

## บทคัดย่อ

เชื้อราเอนโดไฟท์ที่อยู่ในพืชเป็นกลุ่มเชื้อราที่มีชีวิตอยู่ในพืชปกติแบบได้ประโยชน์ซึ่งกันและกัน โดยที่เชื้อราบางชนิดสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นและสารต้านเซลล์มะเร็งทำนองเดียวกับพืชหลายชนิด การศึกษานี้ได้คัดแยกเชื้อราเอนโดไฟท์จากใบ ผล ลำต้น และรากของพืชป่า 3 ชนิดที่ไม่เป็นโรคหรือแมลงทำลายและพบเจริญในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย คือ ว่านขันหมาก (*Aglaonema simplex* (Blume) Blume) ชื่อพ้อง *Aglaonema tenuipes* Engl.) ที่มีการบริโภคผลสุกกันอย่างกว้างขวางด้วยความเชื่อว่ารักษาโรคได้ครอบจักรวาล เครื่องสี่เหลี่ยมเป็นไม้เถาที่ยังไม่สามารถระบุชนิดด้วยข้อจำกัดของลักษณะทางสัณฐานที่พบเพียงต้นและใบในช่วงเวลาที่ศึกษา และชันทองพญาบาท (*Suregada multiflora* (A.Juss.) Baill.) ได้จำนวนเชื้อรา 103, 22 และ 58 ไอโซเลท ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ชนิดของเชื้อราโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อและลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีนของไรโบโซม พบว่าเอนโดไฟท์จากว่านขันหมากเป็นราในสกุล *Colletotrichum*, *Guignardia*, *Phomopsis* และกลุ่ม *Ascomycetes* ในสกุล *Daldinia* และ *Xylaria* เอนโดไฟท์จากเครื่องสี่เหลี่ยมเป็นราในสกุล *Glomerella* เป็นหลัก และพบ *Ascomycetes* ในสกุล *Rosellinia* และ *Xylaria* ส่วนราเอนโดไฟท์ที่แยกจากใบและเปลือกของต้นชันทองพญาบาทยังมีได้ระบุชนิดด้วยเวลาและงบประมาณที่จำกัด จากนั้นได้ทดสอบความเป็นพิษของสารจากการเลี้ยงราในอาหารเหลวและสารสกัดจากพืชต่อเซลล์มะเร็งของคนทีเพาะเลี้ยง โดยใช้เซลล์มะเร็งเยื่อหุ้มช่องปาก (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 มีฤทธิ์อ่อนต่อ KB ( $IC_{50}$  ในช่วง 45-80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เมื่อทดสอบความเป็นพิษของสารต่อเซลล์มะเร็งชนิดอื่น พบว่าสารในอาหารที่ผ่านการเลี้ยง *Colletotrichum* sp. แยกได้จากใบของว่านขันหมาก มีฤทธิ์อ่อนต่อ HeLa, Hep-G2 และ Vero ( $IC_{50}$  เท่ากับ 50, 51 และ 45 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) แต่มีผลดีกับ MCF-7 ( $IC_{50}$  เท่ากับ 20.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) สารสกัดหยาบจากอาหารเลี้ยงเชื้อราจากเครื่องสี่เหลี่ยม มีเพียงรา *Glomerella* sp. ที่แยกจากใบ มีผลต่อ KB ที่สังเกตได้ ( $IC_{50}$  เท่ากับ 75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) สารสกัดหยาบจากอาหารเลี้ยงเชื้อและเส้นใยของราที่แยกจากพืชชันทองพญาบาททั้ง 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) และเฉพาะสารสกัดจากรากและผลด้วยเฮกเซน เป็นพืชต่อเซลล์ปกติที่ค่า  $IC_{50}$  3.11 และ 7.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สารสกัดหยาบจากต้น ก้านใบ และใบของเครือสี่เหลี่ยม ด้วยคลอโรฟอร์มมีฤทธิ์ต้าน KB ที่ค่า  $IC_{50}$  65 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสารสกัดหยาบจากใบและเปลือกของลำต้นชั้นทองพยับบาทไม่มีความเป็นพิษต่อ KB ( $IC_{50} > 100$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) สารสกัดที่ได้จากเชื้อราและพืชจากผลการศึกษา แสดงความเป็นพิษต่อ เซลล์มะเร็งและที่เป็นพิษและไม่เป็นพิษกับเซลล์ปกติ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารสกัดหยาบจากวุ้นหนาม และเชื้อราจากพืชชนิดนี้ออกฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงได้ผลดีในระดับที่น่าสนใจ และแสดงฤทธิ์ เฉพาะเจาะจงในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งแต่ละอวัยวะที่คัดเลือกมาทดสอบ 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  $\mu\text{g/ml}$ , respectively), 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  $\mu\text{g/ml}$ ). 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  $\mu\text{g/ml}$ , respectively), but showed interesting cytotoxic activity against human breast adenocarcinoma cell line, MCF-7 ( $IC_{50}$  value of 20.5  $\mu\text{g/ml}$ ). The culture medium of *Glomerella* sp. isolated from Kreua-see-liam leaf contained compounds exhibited weak activity on KB ( $IC_{50}$  value of 75  $\mu\text{g/ml}$ ). None of extracts from fungal cultures isolated from Khan-thong-phayabat showed inhibiting effect on KB ( $IC_{50} > 100$   $\mu\text{g/ml}$ ). 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  $\mu\text{g/ml}$ , respectively). And only hexane extracts from roots and fruits performed high toxicity to Vero at  $IC_{50}$  values of 3.11 and 7.25  $\mu\text{g/ml}$ , respectively. Crude chloroform extracts from stems, petioles, and leaves of Kreua-see-liam showed low cytotoxic effects on KB at  $IC_{50}$  of 65  $\mu\text{g/ml}$ . No cytotoxic activity was observed from all crude extracts from leaves and barks of Khan-thong-phayabat on KB ( $IC_{50} > 100$   $\mu\text{g/ml}$ ). 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