ACCAGTGCAC GCGGTGAGGC
451  GGACCGGCCA GCCAGGCCCA AGGTTCTACT ACGAGCTTTT TAACCACAAC
501  AACTTTAATA TACGCTATTG GAGCTGGAAT TACCGCGGCT GCTGGCACCA
551  GACTTGCCCT CCAATTGTTC CTCGTTAAGG GATTTAAATT GTACTCATTC
601  CAATTACAAG ACCCAAAAGA GCCCTGTATC AGTATTTATC GTCACTACCT
651  CCCCGAGTCG GGATTGGGTA ATTTGCGCGC CTGCTGCCTT CCTTGGATGT
701  AGTAGCCGTT TCTCAGGCTC CTTCTCCGGG GTCGAGCCCT AACCCTCCGT
751  TACCCGTTGT AACCATGCTA GAACACTACT CTAGCATCGA AAGTTGATAG
801  GGAAGAAATT TGAATGAACC ATCGCCGGCG CAAGGCCATG CGATTCGAGA
851  AGTTATTATG AATCACCAGT GAGCCCCGAA GGGCATTGGT TTTTAATCTA
901  ATAAATACAT CCCTCCGAAG TCGGGATTTT TAGCATGTAC CAGCTCTAGA
951  ATTACCACGG GTTATCCAAG TAGTAAGGTA CAATCAAATA AAAATAACTT
1001 ATATAATGAG CCATTCGCAG GTCGCTGTAT CATTAAAATA CTGGACATCC
1051 ATC
```

รูปผนวกที่ 29 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rDNA (Partial sequence, PCR primers NS1/SR2) ของเชื้อรา Endophyte, *Colletotrichum truncatum* (8ล ขญ) 98% Identity ที่แยกได้จาก**ลำต้น**ว่านขันหมาก**ใบใหญ่**

```
1    AAACTTGTCT  CAAAATTAAG  CCATGCATGT  CTATATAGCA  GGGGCAGCGG
51   AATGTCTCAT  TATCAGTTAT  CGTTATTGAT  AGTACCTTAC  TACTTGGATA
101  ACCGTGGTAA  TTCTAGAGCT  AATACATGCT  AAAAATCCCG  ACTCACGAAG
151  AGGTGTATTT  ATTAGATTAA  AAACCAATGC  CCCTCGGGGC  TTTCTGGTGA
201  TTCATAATAA  CTTCTCGAAT  CGCATGGCCT  TGCGCCGGCG  ATGGTTCATT
251  CAAATTTCTG  CCCTATCAAC  TTTCGATGGC  AGGGTCTTGG  CCTGCCATGG
301  TTACAACGGG  TAACGGAGGG  TTAGGGCTCG  ACCCCGGAGA  AGGAGCCTGA
351  GAAACGGCTA  CTACATCCAA  GGAAGGCAGC  AGGCGCGCAA  ATTACCCCAA
401  TCCCGACACG  GGGAGGTAGT  GACAATAAAT  ACTGATACAG  GGCTCTTTTG
451  GGTCTTGTAA  TTGGAATGAG  TACAATTTAA  ATCCCTTAAC  GAGGAACAAT
501  TGGAGGGCAA  GTCTGGTGCC  AGCAGCCGCG  GTAATTCCAG  CTCCAATAGC
551  GTATATTAAG  TTGTTGCAGT  AAAAAAGCTC  GTAGTTGAAC  CTTGGGCCTG
601  GCTGGCCGGT  CCGCCTCACC  GCGTGCACTG  GTTCGGCCGG  GCCTTTCCCT
651  CTGGGGAGCC  CTATGCCCTT  CACTGGGTGT  AGTGGGGAAC  CAGGACTTTA
701  CTGTGAAAAA  ATTAGAGTGT  TCAAAGCAGG  CCTATGCTCG  GAATACATCA
751  GCATGGAATA  ATAGAATAGG  ACGGTGTGGT  TCTATTTTGT  TGGTTTCTAG
801  GACCGCCGTA  ATGATTAATA  GGACAGTCGG  GGGCATCAGT  ATTCAATTGT
851  CAAGGTGAAA  TTCTTGGATT  TATTGAAGAC  TAACTACTGC  GAAAGCATTT
901  GCCAAGATGT  TTTCATTAAT  CAGGAACGAA  AGTTAGGGGA  TCGAAGACGA
951  TCAGATACCG  TCGTAGTCTT  AACCATAAAC  TATGCCGACT  AGGGATCGGA
1001 CGATGTTATT  TTTTGACTCG  TTCGGCACCT  TACGAGAAAT  CAAAGTCTTT
1051 GGGTTCTGGG  GGGAGTATGG  TCGCAAGGCT  GAAACTTAAA  GCCCTTGACG
1101 GAAGGGCACC  ACCAGGAGTG  GAGAACGGCT  TAATGACTCA  ACACGGGGGA
1151 ACTCACCAGT  GTAGGCATAC  TGCTGTAAAT  ACGA
```

รูปผนวกที่ 30 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rDNA (Partial sequence, PCR primers NS1/SR2) ของเชื้อรา Endophyte, *Daldinia* sp. 1 (11Q) ที่แยกได้จาก**โคนต้น**ว่านขันหมาก**ต้นใหญ่**

```
1    TGTGTCTGGN  ACCTGGTGAG  TTTCCATTGT  TGAGTCAAAT  CCGCCGCAGG
51   CTCCACCCCT  GGTGGTGCCC  TTCCGTCAAT  TTCTTTAAGT  TTCAGCCTTG
101  CGACCATACT  CCCCCCAGAA  CCCAAAGACT  TTGATTTCTC  GTAAGGTGCC
151  GAACGAGTCA  ATAAGTAAC   TCGTCCGATC  CCTAGTCGGC  ATAGTTTATG
201  GTTAAGACTA  CGACGGTATC  TGATCGTCTT  CGATCCCCTA  ACTTTCGTTC
251  CTGATTAATG  AAAACATCCT  TGGCAAATGC  TTTCGCAGTA  GTTAGTCTTC
301  AATAAATCCA  AGAATTTCAC  CTCTGACAAT  TGAATACTGA  TGCCCCCGAC
351  TGTCCCTATT  AATCATTACG  GCGGTCCTAG  AAACCAACAA  AATAGAACCA
401  CACGTCCTAT  TCTATTATTC  CATGCTAATG  TATTCGAGCA  TAGGCCTGCT
451  TTGAACACTC  TAATTTTTTC  ACAGTAAAAG  TCCTGGTTCC  CCGACACACT
501  CAGTGAAGAG  CATGCGGCTC  CCCAGAGGGA  AAGGCCCGGC  CGAACCAGTG
551  CACGCGGTGA  GGCGGACCGG  CCRGCCAGGC  CCAAGGTTAA  ACGAGCTTTT
601  AACTGCAACA  ACTTAATATA  CGCTATTGGA  GCTGGAATTA  CCGCGGCTGC
651  TGGCACCAGA  CTTGCCCTCC  AATTGTTCCT  CGTTAAGGGA  TTTAAATTGT
701  ACTCATTCCA  ATTACAGACC  CAAAAGGAGC  CCTGTTCAGT  ATTTATTGTC
751  ACTACCTCCC  CGAATCGGGA  TTGGGTAATT  TGCGCGCCTG  CTGCCTTCCT
801  TGGATGTAGT  AGCCGTTTCT  CAGGCTCCTT  CTCCGGGGTC  GAGCCCTAAC
851  CCTCCGTTAC  CCGTTGTAAC  CATGGCAGGC  CAAGACCCTG  CCATCGAAAG
901  TTGATAGGGC  AGAAATTTGA  ATGAACCATC  GCCGGCGCAA  GGCCATGCGA
951  TTCGAGAAGT  TATTATGAAT  CACCAGAAAG  CCCCGAAGGG  CATTGGTTTT
1001 TAATCTAATA  AATACACCCC  TTCGTGAGTC  GGGGTTTTTA  GCATGTATTA
1051 GCTCTAGAAT  TACCACGGTT  ATCCAAGTAG  TAAGGTACTA  TCAAATAAAC
1101 GATAACTGAA  ATGAGCCATT  CGCAGTTTCG  CGGTATAATG  CTTATACTAG
1151 AAGCATGTAA  TCGAGACAAG  CATT
```

รูปผนวกที่ 31 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rDNA (Partial sequence, PCR primers NS1/SR2) ของเชื้อรา Endophyte, *Pestalotiopsis* sp. (36Q) 97% Identity ที่แยกได้จาก**โคนต้น**ว่านขันหมาก**ต้นใหญ่**

```
1    GCCCAAGCAC  TCCCGATTTC  TCGTAAGGTG  CCGAACGAGT  CAAAAATAAC
51   ATCGTTCGAT  CCTAGTCGGC  ATAGTTTATG  GTTAAGACTA  CGACGGTATC
101  TGATCGTCTT  CGATCCCCTA  ACTTTCGTTC  CTGATAAATG  AAAACATCCT
151  TGGCAAATGC  TTTCGCAGTA  GTTAGTCTTC  AATAAATCCA  AGAATTTCAC
201  CTCTGACAAT  TGAATACTGA  TGCCCCCGAC  TGTCCCTATT  AATCATTACG
251  GCGGTCCTAG  AAACCAACAA  AATAGAACCA  CACGTCCTAT  TCTATTATTC
301  CATGCTAATG  TATTCGAGCA  TAGGCCTGCC  TGGAGCACTC  TAATTTTTTC
351  AAAGTAAAAG  TCCTGTTTTC  CCACACACCC  AGTGAAGGGC  ATGAGGTTCC
401  ACAGGGGGAA  AGGCCCGGCC  GGACCAGTGC  ACGCGGTGAG  GCGGACCGGC
451  CAGCCAGGCC  CAAGGTTCTA  CTACGAGCTT  TTTAACCACA  ACAACTTTAA
501  TATACGCTAT  TGGAGCTGAA  TTACCGCGGC  TGTGGCACCA  AGACTTGCCC
551  TCCAATTTGT  TCCTCGTTAA  GGGATTTAAA  TTGTACTCAT  TCCAATTACA
601  AGACCCAAAA  GAGCCCTGTA  TCAGTATTTA  TCGTCACTAC  CTCCCCGTGT
651  CGGGATTGGG  TAATTTGCGC  GCCTGCTGCC  TTCCTTGGAT  GTAGTAGCCG
701  TTTCTCAGGC  TCCTTCTCCG  GGGTCGAGCC  CTAACCCTCC  GTTACCCGTT
751  GTAACCATGC  TAGAACACTA  CTCTAGCATC  GAAAGTTGAT  AGGGAAGAAA
801  TTTGAATGAA  CCATCGCCGG  CGCAAGGCCA  TGCGATTCGA  GAAGTTATTA
851  TGAATCACCA  GTGAGCCCCG  AAGGGCATTG  GTTTTTAAAT  CTAAATAAAA
901  TACATCCCTT  CGTAAGGTCG  GGATTTTTAG  CATGTATTAG  CTCTAGAATT
951  ACCACGGGTT  ATCCAAGTAG  TAAGGGTACT  ATCAAAATAA  AACGATAACT
1001 TATATAATGA  GCCATTCGCA  GTTTCGCTGT  ATATTGCTTA  TACTGACATC
1051 CATGCTTAAT  CTTTG
```

รูปผนวกที่ 32 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rDNA (Partial sequence, PCR primers NS1/SR2) ของเชื้อรา Endophyte, *Glomerella cingulata* (23) 98% Identity ที่แยกได้จากว่านขันหมาก**ต้นใหญ่**

```
1    AAACTGTCTC  AAAGATTAAG  CCATGCATGT  CTAAGTATAA  GCAATCTATA
51   CAGTGAATGC  TGGCTCATTA  AATCATATCG  TTTATTTGGA  TAGTACCTTA
101  CTACTTGGAT  AACCGTGGTA  ATTCTAGAGC  TAATACATGC  TAAAAATCCC
151  GACCCCTGGA  AGGGATGTAT  TTATTAGATA  AAAAACCAAT  GCCTTCGGGC
201  TCCTTGGTGA  TTCATGATAA  CTTAACGAAT  CGCATGGCCT  TGCGCCGGCG
251  ATGGTTCATT  CAAATTTCTG  CCCTATCAAC  TTTCGATGGT  AGGATAGGGC
301  CTACCATGGT  TTCAACGGGT  AACGGGGAAT  TAGGGTTCTA  TTCCGGAGAG
351  GGAGCCTGAG  AAACGGCTAC  CACATCCAAG  GAAGGCAGCA  GGCGCGCAAA
401  TTACCCAATC  CCGACTCGGG  GAGGTAGTGA  CAATAAATAC  TGGACAGGGC
451  CCTTTCGGGT  ATTGAATTGG  AATGAGTACG  ATTTAAAAAC  TCTAACGAGG
501  AACAATTGGA  GGGCAAGTCT  GGTGCCAGCA  GCCGCGGTAA  TTCCAGCTCC
551  AATAGCGTAT  ATAGTTGTTG  CAGTTAAAAA  GCTCGTGGAA  CCTTGGGCCT
601  GGCCCGGCGG  GTCCGCCTCA  CCGCGAGAAC  TCTTTCGGCC  GGGCCTTTCC
651  TTCTGGCAAA  CCCCATGCCC  TTTACTGGGT  GTGGCGGGGA  ACCAGGRGCT
701  TTTACTTTGA  AAAAARTAGA  GTGTTCAAAG  CAGGCATATG  CTCGAATACA
751  TTAGCATGGA  ATAATAGAAT  AGGACGTGTG  GTTCTATTTT  GTTGGTTTCT
801  AGGACCACCG  TAATGATTAA  TAGGGATAGT  CGGGGGCATC  CGTATTCAAC
851  TGTCAGAGGT  GAAATTCTTG  GATTTGTTGA  AGACGAACTA  CTGCGAAAGC
901  ATTTGCCAAG  GATGTTTTCA  TTAATCAGGA  ACGAAAGTTG  AGGGATCGAA
951  GACGATCAGA  TACCGTCGTA  GTCTCAACCA  TAAACTATGC  CGACTAGGGA
1001 TCGGGCGGTG  CTAACAATTT  GGCCCGCTCG  GCACCTTACG  AGAAATCAAA
1051 GTCTTTGGGT  TTCTGGGGGG  AGTATGGTCG  CAAGGCTGAA  ACTTAAAGGA
1101 ATTGACGGAA  GGGCACCACC  AGGAGTGGAG  CCTGCGGCTT  AATTTGACTC
1151 AACACAAAGA  AACTCACCAG  GTCCAGACAC  ATTGAGATTG  ACAAGT
```

รูปผนวกที่ 33 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rDNA (Partial sequence, PCR primers NS1/SR2) ของเชื้อรา Endophyte, *Phillipsia domingensis* (32n) 95% Identity ที่แยกได้จาก**ราก**ว่านขันหมาก**ต้นใหญ่** 2

1 ACCCCCCCCA GTTCCCAAAG ACTTTCTTTC TCGTAAGGGC CGAACGAGTC
51 AAAAAATAAC ATCGTCCGAT CCCTAGTCGG CATAGTTTAT GGTTAAGACT
101 ACGACGGTAT CTGATCGTCT TCGATCCCCT AACTTTCGTT CCTGATTAAT
151 GAAAACATCC TTGGCAAATG CTTTCGCAGT AGTTAGTCTT CAATAAATCC
201 AAGAATTTCA CCTCTGACAA TTGAATACTG ATGCCCCCGA CTGTCCCTAT
251 TAATCATTAC GGCGGTCCTA GAAACCAACA AAATAGAACC ACACGTCCTA
301 TTCTATTATT CCATGCTGAT GTATTCGAGC ATAGGCCTGC TTTGAACACT
351 CTAATTTTTT CACAGTAAAA GTCCTGGTTC CCCACTACAC CCAGTGAAGG
401 GCATAGGGCT CCCCAGAGGG AAAGGCCCGG CCGAACCAGT GCACGCGGTG
451 AGGCGGACCG GCCAGCCAGG CCCAAGGTTC AACTACGAGC TTTTTAACTG
501 CAACAACTTT AATATACGCT ATTGGAGCTG GAATTACCGC GGCTGCTGGC
551 ACCAGACTTG CCCTCCAATT GTTCCTCGTT AAGGGATTTT AAATTGTACT
601 CATTCCAATT ACAAGACCCA AAAGAGCCCT GTATCAGTAT TTATTGTCAC
651 TACCTCCCCG TGTCGGGATT GGGTAATTTG CGCGCCTGCT GCCTTCCTTG
701 GATGTAGTAG CCGTTTCTCA GGCTCCTTCT CCGGGGTCGA GCCCTAACCC
751 TCCGTTACCC GTTGTAACCA TGGCAGGCCA AGACCCTGCC ATCGAAAGTT
801 GATAGGGCAG AAATTTGAAT GAACCATCGC CGGCGCAAGG CCATGCGATT
851 CGAGAAGTTA TTATGAATCA CCAGTAAGCC CCGAGGGGCA TTGGTTTTTA
901 ATCTAATAAA TACATCCCCC GTGAGTCGGG ATTTTTAGCA TGTATTAGCT
951 CTAGAATTAC CACGGTTATC CAAGTAGTAA GGTACAATCA AATAAACAA
1001 TAACTTGATT TAATGAGCCA TTCGCAGGTT CGCCGTATAA TGAATATACT
1051 GGGACATTCA GGCTTAATCT TTGAGACAAC TTTT

รูปผนวกที่ 34 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rDNA (Partial sequence, PCR primers NS1/SR2) ของเชื้อรา Endophyte, *Glomerella cingulata* (NS1/SR2) 98% Identity ที่แยกได้จากส่วน**ใบเครือสี่เหลี่ยม** จาก จ. สกลนคร (3บ ส)

1 GGCAAGCAC TCCGATTTCT CGTAAGGTGC CGAACGAGTC AAATAATAAC
51 ATCGTYCGAT CCCCTAGTCG GGCATAGTTT ATGGTTAAGC TACGACGGTA
101 TCTGATCGTC TTCGATCCCC TAACTTTGTT CCTGATAAAT GAAAACATCC
151 TTGGCAAATG CTTTCGCAGT AGTTAGTCTT CAATAAATCC AAGAATTTCA
201 CCTCTGACAA TTGAATACTG ATGCCCCCGA CTGTCCCTAT TAATCATTAC
251 GGCGGTCCTA GAAACCAACA AAATAGAACC ACACGTCCTA TTCTATTATT
301 CCATGCTAAT GTATTCGAGC ATAGGCCTGC CTGGAGCACT CTAATTTTTT
351 CAAAGTAAAA GTCCTGTTTT CCCACACACC CAGTGAAGGG CATGAGGTTC
401 CACAGGGGGA AAGGCCCGGC CGGACCAGTG CACGCGGTGA GGCGGACCGG
451 CCAGCCAGGC CCAAGGTTCT ACTACGAGCT TTTTAACCAC AACAACTTTA
501 ATATACGCTA TTGGAGCTGA ATTACCGCG GCTGCTGGCA CCAGACTTGC
551 CCTCCAATTG TTCCTCGTTA AGGGATTTAA ATTGTACTCA TTCCAATTCA
601 AGACCCAAAA GAGCCCTGTA TCAGTATTTA TCGTCACTAC CTCCCCGTGT
651 CGGGATTGGG TAATTTGCGC GCCTGCTGCC TTCCTTGGAT GTAGTAGCCG
701 TTTCTCAGGC TCCTTCTCCG GGGTCGAGCC CTAACCCTCC GTTACCCGTT
751 GTAACCATGC TAGAACACTA CTCTAGCATC GAAAGTTGAT AGGGAAGAAA
801 TTTGAATGAA CCATCGCCGG CGCAAGGCCA TGCGATTCGA GAAGTTATTA
851 TGAATCACCA GTGAGCCCCG AAGGGCATTG GTTTTTAATC TAATAAATAC
901 ATCCCTTCGT AAGTCGGGAT TTTTAGCATG TAAGCTCTAG AATTACCACG
951 GTTATCCAAG TAGTAAGGTA CATCAAATAA ACATAACTTA TATAATGAGC
1001 CATTCGCAGT CGCTGTATTT GATACTAGAC ATCATGGCTT AATCTTTGAG
1051 ACATTTT

รูปผนวกที่ 35 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rDNA (Partial sequence, PCR primers NS1/SR2) ของเชื้อรา Endophyte, *Rosellinia* sp. (NS1/SR2) 98% Identity ที่แยกได้จาก**ใบเครือสี่เหลี่ยม** จาก จ. สกลนคร (9บ ส)

ประวัติหัวหน้าโครงการวิจัย

ชื่อ-สกุล ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สุรีลักษณ์ รอดทอง

หน่วยงานที่สังกัดและที่อยู่

สาขาวิชาจุลชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

111 ถนนมหาวิทยาลัย ตำบลสุรนารี อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา 30000

โทรศัพท์ 044-22 4297, 044-22 4633 โทรสาร 044-22 4185 e-mail: sureelak@sut.ac.th

ประวัติการศึกษาและฝึกอบรม

วุฒิการศึกษา	สถาบัน	ประเทศ
วท.บ. (ชีววิทยา เลือกจุลชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	ประเทศไทย
วท.ม. (จุลชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	ประเทศไทย
PGDip.Sci. (Biotechnology) with Credit	University of Otago	นิวซีแลนด์
Ph.D. (Microbiology)	University of Otago	นิวซีแลนด์
Post-Doc (Molecular Biology)	University of Guelph	แคนาดา
Certificate (International Training Programme in Biotechnology, ITP 12)	Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH (GBF)	เยอรมนี
Certificate (Proficiency in English)	Victoria University of Wellington	นิวซีแลนด์
Certificate (Laboratory Safety Course)	The Laboratory Safety Institute (LSI)	สหรัฐอเมริกา
Certificate (Quality Management of Culture Collection for Curators)	National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC)	ประเทศไทย
Certificate (Culture Collection Techniques)	Bangkok MIRCEN	ประเทศไทย

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญ

พันธุศาสตร์และสรีรวิทยาของจุลินทรีย์ การหมักของจุลินทรีย์ (แบคทีเรียและเชื้อรา) ความหลากหลายของชนิดและการใช้ประโยชน์ของแบคทีเรียกรดแล็กติกและเชื้อราเพื่อผลิตผลิตภัณฑ์อาหาร พลาสติกชีวภาพ พอลิเมอร์ชีวภาพ และพลังงาน

ผลงานทางวิชาการ

1) ตำรา หนังสือ/เอกสารประกอบการสอน จำนวน 14 เรื่อง (เล่ม)
2) ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ
   วารสารระดับชาติ จำนวน 20 เรื่อง และวารสารระดับนานาชาติ จำนวน 44 เรื่อง
3) ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ใน Proceedings จำนวน 27 เรื่อง
4) ผลงานที่เผยแพร่ในการประชุมวิชาการระดับชาติ จำนวน 89 เรื่อง
5) ผลงานที่เผยแพร่ในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ จำนวน 96 เรื่อง
6) สิทธิบัตรที่ยื่นคำขอจดทะเบียน จำนวน 6 คำขอ

เอกสารแนบ

ผลงานวิจัยของโครงการที่ได้เผยแพร่

ผลงานวิจัยของโครงการที่ได้เผยแพร่ มีดังนี้

สุรีลักษณ์ รอดทอง เป็นผู้ประสานงาน วิทยากร และผู้ดำเนินรายการ ในการบรรยายพิเศษ และปฏิบัติการพิเศษ วันที่ 12-18 ตุลาคม พ.ศ. 2551 โดยมีวิทยากรร่วมรับเชิญ Prof. Roy Watling Royal Botanic Garden Edinburgh, Edinburgh Scotland

หัวข้อกิจกรรมหลัก ดังนี้

(1) Demonstration of fungal identification techniques

(2) Fungal field survey at Phu Luang, Sa-kaae-rach, and Wang-nham-keaw

(3) Identification of fungal specimens

(4) Special seminar on “Heron Wood, a mystical locality: 15 years of biodiversity studies”

สุรีลักษณ์ รอดทอง เป็นผู้ประสานงาน วิทยากร และผู้ดำเนินรายการ ในการบรรยายพิเศษของการจัดประชุมเชิงปฏิบัติการเรื่อง “Techniques in Identification of Saprotrophic and Mutualistic Larger Fungi” วันที่ 31 สิงหาคม ถึง 2 กันยายน พ.ศ. 2554 ณ อาคารวิชาการ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยมีวิทยากรรับเชิญที่ให้การบรรยาย ดังนี้

(1) The Need for Fungal Conservation โดย Prof. Roy Watling

(2) Some Interesting Wild Mushrooms โดย Assoc. Prof. Niwat Sanoamuang

(3) Dominant Plants in Deciduous Dipterocarp and Dry Evergreen Forests in Thailand โดย Prof. Pranom Chantaranothai

สุรีลักษณ์ รอดทอง. 2554. งานวิจัยจากการประยุกต์ใช้ทรัพยากรจุลินทรีย์ในประเทศไทย. การประชุมวิชาการผลงานวิจัยของนิสิตและบุคลากรภาควิชาชีววิทยา ครั้งที่ 4, 26 มกราคม พ.ศ. 2554, ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ตำบลขามเรียง อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม. วิทยากรรับเชิญ.

สุรีลักษณ์ รอดทอง. 2554. พิพิธภัณฑ์เห็ดราและพืชผลหายากของประเทศไทย. ใน คู่มืออุทยานการเรียนรู้ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (SUT Learning Park) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา. หน้า 33-35.

สุรีลักษณ์ รอดทอง. 2555. การจำแนกชนิดจุลินทรีย์โดยใช้เทคนิคชีวโมเลกุล. เอกสารประกอบการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการเรื่อง "การจำแนกชนิดและตรวจวิเคราะห์จุลินทรีย์ด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล”, 4 กันยายน พ.ศ. 2555, สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร อำเภอธัญบุรี จังหวัดปทุมธานี. 37 หน้า. วิทยากรรับเชิญ.

Rodtong, S., Thienhirun, S., Yahaufai, J., and Siripong, P. 2005. Antiproliferative agents from xylariaceous fungi. *Abstracts of the 8th National Cancer Conference (NCC 8), 7-9 September 2005, Bangkok, Thailand*: 130.

Rodtong, S., Thienhirun, S., Yahaufai, J. and Siripong, P. 2007. Antiproliferative activity of extracts from Wan-khan-mark, *Aglaonema tenuipes* Engl. *Abstracts of the 9th National Cancer Conference (NCC 9), 12-14 December 2007, Bangkok, Thailand*: 171.

Rodtong, S. Thienhirun, S., Yahaufai, J. and Siripong, P. 2007. Endophytic fungi isolated from Wan-khan-mark, *Aglaonema tenuipes* Engl., and cytotoxic activities of the fungal metabolites against cancer cell lines. *Abstracts of the 9th National Cancer Conference (NCC 9), 12-14 December 2007, Bangkok, Thailand*: 172-173.

Rodtong, S. Thienhirun, S., and Siripong, P. 2010. Fungi inhabiting Wan-khan-mark, *Aglaonema tenuipes* Engl., and antiproliferative activity of the fungal metabolites and extracts from the plant. *Abstracts of the 5th Thai Mycological Conference, 7 December 2010, Kasetsart University, Bangkok, Thailand*: 27.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี