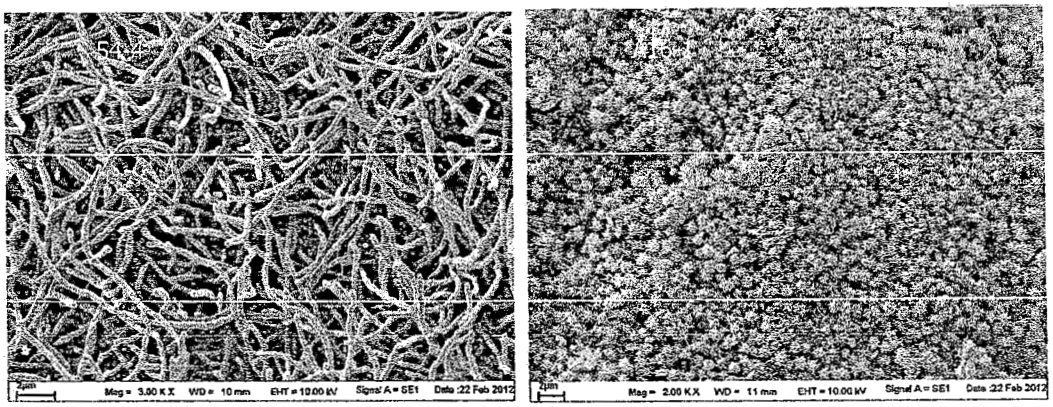
สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างสารแอนติไบโอติกจากราที่เป็นเอ็นโดไฟท์ และ แอคติโนมัยซีทบริเวณรากพืชป่าชายเลน

Optimization of Antimicrobial Compounds Production from Endophytic Fungi and Actinomycetes surrounding mangrove plant roots

รัตนาภรณ์ ศรีวิบูลย์

อภิรดี ปีลันธนภาคย์



โครงการวิจัยนี้ได้รับงบประมาณสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน

ประจำปีงบประมาณ 2555

#ฉ๙๐๑๖๓๔๑
29 พ.ค. 2557
337541

เริ่มบริการ
29 ก.ย. 2557

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง "การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างสารแอนติไบโอติกจากราที่เป็นเอ็นโดไฟท์และ แอคติโนมัยซีทบริเวณรากพืชป่าชายเลน" นี้ ได้รับการสนับสนุนงบประมาณแผ่นดินประจำปีงบประมาณ_2555 เป็นระยะเวลา 1 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2554 – 30 กันยายน 2555 จึงใคร่ขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้

ขอขอบคุณ นางสาวกัญญาณัฐ เกิดทรง นางสาวนุจรินทร์ นารินคำ นิสิตปริญญาตรี จากภาควิชาไบโอเทคโนโลยี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ซึ่งได้มาทำปัญหาพิเศษ และช่วยงานวิจัย รวมทั้งนางสาวพรวิไล กอสัมพันธ์ นิสิตฝึกงานจากมหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ได้มาฝึกงานวิจัย ณ สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล ระหว่างภาคเรียนที่ 2 ปีการศึกษา 2555

ขอขอบคุณสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา สำหรับห้องปฏิบัติการและเครื่องมือวิจัยต่าง ๆ ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

บทคัดย่อ

จากการคัดแยกหาราเอ็นโดไฟท์จากพืชป่าชายเลน (เพิ่มเติม) จำนวน 9 ชนิดคือ ต้นสักขี (*Dalbergia candenatensis* (Dennst) Prain), ฝาดดอกขาว (*Lumnitzera nacemosa*), ต้นโปรงขาว (*Ceriops Decanolra*), ต้นปอทะเล (*Hibiscus tilliaceus*), โกงกางใบใหญ่ (*Rhizophora macronata*), โกงกางใบเล็ก (*Rhizophora apiculata* BL),ต้นตะบูนดำ (*Xylocarpus granatum*), ต้นโพทะเล (*Thespesia populneoides*) (Roxb) Kostel และต้นพืชไม่ทราบชื่ออีก 1 ชนิด โดยแยกเชื้อจากส่วนของใบ พบเชื้อราเอ็นโดไฟท์ทั้งหมด 59 ไอโซเลท และในจำนวนนี้พบเชื้อที่สร้างสารออกฤทธิ์ได้ 20 ไอโซเลท โดยมี 16 ไอโซเลทสามารถยับยั้ง เชื้อ Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), 6 ไอโซเลท สามารถยับยั้ง เชื้อ *Candida albicans*, และ 5 ไอโซเลท สามารถยับยั้งได้ทั้งเชื้อ MRSA และ *Candida albicans*, เมื่อเลือกเชื้อราเอ็นโดไฟท์ที่สร้างสารออกฤทธิ์ได้ดี มาศึกษาคุณสมบัติในการสร้างสารออกฤทธิ์ในอาหารชนิดต่าง ๆ คือ อาหาร YM (Yeast extract- Malt extract), ISP2 (International Streptomyces Project2) และในอาหาร PDB (Potato dextrose broth) พบว่า ในอาหาร PDB เชื้อราส่วนมากสร้างสารออกฤทธิ์ได้ดี และเมื่อนำเชื้อราเหล่านี้มาจำแนกชนิดด้วยวิธีการเปรียบเทียบลำดับเบสใน 26S rRNA ยีน พบว่า ไอโซเลต DC4-1 มีความใกล้เคียงกับ *Cochliobolus hawaiiensis* มากที่สุด (98% similarity), RA 2-1 มีความใกล้เคียงกับ *Sordariomycetes* sp. Genotype 549 isolate NC 0992, RM9-11(95% similarity) มีความใกล้เคียงกับ *Penicillium verruculosum* strain KUC 1794(97% similarity), UN6-12 มีความใกล้เคียงกับ *Eurotiomycetes* sp. Genotype108 Isolate AK1211 (99% similarity), UN6-13 และ XG2-6 มีความใกล้เคียงกับ *Cochliobolus sativus* NBRC 100193 และ *Bipolaris zeicola* NRRL 47506 ด้วยเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงที่ 95% และ 94 % ตามลำดับ อย่างไรก็ดี เมื่อได้นำลำดับเบสของแต่ละไอโซเลตนี้ไปสร้างแผนภูมิต้นไม้ พบว่า รา UN6-13 และ XG2-6 เป็นชนิดเดียวกัน ซึ่งอาจไม่ใช่ทั้ง *Bipolaris zeicola* NRRL 47506 และ *Cochliobolus sativus* NBRC 100193 เนื่องจาก % similarity น้อย ส่วนรา DC4-1 จะใกล้เคียงกับ *Cochliobolus australiensis* มากกว่า *C. hawaiiensis* หรือ *C. sativus* อย่างไรก็ดี มี % similarity เพียง 98% ส่วนรา RA2-1 ก็เช่นเดียวกัน ไม่น่าจะใช่ทั้ง *Sordariomycetes* sp. และ *Xylariaceae* sp.

ส่วนของแอคติโนมัยซีท เมื่อศึกษา ลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางประการของ CH54-4 ก็ไม่ได้มีลักษณะที่เหมือนกันกับ *Streptomyces thermocarboxydus* เสียทีเดียว ซึ่งสอดคล้องกันเมื่อพิจารณาจากแผนภูมิต้นไม้ ซึ่งเป็นไปได้มากที่จะเป็นชนิดใหม่ *Streptomyce* C17-1 เมื่อพิจารณาที่แผนภูมิต้นไม้น่ามีความเป็นไปได้มากที่จะเป็น *S. diastaticus* ส่วน *Streptomyces* A1-3 และ A3-3 น่าจะใช่ *Streptomyces indiaensis* เนื่องจากใกล้เคียงกับ strain NBRC13964 มากถึง 99.79% similarity และ 99.85% similarity ตามลำดับ แต่เมื่อพิจารณาผลการศึกษาลำดับวิวัฒนาการจากแผนภูมิต้นไม้ พบว่ามีความสัมพันธ์ที่แตกต่างออกไปจากแบคทีเรียที่ใกล้เคียง ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าอาจเป็นแบคทีเรียชนิดใหม่

Abstract

The additional isolation of endophytic fungi was performed from 9 species of the mangrove plants: *Dalbergia candenatensis* (Dennst) Prain), *Lumnitzera nacemosa*, *Ceriops Decanolra*, *Hibiscus tilliaceus*, *Rhizophora macronata*, *Rhizophora apiculata* BL., *Xylocarpus granatum* , *Thespesia populneoides* (Roxb) Kostel and an unclassified specied. Out of 59 isolates of endophytic fungi recovered from the leaves, 20 isolates had bioactive activity: 16 isolates had antibiosis activity to MRSA, 6 isolates to *Candida albicans* and 5 isolates to both MRSA and *C. albicans*. Some of the well antimicrobial activity producing isolates were selected to culture in different types of media: YM (Yeast extract-Malt extract), ISP2 (International *Streptomyces* Project 2) and PDB (Potato dextrose broth). It was found that most of the endophytic fungi produced well the bioactive compounds in PDB. The base sequence analysis of 26S rRNA genes of these isolates revealed that endophytic fungi DC4-1 was closest to *Cochliobolus hawaiiensis* (98% similarity), RA2-1 was closest to *Sordariomycetes* sp. Genotype 549 isolate NC 0992 (95% similarity) RM9-11 was closest to *Penicillium verruculosum* strain KUC 1794(97% similarity), UN6-12 was closest to *Eurotiomycetes* sp. Genotype108 Isolate AK1211 (99% similarity), UN6-13 and XG2-6 were closest to *Cochliobolus sativus* NBRC 100193 and *Bipolaris zeicola* NRRL 47506 at 95% and 94 % similarity, respectively. However, when the phylogenetic tree was reconstructed, the endophytic UN6-13 and XG2-6 showed the same species in which neither the same to *Bipolaris zeicola* NRRL 47506 nor *Cochliobolus sativus* NBRC 100193 as percent similarity was rather low. The endophytic funguas DC4-1 was closest to *Cochliobolus australiensis* than to *Cochliobolus hawaiiensis* or *C. sativus, however the percent similarity was only 98%*. The same to fungus RA2-1, which was not both *Sordariomycetes* sp. Genotype 549 isolate NC 0992 and *Xylariaceae* sp.

In the actinomycetes part, when some of morphological characteristics were studied, strain CH54-4 was not exactly the same identity to *Streptomyces thermocarboxydus*, which was most matched to. Result of the phylogenetic tree reconstruction showed a high tendency to be a new species. When considering the phylogenetic tree, *Streptomyces* C17-1, was closest to *S. diastaticus*. *Streptomyces* A1-3 and A 3-3 might be *S. indiaensis* as very closest to strain NBRC 13964 (99.79% and 99.85% similarity, respectively). But when studied the result of the tree, it was found much different of relateness from the closest bacteria, in which the new species was most possibility as well.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ทบทวนเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการวิจัย	18
บทที่ 4 ผลการวิจัย	24
บทที่ 5 อภิปรายผลและสรุป	37
เอกสารอ้างอิง	39
ภาคผนวก	44

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่

1 การแบ่งกลุ่มราเอ็นโดไฟท์ ตามคุณสมบัติของรา 3

2 สารเมตาโบไลท์ใหม่ ๆที่สร้างจาก marine actinomycetes ระหว่างปี 2003-2005 (Lam, 2006) 7

3 ตัวอย่างของสารปฏิชีวนะที่เป็นยารักษาโรคและสร้างขึ้นโดยแอคติโนมัยซีท (Borgos, 2006) 8

4 เชื้อราเอ็นโดไฟท์ที่แยกได้จากป่าชายเลน ในจังหวัดชลบุรี และฤทธิ์ชีวภาพยับยั้งจุลินทรีย์ที่ตรวจพบ 24

5 ผลการสกัดสารออกฤทธิ์จากส่วนของเซลล์ และอาหารเลี้ยงเชื้อ ของไอโซเลต DC 4-5, DC4-1, RM 9-11, UN 6-12, UN6-13, RA 2-1 และ XG 2-6 ได้ปริมาณสารแตกต่างกัน 27

6 ผลของการจำแนกชนิดราเอ็นโดไฟท์ ที่สร้างสารออกฤทธิ์ชีวภาพที่ดี ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล 28

7 คุณสมบัติทางเคมีของผนังเซลล์ ชนิดของน้ำตาลใน whole-cell hydrolysates และลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางประการของแอคติโนมัยซีทที่สร้างสารออกฤทธิ์ที่ดี 30

8 การศึกษาการเจริญบนอาหารชนิดต่างๆ ของแอคติโนมัยซีทที่สร้างสารออกฤทธิ์ 32

9 ผลการจำแนกชนิดของ แอคติโนมัยซีท A16-1 เมื่อได้เปรียบเทียบกับลำดับเบสที่มีอยู่ใน GenBank แล้วพบว่ามีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces indiaensis* 99.101 % 33

10 จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของ 16S rDNA ของแอคติโนมัยซีท CH 54-5 ไม่สามารถจำแนกถึงสปีชีส์ได้ แต่มีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces indiaensis* ด้วยความคล้ายคลึง (%similarity)ที่ 99.241% 33

11 จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของ 16S rDNA ของแอคติโนมัยซีท C 17-5 ไม่สามารถจำแนกถึงสปีชีส์ได้ แต่มีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces avermitilis* ด้วยความคล้ายคลึง (%similarity)ที่ 99.0% 34

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

1 การวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (principal component analysis) ของ *Serratia* 720 สายพันธุ์ คือ ชนิด และการทดสอบ ใช้ Jaccard-Sneath coefficient 14

2 ปรากฏการ chaining ระยะห่างระหว่าง A และ B ถูกลดลงเหลือเพียงระยะระหว่าง สิ่งมีชีวิต 15

3 Cluster diagram ของ *Serratia rubidaea* (1) B2 biotype ที่ไม่มี pigment; (2) B1 biotype ที่สร้าง pigment; (3) B3 biotype ที่สร้าง pigment 15

4 การทำ Hierachic cluster ของ *Serratia* จำนวน 720 strains โดยใช้ Jaccard-Sneath coefficient, และ จำแนกกลุ่ม cluster โดยวิธี UPGMA 16

5 Similarity matrix ของ *Bacillus* 66 strains จากโรงพยาบาล 17

6 เทคนิคการทำ slide culture เพื่อสังเกตการณ์เจริญของเชื้อที่ขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อและที่กระจกปิดสไลด์ 20

7 ไดอะแกรม แสดงตำแหน่งต่าง ๆ ของ rDNA locus ในเชื้อรา 23

8 เชื้อราเอ็นโดไฟท์ที่แยกจากใบพืชป่าชายเลน a, จากต้นสักขี b.,จากพืชป่าชายเลนไม่ทราบชื่อ c., จากต้นตะบูนดำ 26

9 สารสกัดหยาบ จากเชื้อราเอ็นโดไฟท์ บนแผ่นโครมาโทแกรม (silica gel 60) 27

10 แผนภูมิต้นไม้ ของราเอ็นโดไฟท์ ที่ให้สารออกฤทธิ์ชีวภาพ DC4-1, RA2-1, RM9-11, UN6-12, UN6-13 และ X G2-6 29

11 แอคติโนมัยซีท A3-3, A 11-8 และ A16-1 บนจานอาหาร ISP2 อายุ 5 วัน 30

12 ภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน ของ A1-3, A19-5, A3-3, CH54-4, A11-8, A19-8 ที่เลี้ยงด้วยอาหาร ISP2 ที่ 30 ° C เป็นเวลา 1 สัปดาห์ 31

13 แผนภูมิต้นไม้ ของแอคติโนมัยซีทที่ให้สารออกฤทธิ์ชีวภาพ A17-1 และ A3-3 35

14 แผนภูมิต้นไม้ ของแอคติโนมัยซีทที่ให้สารออกฤทธิ์ชีวภาพ CH54-4 36

บทที่ 1 บทนำ

ป่าชายเลนเป็นแหล่งของทรัพยากรจุลินทรีย์ที่สำคัญ ซึ่งนอกจากจะทำหน้าที่ผู้ย่อยสลายอินทรีย์สารแล้วยังมีจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆทั้งรา แบคทีเรีย และแอคติโนมัยซีท โดยเฉพาะอย่างยิ่งราที่เป็นเอ็นโดไฟท์และแอคติโนมัยซีท เพราะเป็นจุลินทรีย์ที่หลายรายงานพบว่าเป็นแหล่งของการสร้างสารแอนติไบโอติกหลายชนิดและชนิดที่แยกได้จากบริเวณรากพืชชายเลนยังไม่มีการศึกษามากนักในประเทศไทย การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างสารแอนติไบโอติกจากจุลินทรีย์เหล่านี้ ก็เป็นอีกขั้นตอนหนึ่งที่สำคัญของการมีโอกาสค้นพบสารชนิดใหม่ ๆ เนื่องจากถ้าอาหารหรือสภาวะในการเลี้ยงไม่เหมาะสมสารที่สร้างขึ้นอาจมีปริมาณน้อยเกินไปจนไม่สามารถตรวจพบ ทำให้พลาดที่จะได้พบสารชนิดใหม่ ๆที่มีประสิทธิภาพที่ดีในการออกฤทธิ์ยับยั้ง นอกจากนี้พื้นที่ของป่าชายเลนเป็นบริเวณที่มีการเชื่อมต่อกับทะเล ดังนั้นสิ่งแวดล้อมของทั้งราเอ็นโดไฟท์ และแอคติโนมัยซีทที่อาศัยอยู่ ณ บริเวณนี้จึง ต้องเป็นชนิดที่มีการปรับตัวเข้ากับสิ่งแวดล้อมที่ยากลำบากหลายประการ ไม่ว่าจะเป็นความแห้งแล้งและอุณหภูมิสูงเวลาที่น้ำลง และเวลาที่มีความชื้นสูงและอุณหภูมิที่ต่ำลงในช่วงเวลาน้ำขึ้น ซึ่งมีผลต่อการสร้างสารเมตาโบไลท์ต่าง ๆไม่มากก็น้อย และทั้งราเอ็นโดไฟท์ ของพืชป่าชายเลนก็มีความหลากหลายของชนิด โดยเฉพาะที่ได้จากต้นโกงกางใบใหญ่ (*Rhiizophora mucronata*) Ananda and Sridhar(2002) และแอคติโนมัยซีท บริเวณป่าชายเลนก็มีรายงานว่ามักจะเป็นแหล่งที่อยู่ของแอคติโนมัยซีทใหม่ ๆ และมีชนิดที่สามารถสร้างสารไบโอแอคทีฟที่หลากหลายชนิดจำนวนมาก (รัตนาภรณ์, 2541; Hong และคณะ, 2007; Srivibool and Sukchotiratana , 2006) ซึ่งหากได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างสารเหล่านี้ ก็จะทำให้มีโอกาสที่จะได้สารใหม่ ๆมากขึ้นตามไปด้วย

ราเอ็นโดไฟท์เป็นราที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อของพืช และสามารถเจริญได้ดีโดยไม่ทำให้เกิดโรคหรือการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาที่ผิดปกติแก่พืชชนิดนั้นๆ (Petrini, 1991) สามารถพบราเอ็นโดไฟท์ได้ในพืชตระกูลต่างๆเป็นจำนวนมาก และพบว่ารากลุ่มนี้มีความสำคัญต่อพืชที่อาศัยอยู่ทั้งทางตรงและทางอ้อม โดยจะช่วยเพิ่มความสามารถในการต้านทานศัตรูพืชต่างๆ เพิ่มความแข็งแรงและทนทานต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ได้ดีกว่าพืชที่ไม่มีเอ็นโดไฟท์อาศัยอยู่ ทั้งยังมีอิทธิพลต่อความหลากหลายทางชีวภาพหรือพืชกลุ่มนั้นๆด้วย ซึ่งคุณสมบัติเหล่านี้จะเป็นประโยชน์ต่อการเกษตรกรรมและพืชเศรษฐกิจ (Saikkonen, 2007) จึงมีการศึกษาวิจัยราเอ็นโดไฟท์กันอย่างกว้างขวาง มีรายงานว่าราเอ็นโดไฟท์สามารถผลิตเอนไซม์ที่จำเป็น สำหรับอาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อของพืช นอกจากนี้ยังพบว่าราเอ็นโดไฟท์จากพืชต่างๆ สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ชีวภาพต้านจุลินทรีย์หลายชนิด รวมทั้งต้านราที่เป็นสาเหตุโรคพืช (Park *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2009; Chaeprasert *et al.*, 2010)

ส่วนแอคติโนมัยซีทก็เป็นแหล่งของการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลายชนิด จากการสำรวจรวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับสารออกฤทธิ์ และสารแอนติไบโอติก ของ Lazzarini และคณะ (2000) พบว่า ในจำนวนสารแอนติไบโอติกที่มีอยู่ในปัจจุบันประมาณกว่า 8000 ชนิดนั้น พบว่ามากกว่า 60% ถูกสร้างมาจากแอคติโนมัยซีท โดยที่เป็นสารที่ Streptomycetes สร้างขึ้น 45.6 % และอีกประมาณ 16% สร้างได้จากแอคติโนมัยซีทที่หายาก และสารแอนติไบโอติกที่สร้างนั้นส่วนใหญ่สร้างมาจากแอคติโนมัยซีทใน Family *Streptomyceteaceae* รองลงมาได้แก่ *Micromonosporaceae, Pseudonocardiaceae, Nocardiaceae* และ *Streptosporangiaceae* ตามลำดับ และจาก หลาย ๆรายงานได้แสดงให้เห็นว่า แอคติโนมัยซีทมีการแพร่กระจายโดยทั่วไปในตะกอนของทะเลชายฝั่ง รวมไปถึงสิ่งแวดล้อมทางทะเลอื่น ๆ และ

ตะกอนก้นทะเลลึก ๆด้วย (Ghanem et al., 2000; Pathom-aree,et al. 2006; Bull, et al. 2005; Maldonado, et al., 2005; Bredholdt, et al. 2007, Bredholdt, et al. 2008). นับว่าแอคติโนมัยซีทก็เป็นแบคทีเรียอีกกลุ่มหนึ่งที่มีความน่าสนใจ ในการค้นหาสารออกฤทธิ์ชีวภาพ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในป่าชายเลนเขตร้อนของประเทศไทย

ประเทศไทยเป็นประเทศเป็นประเทศเขตร้อน ที่มักประสบปัญหาราก่อโรคในพืชเศรษฐกิจ และราจัดเป็นสาเหตุที่สำคัญที่ทำความเสียหายให้แก่พืชผลมากที่สุด มีรายงานว่ามีรามากกว่า 8,000 ชนิดที่เป็นสาเหตุโรคพืช และมีพืชชั้นสูงรวมถึงพืชผลทางการเกษตรเกิดโรคเนื่องจากราไม่น้อยกว่า 100,000 โรค รากลุ่มอะนามอร์ฟเป็นรากลุ่มหนึ่งที่มีรายงานการเป็นสาเหตุโรคพืชในพืชเศรษฐกิจหลายชนิด ทั้งในประเทศและต่างประเทศทั่วโลก เช่น *Colletotrichum* spp. เป็นสาเหตุของโรคแอนแทรกโนส *Fusarium* spp. สาเหตุโรคเน่าและโรคเหี่ยว *Alternaria* spp. ก่อโรคใบจุดดำในพืชตระกูลกะหล่ำ (Menzies *et al.*, 1990; Zulfiqar *et al.*, 1996; Adaskaveg and Hartin, 1997; Intana *et al.*, 2005; Muto *et al.*, 2006; Srinon *et al.*, 2006) โรคพืชเหล่านี้ทำความเสียหายทั้งปริมาณและคุณภาพของผลผลิตเป็นอย่างมาก ส่งผลให้ผลผลิตที่ได้มีจำนวนน้อยไม่คุ้มกับการลงทุน และต้องมีการใช้สารเคมีเพื่อป้องกันเชื้อราก่อโรคเหล่านี้ ซึ่งสารเคมีที่ใช้อาจส่งผลเป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม ต่อมนุษย์และสัตว์ (นิตยา โนคำ, 2552)

การควบคุมโรคพืชทางชีววิธี เป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ควบคุมโรคพืชได้ และปลอดภัยกว่าการใช้สารเคมี ซึ่งอาจทำได้โดยใช้ราที่ไม่ก่อโรคในการควบคุมราประปักษ์ที่เป็นสาเหตุของโรคพืชโดยตรง หรืออาจใช้สารก่อฤทธิ์ที่สกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อทำลายราที่เป็นสาเหตุโรคพืช (Hostettmann and Marston, 1994; Intana *et al.*, 2005; Xie *et al.*, 2008) การใช้สารสกัดจากราในการยับยั้งราที่เป็นสาเหตุโรคพืช (antifungal activity) มีรายงานไว้น้อยมากเมื่อเทียบกับวิธีแรก แต่ในระยะ 10 ปีที่ผ่านมา มีผู้ให้ความสนใจกัน มากขึ้น เนื่องจากพบว่าราเอ็นโดไฟท์ สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญราสาเหตุโรคพืชได้หลายชนิด (Park *et al.*, 2005)

บทที่ 2 ทบทวนเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ราเอ็นโดไฟท์ การแพร่กระจาย และสารออกฤทธิ์ที่สร้าง

ราเอ็นโดไฟท์เป็นราที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ของพืชเกือบทุกชนิด โดยอาศัยแบบพึ่งพาและไม่ก่อให้เกิดโรคแก่พืชที่อาศัย พืชที่เป็นโฮสต์จะทำหน้าที่เป็นแหล่งอาหารให้กับเชื้อรา ขณะเดียวกันราที่เป็นเอ็นโดไฟท์จะให้ประโยชน์แก่พืชที่อาศัยอยู่ทั้งทางตรงและทางอ้อม โดยจะช่วยเพิ่มความสามารถในการต้านทานศัตรูพืชต่างๆ เพิ่มความแข็งแรงและทนทานต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม

ในระบบนิเวศส่วนที่เป็นพื้นผิวของโลกนั้น จะมีความหลากหลายทางชีวภาพสูงสุดอยู่ในบริเวณป่าฝนของเขตร้อนและเขตอบอุ่นเป็นส่วนใหญ่ และจะพบราเอ็นโดไฟท์จำนวนมากด้วยที่จะพบได้ในระบบนิเวศเหล่านี้ ซึ่งปกคลุมอยู่เพียง 1.44 % ของพื้นผิวโลกนั้น (Strobel,2003) ราเอ็นโดไฟต์ และราทะเล จากไม้ในป่าชายเลน เป็นตัวอย่างของราชั้นสูงกลุ่มใหม่ที่มีการศึกษาในประเทศไทยเมื่อประมาณ 15 ปีที่ผ่านมานี้ เป็นที่ทราบกันว่ากลุ่มเชื้อราเป็นแหล่งผลิตสารออกฤทธิ์ชีวภาพที่มีประโยชน์หลายชนิด (Guo et al., 2008; Tan et al., 2001; Bugai and Ireland. 2002) จากรายงานวิจัยหลายรายงานพบว่าราเอ็นโดไฟท์เป็นแหล่งสำคัญแหล่งหนึ่งที่สร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอันดับสองออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์หลายชนิด และสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ตามลักษณะของคุณสมบัติ ดังแสดงใน

ตารางที่ 1 การแบ่งกลุ่มราเอ็นโดไฟท์ ตามคุณสมบัติของรา

	Clavicipitaceous	Nonclavicipitaceous		
Criteria	Class1	Class2	Class 3	Class4
Host range	แคบ	กว้าง	กว้าง	กว้าง
บริเวณที่สร้างโคโลนี	ลำต้น ลำต้นใต้ดิน	ลำต้น ราก ลำต้นใต้ดิน	ลำต้น	ราก
การสร้างโคโลนีในพืช	บริเวณกว้าง	บริเวณกว้าง	บริเวณจำกัด	บริเวณกว้าง
ความหลากหลายในพืช	ต่ำ	ต่ำ	สูง	ไม่ทราบ
Transmission	แนวตั้ง และแนวนอน	แนวตั้ง และแนวนอน	แนวนอน	แนวนอน
ประโยชน์*	NHA	NHA และ HA	NHA	NHA

- NHA = Nonhabitat-adapted benefit เช่น ทนทานต่อความแห้ง และช่วยให้เจริญได้ดี และเป็นคุณสมบัติโดยทั่วไปของ endophytes
- HA = Habitat adapted ซึ่งเป็นผลมาจากสิ่งที่เกิดจากการเลือกของ habitat-specific เช่น pH อุณหภูมิ และความเค็ม

ตารางที่ 1 เกณฑ์ที่ใช้กำหนดการมีชีวิตอยู่ร่วมกัน เพื่อแบ่งประเภทของรา endophyte ตามลักษณะของคุณสมบัติ (Rodriguez, et al., 2008)

คือราเอ็นโดไฟท์ที่เป็น Clavicipitaceous (C- endophyte) และ ที่ไม่ใช่ Clavicipitaceous (Non-Clavicipiteus-endophyte) ราที่เป็น C- endophyte ค่อนข้างเลี้ยงยากและค่อนข้างจำกัดอยู่ในโฮสต์บางชนิดในบางฤดู ตรงข้ามกับพวกที่เป็น Non-Clavicipiteus-endophyte ซึ่งมีความหลากหลายมากกว่า และพบอยู่ในโฮสท์

ที่เป็นพืชบกจำนวนมากแทบทุกระบบนิเวศ รวมทั้งพืชทางการเกษตร ตั้งแต่ในเขตร้อน (Tropic) จนถึงเขตทุนดรา (Arnold and Lutzoni, 2007)

ราเอ็นโดไฟท์ส่วนใหญ่เป็นพวกอะนามอร์ฟ (Lumyong, et al., 2004) ราทะเลจากพืชและไลเคนส์ส่วนใหญ่เป็นรากลุ่มแอสโคมัยซีส ซึ่งเป็นรากลุ่มใหญ่ของโลก แต่เป็นรากลุ่มที่มีผู้ศึกษาและรายงานไว้น้อยมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในป่าชายเลนประเทศไทย ส่วนใหญ่ยังอยู่ในระยะของการสำรวจและรวบรวมสายพันธุ์ เนื่องจากการแยกรากลุ่มแอสโคมัยซีส จากแหล่งตัวอย่างในธรรมชาติมาเพาะเลี้ยงเป็นขั้นตอนที่ต้องอาศัยทักษะและประสบการณ์ แต่หากได้มาแล้วมีโอกาสสูงที่ราในกลุ่มนี้จะสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้มาก (Isaka et al., 2002; Guan et al., 2005) เนื่องจากป่าชายเลนเป็นระบบนิเวศ ที่มีแหล่งอาหารและสภาวะที่เหมาะสมให้เป็นที่อยู่ของราหลายกลุ่ม ระบบนิเวศมีลักษณะเฉพาะที่ทำให้ราที่อาศัยอยู่ต้องมีการปรับตัวและแข่งขันเพื่อการเจริญ ทำให้ต้องมีกลไกป้องกันตัวเองรวมทั้งมีการผลิตสารต่างๆ ที่มีลักษณะเฉพาะ และเป็นประโยชน์ต่อตัวราเองออกมา (Guan et al., 2005) สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้หลากหลาย

Kumaresan et al. (2001) ศึกษาราเอ็นโดไฟท์ ของพืช 7 ชนิด ในป่าชายเลนเขตน้ำกร่อยของประเทศอินเดียและพบว่า สามารถแยกราไมโตสปอร์ (อะนามอร์ฟ) แอสโคมัยซีส และราที่พบแต่เพียงเส้นใยจากส่วนใบของพืช ราเอ็นโดไฟท์หลายชนิดสามารถพบได้บนโฮสท์มากกว่า 1 ชนิด และในโฮสท์ต่างชนิดชนิดพบ ราเอ็นโดไฟท์เด่น ๆ ต่างชนิดกัน Schmeda-Hirschmann et al. (2004) รายงานการสร้าง secondary metabolite ชนิดใหม่ 2 ชนิด จากราเอ็นโดไฟท์ 2 ชนิด คือ *Penicillium janczewskii* และราที่ไม่สามารถจัดจำแนกได้อีก 1 ชนิด ที่หมักใน potato dextrose broth

Guo et al. (2008) ได้รายงานว่าราเอ็นโดไฟท์พบได้บนพืชทุกชนิด และพบว่าราเหล่านี้เป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ชีวภาพใหม่ๆมากมาย ที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ การเกษตร และ อุตสาหกรรม โดยย้ำถึงการศึกษาบทบาทสารก่อฤทธิ์ชีวภาพจากเอ็นโดไฟท์ รวมถึงลักษณะงานวิจัยในอนาคตและปัญหาที่พบในการสกัดสารออกฤทธิ์ชีวภาพจากเอ็นโดไฟท์ ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างมากต่องานวิจัยในปัจจุบัน

Schmeda-Hirschmann et al. (2005) ได้รายงานการสร้าง secondary metabolite ชนิดใหม่ 2 ชนิด ที่ได้จากราเอ็นโดไฟท์ 2 ชนิด คือ *Penicillium janczewskii* และราที่ไม่สามารถจัดจำแนกได้อีก 1 ชนิด โดยหมักใน potato dextrose broth

Joseph and Priya (2010) ได้ทบทวนวรรณกรรมเกี่ยวกับการสร้างสารต้านราจากเอ็นโดไฟท์ และศักยภาพในการนำมาใช้ในทางการแพทย์และการเกษตร เช่น *Muscodor albus* สร้างสารระเหยหลายชนิดที่สามารถยับยั้งการเจริญได้ทั้งราและแบคทีเรีย นอกจากนี้ยังเน้นให้เห็นถึงความสำคัญของงานวิจัยเกี่ยวกับเอ็นโดไฟท์ในด้านการเกษตร โดยสารสกัดจากเอ็นโดไฟท์หลากหลายชนิดสามารถยับยั้งราที่เป็นสาเหตุโรคพืชได้

Strobel et al.,(2004) ได้รายงานเช่นกันว่าจุลินทรีย์ที่เป็นเอ็นโดไฟท์นั้นสามารถพบได้ในพืชทุกชนิด ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้อาจอาศัยอยู่ตามเนื้อเยื่อต่าง ๆของพืชที่เป็นโฮสท์ และมีลักษณะความสัมพันธ์ในหลาย ๆลักษณะตั้งแต่การพึ่งพาอาศัยกัน Symbiosis) จนกระทั่งถึงความสัมพันธ์ที่ให้โทษ เช่น ก่อให้เกิดโรค (pathogenic) จุลินทรีย์ที่

เป็นเอ็นโดไฟท์ จะให้ความช่วยเหลือแก่พืชที่เป็นโฮสท์ด้วยการสร้างสารที่เป็นประโยชน์ ช่วยปกป้องพืชให้มีชีวิตอยู่รอดได้ด้วยดี และเมื่อมีการสกัดสารเหล่านี้ออกมาศึกษา ก็พบว่าสารที่ราเอ็นโดไฟท์สร้างขึ้นเหล่านี้สามารถนำมาใช้เป็นยารักษาโรคในปัจจุบันได้ รวมทั้งเป็นประโยชน์ทางด้านการเกษตร และอุตสาหกรรม และสารเหล่านี้มีหลายชนิด ตั้งแต่สารแอนติไบโอติก สารยับยั้งเชื้อรา สารกดภูมิคุ้มกัน สารยับยั้งเซลล์มะเร็ง เหล่านี้ เป็นเพียงตัวอย่างของสิ่งที่พบได้จากการแยกเชื้อพวกเอ็นโดไฟท์ สกัดสารที่เชื้อสร้างได้มาศึกษา ทำสารให้บริสุทธิ์ และศึกษาคุณสมบัติของสาร

จากการศึกษาของ ชัยวัฒน์ บุญมากาศ (2550) ได้ทำการศึกษาศักยภาพในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอ็นโดไฟท์ที่อาศัยอยู่ในพืชวงศ์ stemonaceae (หนอนตายหยาก) ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค คือ *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas solanacearum* subvar.1, *Pseudomonas solanacearum* subvar.2 และ *Xanthomonas citrii* พบว่า ราเอ็นโดไฟท์บางไอโซเลตสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้ทั้ง 4 สายพันธุ์

จากรายงานของ Chaeprasert et al., (2010) ซึ่งได้แยกเชื้อราเอ็นโดไฟท์ จากใบพืชป่าชายเลนบริเวณต่าง ๆของประเทศไทย ได้แก่ บริเวณอ่าวคุ้งกระเบน จังหวัดจันทบุรี บริเวณเวนป่าในเขตอุทยานแห่งชาติปรานบุรี จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ และในเขตป่าสงวนในเขตจังหวัดระนอง แถบชายฝั่งอันดามัน จังหวัดระนอง รวมทั้งหมดจากพืชชายเลน 13 ชนิด จาก 7 แฟมิลี พบว่าในแต่ละบริเวณก็จะพบราเอ็นโดๆไฟที่ต่างกันออกไป ในเขตป่าชายเลนจังหวัดจันทบุรีและประจวบคีรีขันธ์ จะพบ รา *Alternaria alternate*, *Cladosporium* sp., *Nigrospora sphaerica* และพบราจำนวนมากในกลุ่ม Cocloycetous เช่น *Phomopsis spp.*, *Pestalotiopsis* spp., *Colletotrichum* spp., และ *Phyllostricta* ซึ่งเป็นชนิดที่พบบ่อยมากจากป่าทั้ง 2 แห่ง ส่วนที่พบจากป่าในจังหวัดระนอง ได้แก่ *Alternaria alternate*, *Cladosporium* , *Colletotrichum*, *Daldinia eschscholzii*, *Phyllostricta*, *Pestalotiopsis* และ *Xylaria* และพบว่า สารสกัดจากรา *Cladosporium* sp. แยกได้จากต้น *Thespesia populneoides* สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ทั้งหมด และรา *Xylaria sp.* ที่แยกได้จากต้น *Acanthus ilicifolius* Linn. สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งแบคีเรียทั้งแกรมบวก และแกรมลบได้ดีมาก นอกจากนั้น จากจำนวนสารสกัด 84 ตัวอย่าง ได้นำมาหาสารออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง (A375- human malignant melanoma; SW620 – human colorectal adenocarcinoa; Kato III –human gastric carcinoma; HepG2 – human liver hepatoblastoa; และ Jurkat – human acute T cell leukemia) ด้วยวิธี MTT assay พบว่าสารสกัดส่วนใหญ่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งบางชนิด

จากการศึกษาของพูนลาภ ป้อมเป็ง และคณะ (2553) ซึ่งได้ตรวจกรองการออกฤทธิ์เบื้องต้นของราเอ็นโดไฟท์ เบื้องต้นด้วยวิธี dual-culture agar diffusion ที่ออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans* พบราเอ็นโดไฟต์ที่แยกจากตัวอย่างพืชสมุนไพร (กรวยป่า เพกา และกอมขม) ที่มีสัณฐานวิทยาทางโคโลนี ลักษณะของสปอร์ แตกต่างกันจำนวน 40 ไอโซเลต ซึ่งเมื่อนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเพาะเชื้อที่แตกต่างกัน 6 ชนิด มีจำนวนถึง 15 ไอโซเลต (37.5 %) ที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ทดสอบบางชนิด ยกเว้น *P. aeruginosa* ราเอ็นโดไฟต์ส่วนใหญ่ออกฤทธิ์ต้าน *S. aureus* พบว่าชนิดของอาหารเพาะเชื้อมีผลต่อราเอ็นโดไฟต์ทั้งในด้านการสร้างสารออกฤทธิ์และความแรงของสารออกฤทธิ์ ราเอ็นโดไฟต์ส่วนใหญ่ที่ออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์เป็นราที่เพาะเลี้ยงบน malt extract agar การเพาะเลี้ยงราเอ็นโดไฟต์ในสภาวะที่แตกต่างกันคือ เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็งจะให้ฤทธิ์ต้าน จุลินทรีย์ที่แตกต่างกับเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวอีกส่วนหนึ่งด้วย

ในปัจจุบันการใช้ยารักษาโรคกำลังประสบปัญหาการดื้อยา ทำให้นักวิทยาศาสตร์ต้องค้นหาตัวยาใหม่ๆ ในการรักษาโรค ซึ่งในปัจจุบันอาจมีการปรับเปลี่ยนโครงสร้างทางเคมีในตัวยาเดิมให้มีฤทธิ์ที่ดีขึ้น หรือการหาตัวยาใหม่ๆ จากแหล่งธรรมชาติต่างๆ เช่น จากแบคทีเรีย จากรา รวมทั้งจากราเอ็นโดไฟท์ มีรายงานการศึกษาพบว่าการแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยเฉพาะสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งและเชื้อแบคทีเรียก่อโรคชนิดดื้อยาจากราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากพืชสมุนไพรไทยและพืชป่าชายเลน โดยเฉพาะราเอ็นโดไฟท์ที่แยกได้จากพืชป่าชายเลนของไทยมีความน่าสนใจมาก เนื่องจากราเหล่านี้มักผลิตสารที่มีโครงสร้างที่น่าสนใจและมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดี เนื่องจากบริเวณป่าชายเลนมีความผันแปรมากทั้งทางทางกายภาพและชีวภาพสูง ต่อไปนี้ เป็นรายงานจากการศึกษาราเอ็นโดไฟท์จากทั้งในประเทศไทย และในต่างประเทศ

2.2 แอคติโนมัยซีท

แอคติโนมัยซีทเป็นแหล่งของการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลายชนิด จากการสำรวจรวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับสารออกฤทธิ์ และสารแอนติไบโอติก ของ Lazzarini และคณะ (2000) พบว่า ในจำนวนสารแอนติไบโอติกที่มีอยู่ในปัจจุบันประมาณกว่า 8000 ชนิดนั้น พบว่ามากกว่า 60% ถูกสร้างมาจากแอคติโนมัยซีท โดยที่เป็นสารที่ Streptomycetes สร้างขึ้น 45.6 % และอีกประมาณ 16% สร้างได้จากแอคติโนมัยซีทที่หายาก และสารแอนติไบโอติกที่สร้างนั้นส่วนใหญ่สร้างมาจากแอคติโนมัยซีทใน Family *Streptomyceteaceae* รองลงมาได้แก่ *Micromonosporaceae, Pseudonocardiaceae, Nocardiaceae* และ *Streptosporangiaceae* ตามลำดับ และจาก หลาย ๆรายงานได้แสดงให้เห็นว่า แอคติโนมัยซีทมีการแพร่กระจายโดยทั่วไปในตะกอนของทะเลชายฝั่ง รวมไปถึงสิ่งแวดล้อมทางทะเลอื่น ๆ และตะกอนก้นทะเลลึก ๆด้วย (Ghanem et al., 2000; Pathom-aree,et al. 2006; Bull, et al. 2005; Maldonado, et al., 2005; Bredholdt, et al. 2007, Bredholdt, et al. 2008).

การค้นพบสารแอนติไบโอติกจากแอคติโนมัยซีทที่ได้จากระบบนิเวศทางทะเลนั้น เริ่มตั้งแต่มีรายงานของ Okami (1976) ซึ่งได้พบสาร istamycin จาก*Streptomyces tenjimariensis* ที่แยกได้จากโคลนในทะเลตื้น ๆของอ่าวซากามิ ประเทศญี่ปุ่น ซึ่งสาร istamycin นี้ประกอบด้วยน้ำตาลอะมิโนหนึ่งโมเลกุล และ aminocyclitol อีกหนึ่งโมเลกุลและสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบมากมาย รวมทั้งจุลินทรีย์ที่ดื้อยาต่อกลุ่ม aminoglycoside อื่น ๆด้วย

ในปี 1989 Miyado และคณะ (Miyado *et al.* 1989) ได้เปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญในอาหารที่ดีของการค้นพบสารแอนติไบโอติกชนิดใหม่ โดยเฉพาะอย่างยิ่งใน *Streptosporangium* spp. ค้นพบมากกว่า 30 ชนิดในช่วงเวลา 30 ปี ที่ผ่านมานี้นับจากรายงานการค้นพบครั้งแรกใน ปี 1966 ซึ่งหลายชนิดของแอนติไบโอติกที่สร้างขึ้นนี้ส่วนมากแล้วอยู่ในรูปของสารประกอบที่มีโครงสร้างโมเลกุลที่ซับซ้อนและหลากหลายมาก

จากการศึกษาวิจัยของ Hong และคณะ (2009) ซึ่งได้แยกได้จากดินป่าชายเลนรวม 8 แห่งของประเทศจีน โดยแยกแอคติโนมัยซีทได้ทั้งหมดประมาณ 2000 กว่าไอโซเลต และในจำนวนนี้พบว่ามีแอคติโนมัยซีทที่สามารถสร้างสารเมตาโบไลท์อันดับ 2 ที่สำคัญจำนวนมาก โดยมีทั้งสารที่ยับยั้งการเจริญของเซลล์เนื้องอกของลำไส้ (human colon tumor) ยับยั้งการเจริญของ *Candida albicans* และยับยั้ง *Staphylococcus aureus* จำนวน ประมาณ 20%, 50% และ 10% ตามลำดับ ขณะที่มีแอคติโนมัยซีทอีก 3 % ที่สสามารถยับยั้งโปรทีนไทโรซีนฟอสเฟต 1 บี (Protein tyrosine phosphate 1B, PTP1B) ซึ่งเป็นโปรทีนที่พบว่ามีความสัมพันธ์กับอาการของโรคเบาหวาน นอกจากนี้ยังมีอีก

9 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งเอ็นไซม์ aurora kinaseA ซึ่งเป็นเอ็นไซม์ที่มีความสัมพันธ์กับอาการของโรคประสาทเสื่อม (neurodegenerative) ไอโซเลตทั้งหมดนี้ได้ถูกนำมาศึกษารูปร่างลักษณะเพื่อจำแนกชนิดในระดับจีนัส พบว่ามีทั้งหมด 13 จีนัส ที่พบมากที่สุดคือ *Micromonospora* และ *Streptomyces* ส่วนแอคติโนมัยซีทที่ให้ผลที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxic activity) มีทั้งหมด 7 จีนัส และโดยภาพรวมแล้วดินจากป่าชายเลนพบแอคติโนมัยซีทที่มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจำนวนมากและในช่วงระยะเลา 6-8 ปีที่ผ่านมานี้ พบว่ามีการค้นพบสารแอนติไบโอติกทั้งที่เป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ และสารยับยั้งเซลล์มะเร็ง และเมตาโบไลท์อื่น ๆที่เป็นสารใหม่ ๆ จำนวนมาก จาก Actinomycetes ทะเล (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 2 สารเมตาโบไลท์ใหม่ ๆที่สร้างจาก marine actinomycetes ระหว่างปี 2003-2005 (Lam, 2006)

Compounds	Source	Activity
Abyssomicins	*Verrucosispora* sp.	Antibacterial
Aureoverticillactam	*Streptomyces aureoverticillatus*	Anticancer
Bonactin	*Streptomyces* sp.	Antibacterial,;antifungal
Caprolactones	*Streptomyces* sp.	Anticancer
Chandrananimycins	*Actinomadura* sp.	Anticancer; antialgal; antifungal;
antibacterial		
Chinikomycins	*Streptomyces* sp.	Anticancer
Chloro-dihydroquinones	*Novel Actinomycete*	Antibacterial, Anticancer
Diazepinomicin	*Micromonospora* sp.	Antibacterial; anticancer; anti-inflamatory
3,6-disubstituted indoles	*Streptomyces* sp.	Anticancer
Frigocyclinones	*Streptomyces griseus*	Antibacterial
Glaciapyrroles	*Streptomyces* sp.	Antibacterial
Gutinimycin	*Streptomyces* sp.	Antibacterial
Helquinoline	*Janibacter limosus*	Antibacterial
Himalomycins	*Streptomyces* sp.	Antibacterial
IB-00208	*Actinomadura* sp.	Anticancer
Komodoquinone A	*Streptomyces* sp.	Neuritogenic activity
Lajollamycin	*Streptomyces nodusus*	Antibacterial
Marinomycins	*Marinispora*	Antibacterial; anticancer
Michercharmycins	*Thermoactinomyces* sp.	Anticancer
MKN-349A	*Nocardiopsis* sp.	Unknown biological activity
Salinosporamide A (NPI-0052)	*Salinispora tropica*	Anticancer
Sporolides	*Salinispora tropica*	Unknown biological activity
Trioxacarcins	*Streptomyces* sp.	Antibacterial; anticancer; antimalarial

จากตารางข้างบนนี้แสดงให้เห็นถึงศักยภาพในการสร้างสารออกฤทธิ์ของแอคติโนมัยซีท ที่ยังคงสามารถพบได้เรื่อย ๆ และในแอคติโนมัยซีทชนิดหนึ่ง ๆ อาจให้สารออกฤทธิ์ที่สำคัญหลายประเภท ทั้งที่เป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ เซลล์มะเร็ง หรือมีสารยับยั้งสาหร่าย หรือมาลาเรียร่วมด้วย เป็นต้น นอกจากนี้ตัวอย่างของยาปฏิชีวนะที่สร้างได้จากแอคติโนมัยซีทในปัจจุบันก็มีเป็นจำนวนมากที่มีการใช้งาน และมีการผลิตในทางอุตสาหกรรม

ตัวอย่างของยาปฏิชีวนะที่สร้างโดยแอคติโนมัยซีทแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 3 ตัวอย่างของสารปฏิชีวนะที่เป็นยารักษาโรคและสร้างขึ้นโดยแอคติโนมัยซีท (Borgos, 2006)

Antibiotic class	Example drug	Producing actinomycete
Glycopeptides	Vancomycin	*Amycolatopsis orientalis*
Aminoglycosides	Streptomycin	*Streptomyces griseus*
Macrolides	Erythromycin	*Saccharopolyspora erythraea*
Tetracyclins	Chlortetracycline	*Streptomyces aureofaciens*
Chloramphenicol	Chloramphenicol	*Streptomyces venezuelae*
Lipopeptides	Daptomycin	*Streptomyces roseosporus*
Rifamycins	Rifampicin	*Amycolatopsis mediterranei*
Polyenes	Nystatin	*Streptomyces noursei*

Xiao et al. (2008) ได้ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งของแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากป่าชายเลนในเมือง Zhangzhou และ เมือง Fujian ของประเทศจีน โดยใช้จุลินทรีย์ทดสอบ 5 ชนิด คือ *Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus, Esherichia coli, Candida albicans* และ *Rhizoctonia solani* รวมทั้งเซลล์เนื้องอก 3 ชนิด คือ BEL 7402, A549 และ HL 60 cell ines พบว่า 42.3% ของแอคติโนมัยซีทที่แยกได้มีสารแอนติไบโอติกยับยั้งจุลินทรีย์ 37.4% ของแอคติโนมัยซีทพบว่ามีสารยับยั้งเซลล์เนื้องอก (anti-tumor activities) และจากการวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16S rDNA ของแอคติโนมัยซีทเหล่านี้ พบว่าเป็น *Streptomyces* 89% *Microomonospora* 6.1% *Saccharomonospora* 0.6% *Actinomadura* 3.7% และ *Nocardiopsis* 0.6% และพบว่าเป็น *Streptomyces* ชนิดใหม่ถึง 3 isolates

จากรายงานของ Bister et al. (2004) ได้ศึกษาสารออกฤทธิ์ชีวภาพที่คัดเลือกเชื้อได้จาก *Actinomyces* จำนวน *200* ไอโ ซเลต จากทั้งบนบกและในทะเล และได้สกัดสารออกฤทธิ์จากแอคติโนมัยซีทที่พบเหล่านี้ ได้ พบสารออกฤทธิ์ชนิดใหม่ที่รบกวนการสร้างกรด *para*-aminobenzoic (*p*ABA) ซึ่งเป็นสาร intermediate ที่สำคัญที่นำไปสู่การสร้างสาร tetrahydrofolate และการค้นพบครั้งนี้ได้นำไปสู่การค้นพบสาร ออกฤทธิ์ชนิดใหม่ abyssomicin G, H และ abyssomicin- C ซึ่งเป็นสารประกอบเชิงซ้อนประเภท polyketyde ที่สร้างได้จาก *Verrucosispora* AB-18-032 ซึ่งเป็นแอ

คติโนมัยซีทจากทะเล แยกเชื้อได้จากตะกอนก้นทะเลของประเทศญี่ปุ่น ที่ความลึก 289 เมตร สาร abyssomicin C มีฤทธิ์ยับยั้ง MRSA ได้ดีมาก และมีค่า MIC ที่ 4 µg/ ml และ สามารถยับยั้ง VRSA ได้ที่ 13µg /ml (Keller, et al., 2007)

2.3 ปัจจัยสำคัญในการสร้างสารแอนติไบโอติกในแอคติโนมัยซีท

จากการศึกษาของ Gunnarsson, et al.,(2003) ได้ศึกษาการสร้างสาร A 40926 จากแอคติโนมัยซีทจีนัส *Nonomuraea* sp. ATCC 39727 จากการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารที่แตกต่างกันนั้น พบว่าในการสร้างสารเมตาโบไลท์ของเชื้อตัวนี้ไม่ได้ถูกกระตุ้นให้สร้างได้มากขึ้นเมื่อเชื้อมีการเจริญเต็มที่ แต่จะเริ่มมีการสร้างสารเมื่อการเจริญเริ่มลดลง หรือเกิดขึ้นเมื่อสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเริ่มขาดแคลนลง ซึ่งโดยทั่วไปแล้ว สารอาหารนั้นมีความสำคัญทั้งสำหรับอัตราการสร้างสารเมตาโบไลท์อันดับสอง และสำหรับการกระตุ้นให้เกิดขบวนการสร้างสาร ยกตัวอย่างในกรณีของการสร้างสาร actinorhodin โดย *S. coelicolor* ซึ่งถูกกระตุ้นให้เกิดการสร้างเมื่อ โพแตสเซียมฟอสเฟต และไนโตรเจน เริ่มขาดแคลน หรือเมื่ออัตราการเจริญเริ่มลดลง นอกจากนั้นอัตราการสร้าง Actinorhodin ยังเป็นปฏิภาคกลับกับความเข้มข้นของสารอาหารที่เป็นแหล่งไนโตรเจน และการสร้าง chloramphenicol ใน *S. venezualae* จะเพิ่มมากขึ้นเมื่อการใช้ C- และ N- ในอาหารที่ใช้เลี้ยงเป็นไปอย่างไม่ค่อยดี อย่างไรก็ตาม ความเข้มข้นของกลูโคส ทที่มีอยู่มากในช่วงเริ่มต้นของการเลี้ยงนั้น มีผลตรงกันข้ามกับการสร้างสาร chloramphenicol แต่ว่าไม่ส่งผลให้การเริ่มขบวนการสร้าง แอนติไบโอติกใน *S. venezualae* ช้าไปในการเลี้ยงแบบ batch culture ส่วนใน *Amycolatopsis orientalis* ที่สามารถสร้าง vancomycin นั้น พบว่าเมื่อในอาหารมีปริมาณฟอสเฟตย้อย ๆก็จะช่วยเพิ่มการสร้างสารแอนติไบโอติกทั้งในถังหมักแบบ batch และ continuous และคล้าย ๆกับกรณีการสร้างสาร teichoplanin ใน *Actinoplanes teichomyceticus* เมื่อความเข้มข้นของฟอสเฟต และแอมโมเนียมในอาหารลดลง จะทำให้การสร้างสาร teichoplanin ลดลงไปในการเลี้ยงแบบ batch fermentation

จากรายงานของ Parungao et al. (2007) ซึ่งได้ศึกษาแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากตะกอนดินทั้งจากบริเวณน้ำกร่อย น้ำทะเล และบริเวณดินแห้งจากเกาะ Samal ประเทศฟิลิปปินส์ โดยแยกแอคติโนมัยซีทได้ทั้งหมด 54 ไอโซเลต เพื่อนำมาศึกษาฤทธิ์ยับยั้งต่อเชื้อจุลินทรีย์ทั้งแบคทีเรียและรา เช่น *Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Candida utilis* และ *Aspergilus niger* พบว่ามีแอคติโนมัยซีท 14 ไอโซเลต จากทั้งหมด 54 ไอโซเลต สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้อย่างน้อย 1 ชนิด มี 13 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้อย่างน้อย 1 ชนิด และพบว่ามี 4 ไอโซเลตที่ที่สามารถยับยั้งเชื้อราอย่างน้อย 1 ชนิด พบว่าตัวอย่างที่แยกได้จากดินแห้งนั้นให้สารออกฤทธิ์สูงกว่าบริเวณอื่น ๆ โดยมีถึง 52% ที่ให้สารยับยั้งแบคทีเรีย และ 13% ที่ให้สารยับยั้งเชื้อรา แอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากตะกอนทะเลไม่ให้สารออกฤทธิ์ และมี 1 ไอโซเลตที่แยกจากบริเวณน้ำกร่อยที่ให้สารออกฤทธิ์

2.4 การจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตโดยการใช้ Natural Phylogenetic

หลักของการจำแนกโดยใช้ phonetic taxonomy เริ่มต้นใช้กันมาตั้งแต่ ปี 1763 โดย นักพฤกศาสตร์ชาวฝรั่งเศสชื่อ Michel Adanson ซึ่งเข้าใจดีว่าการจำแนกชนิดโดยศึกษาจากลักษณะที่เหมือน หรือคล้ายคลึงกันตามธรรมชาติ ของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด จะมีความสมเหตุสมผลกว่าการรวบรวมคุณลักษณะทุกอย่างที่สิ่งมีชีวิตนั้น ๆมี และ

จัดเรียงกันเป็นกลุ่ม ซึ่งจะพบว่ายังมีอีกหลาย ลักษณะที่ไม่มีความแน่นอนหรือไม่แน่ชัดที่จะจัดได้ สำหรับแบคทีเรีย นักจุลชีววิทยาบางคนจึงได้พัฒนา วิธี การจัดจำแนกกลุ่มตามธรรมชาติ ที่สะท้อนให้เห็นถึงวิวัฒนาการทางพันธุกรรมของกลุ่มแบคทีเรียขึ้น ซึ่งเขาได้พยายามศึกษาวิวัฒนาการของแบคทีเรียแบบย้อนรอยเดิม จนกระทั่งรู้ได้ว่าเป็นจุลินทรีย์ชนิดใด และแบคทีเรียแต่ละชนิดก็จะถูกจัดเป็นกลุ่มขึ้นกับชุดของคุณลักษณะที่ปรากฏให้เห็นที่เชื่อว่ามีการถ่ายทอดมาจากบรรพบุรุษร่วมกัน การจัดเป็นกลุ่มตามคุณลักษณะที่คล้ายคลึงกันนี้ (Cladism) จะถูกสร้างขึ้นอยู่บนพื้นฐานจากการวิเคราะห์ทุกลักษณะที่มี เมื่อมีการเปรียบเทียบกันของสิ่งมีชีวิตที่คล้ายกัน เพื่อที่จะแยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตที่มีบรรพบุรุษมาร่วมกัน (plesiomorphic) ออกจากพวกที่มีวิวัฒนาการของรูปร่างที่เปลี่ยนแปลงมา (apomorphic)

2. 4.1 ความรู้พื้นฐาน ในเรื่องของวิวัฒนาการด้านโมเลกุล

ในระหว่างที่มีขบวนการทำซ้ำ (duplication) ของข้อมูลพันธุกรรม DNA- หรือ RNA polymerase สามารถที่จะเข้าไปรวมเข้าด้วยกันกับ non-complementary nucleotide นอกจากนั้น เบสที่อยู่ในสายของ DNA สามารถที่จะมีการเปลี่ยนแปลงทางเคมีได้ เนื่องจากปัจจัยของสิ่งแวดล้อม เช่นรังสี UV หรือสารเคมี และเบสที่ได้เปลี่ยนแปลงไปนี้สามารถที่จะรบกวนการสร้าง DNA complementary strand ได้อย่างดี ด้วยเหตุนี้จึงสามารถทำให้เกิดมี nucleotide เข้าไปแทรกตัวอยู่ ที่ไม่เข้าคู่ (complementary) กับ nucleotide ดั้งเดิม เมื่อการเปลี่ยนแปลงนี้สามารถหลบเลี่ยงกลไกการซ่อมแซมของเซลล์ไปได้ ข้อมูลทางพันธุกรรมก็จะเปลี่ยนแปลงไป ผลที่เกิดขึ้นจะเรียกว่า การกลายพันธุ์เฉพาะที่ (point mutation) รหัสพันธุกรรมของการสร้างโปรทีน มักจะมี point mutation เกิดขึ้น ที่ำแหน่งของ codon ตัวที่ 3 ซึ่งไม่ต่อยมีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน (มักมีการเปลี่ยนแปลงเพียง 30% เท่านั้น) ส่วนการเปลี่ยนแปลงที่ codon ที่ 2 เกิดขึ้นบ่อย และส่นมากที่สุดเกิดที่ codon ที่ 1 (96%) ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการสร้างกรดอะมิโน mutation ที่ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนจะเรียกว่า *synonymous mutations* แต่ถ้ามี mutation แล้วทำให้เกิดมีกรดอะมิโนผิดแปลกไปจากเดิม จะเรียกว่า *non -synonymous mutation*

การเข้าไปแทรกตัวแทนที่ purine เบส (A,G) ด้วยเบส purine และ แทนที่ เบส pyrimidine (C, T) ด้วย pyrimidine เกิดขึ้นง่ายมาก เนื่องจากโครงสร้างทางเคมีของโมเลกุล และผลของ mutation ที่เกิดขึ้นจะเรียกว่า transitions การเปลี่ยนเบส purine เป็น pyrimidine หรือเปลี่ยนในทางกลับกันเกิดขึ้นน้อย แต่เมื่อเกิด การเปลี่ยนแปลงในลักษณะนี้ขึ้น จะส่ง ผลกระทบที่รุนแรงถึงโปรทีนมากกว่าการเกิดแบบ transitions เนื่องจากเกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางชีวเคมีที่รุนแรงมากกว่า ของยีนที่ code สำหรับการสร้างกรดอะมิโน และมีความเป็นไปได้ที่จะมีการผิดพลาดแบบ transitions ได้ 4 แบบ (A<->G, C<->T) และ ผิดพลาดแบบ transversion ได้ 8 แบบ (A<->C, A<->T, G<->C, G<->T) ดังนั้นถ้าจะมีการเกิด mutation ขึ้นแบบสุ่ม การเกิดแบบ transversion ก็จะมีโอกาสเกิดได้บ่อยมากกว่าแบบ transitions ถึง 2 เท่า อย่างไรก็ตาม ในหลาย ๆยีน การขัดขวางการเกิดแบบ transition มักจะมีมากกว่าแบบ transversion

การเกิด duplication ของข้อมูลพันธุกรรมที่ผิดพลาด ก่อให้เกิดการขาดหาย(deletion) หรือมีเพิ่ม (insertion) ของ nucleotide 1 ตัว หรือมากกว่า 1 ตัว ได้ด้วย เมื่อมี nucleotides จำนวน 3 ตัว แทรกเพิ่มเข้ามาหรือขาดหายในบริเวณที่มีการถอดรหัส (coding region) reading frame จะไม่เปลี่ยนแปลง แต่จะมีกรดอะมิโน 1 ตัวหรือมากกว่าขาดหายไป หรือมีเพิ่ม เมื่อมี nucleotide 1 หรือ 2 ตัวแทรกเข้ามา หรือขาดหายไป reading frame จะถูกรบกวน และโดยทั่วไปจะส่งผลให้ยีนสร้างโปรทีนที่ผิดแปลกไปโดยสิ้นเชิง โดยมี กรดอะมิโน และความยาวโปรทีน

ที่แตกต่างออกไปจากโปรทีนดั้งเดิม และเกี่ยวกับตำแหน่งที่เกิดนั้นอยู่บริเวณไหนของยีนด้วย ด้วยเหตุนั้น การเกิด insertion หรือ deletion จึงมักไม่ค่อยเกิดบริเวณ coding regions แต่มักเกิดขึ้นบ่อยบริเวณ non-coding regions

2.4.2 คำจำกัดความของ ชนิด (species) ของแบคทีเรีย

ความรู้ใหม่ ๆ ที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วทางด้าน physiology และ ชีวโมเลกุล ทำให้คำจำกัดความของคำว่าชนิดเปลี่ยนไป เนื่องจากมีแนวความคิดใหม่ทางด้านชีววิทยาที่มีความเป็นไปได้มากขึ้น จุลินทรีย์ที่ถูกนับว่าเป็นชนิดเดียวกัน นั้นต้อง ' มีข้อมูลทางพันธุกรรมที่ถูกโปรแกรมไว้ด้วยรหัส DNA เพื่อรักษาคุณสมบัติที่เป็นลักษณะเฉพาะที่มีได้ร่วมกัน ในชนิดเดียวกัน' (Lederberg, 1992)

ในแบคทีเรียนั้น การจะใช้ความคล้ายคลึงกันของลักษณะทางสัณฐานวิทยา ในการจะบอกว่าเป็นชนิดเดียวกันนั้นเป็นสิ่งที่มีคุณค่าน้อยมาก ยกตัวอย่าง เช่น แบคทีเรียในกลุ่ม *Enterobacteriaceae* ทั้งหมดมีลักษณะเป็นรูปแท่ง มีแฟลกเจลารอบเซลล์ *Clostridium* ทั้งหมด เป็นแกรมบวก รูปแท่ง สร้างเอ็นโดสปอร์ เป็นต้น การจะกำหนดเกณฑ์ ที่จะบอกว่าต้องสามารถแยกออกมาจากกลุ่มที่สืบพันธุ์ได้ นั้น จึงเป็นสิ่งที่ยากมากในสิ่งมีชีวิตที่เป็น prokaryotes นอกจากนี้ปรากฏการณ์เกี่ยวกับการเปลี่ยนถ่ายยีนในหลาย ๆรูปแบบยังเป็นที่เข้าใจกันน้อยมาก การที่จะใช้คำจำกัดความที่นักชีววิทยาเคยใช้กัน จึงเป็นไปไม่ได้ นักจุลชีววิทยายังต้องเผชิญกับปัญหาความหลากหลายที่มากมายด้วย ในสิ่งมีชีวิตพวก Prokaryotes ได้ปรากฏในโลกนี้เมื่อ 3 หรือ 4 พันล้านปีมาแล้ว และ *Homo sapiens* เมื่อ 300,000 ปี มาแล้ว ช่วงระยะของช่วงชีวิตที่เพิ่มจำนวนได้ (generation time) ก็แตกต่างกันมาก สำหรับมนุษย์ 25 ปี (หรือ 10,000 generation โดยประมาณนับจากเริ่มแรก) และ 20 นาที สำหรับ *E. coli* ในอาหารเหลว ซึ่งจะกลายเป็น 10,000 generation ได้ภายในระยะเวลาน้อยกว่า 6 เดือน นอกจากนั้นการส่งผ่าน plasmid และการเกิดการกลายพันธุ์ก็เกิดขึ้นบ่อยมาก ในขณะที่ยังไม่มีความคิดเฉพาะสำหรับคำว่า ชนิด ของสิ่งมีชีวิตพวก prokaryotes การบอกว่าเป็นแบคทีเรียชนิดเดียวกัน จะได้คำจำความดังนี้ ' species เดียวกัน จะรวมถึงสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่มี DNA/DNA homology จากการทำ hybridization ที่สูงกว่า 70% ขึ้นไป และมีมี hybrids ของ DNA ที่คงตัว วัดได้จาก thermal stability ที่น้อยกว่า 5°C

2.4.3 คุณลักษณะที่สร้างให้เหมือนเดิมได้ (Reproducibility)

บางทีสายพันธุ์ต่าง ๆของแบคทีเรียอาจสามารถสูญเสียคุณสมบัติในการสร้างสารบางอย่าง หรือ คุณสมบัติในการย่อยสลายสารบางอย่าง เมื่อมีการสูญเสียพลาสมิดไปหลังจากมีการ ถ่ายเชื้อหลาย ๆครั้ง (subcultures) หรือไม่ก็อาจมีการกลายพันธุ์ไป ทำให้ไม่สามารถสร้างคุณลักษณะต่าง ๆที่เหมือนเดิมได้ นอกจากนั้นในการแปลความหมายของปฏิริยาการทดสอบต่าง ๆ บางครั้งก็ยาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งการจะประเมินผลการทดสอบว่า เป็นผลบวกที่อ่อน (weakly positive) ซึ่งอาจเป็นผลมาจากปัจจัยการทดสอบอื่น ๆก็เป็นได้ นอกจากนั้นการศึกษาด้านการจัดจำแนกชนิด (Taxonomy) ยังเกี่ยวข้องกับผลการทดสอบอีกนับพันรายการ ไม่นับผลที่อาจเกิดจากการผิดพลาดของการให้รหัส และอื่น ๆอีก

อย่างไรก็ดีปัญหาเหล่านี้สามารถลดทอนลงได้หากระมัดระวัง อาจจะต้องอ่านผล 2 ครั้ง หรือมีการทำซ้ำ หรือมีทั้ง positive / negative control, Sneath ได้เสนอข้อควรปฏิบัติในการศึกษา ทำซ้ำสักประมาณ 10% ของลักษณะ phenotypes ที่ทดสอบเพื่อนำมาคำนวณค่า variance , Si^2

$$Si^2 : \underline{n}$$

$2t$

ซึ่ง n คือ จำนวนของลักษณะ phenotypes ที่แตกต่างกัน (ทั้งที่ควรจะเหมือนกัน) และ t คือ จำนวนสายพันธุ์ทั้งหมดที่นำมาทดสอบ และ ความผิดพลาดทั้งหมด คือ

$$S^2 = \underline{1}(S^2_A + S^2_B + \ldots\ldots + S^2_N)$$

2.4.4 ข้อมูลที่ต้องใช้สำหรับ Molecular phylogenetics

ในการตรวจสอบวิวัฒนาการและความสัมพันธ์ระหว่างยีนต่าง ๆ กับสิ่งมีชีวิต จะต้องใช้ข้อมูลหลายประการ วิธีที่ใช้โดยทั่วไปในการประเมินความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของสิ่งมีชีวิต คือลักษณะทางสัณฐานวิทยา เนื่องจากการจัดจำแนกชนิดก็ยังคงอิงพื้นฐานส่วนใหญ่จากการเปรียบเทียบลักษณะรูปร่าง เมื่อข้อมูลทางด้านชีวโมเลกุลในปัจจุบันเพิ่มขึ้นอย่างมาก เช่นข้อมูลของลำดับ นิวคลีโอไทด์ หรือ ของกรดอะมิโน และความยาวของ ชิ้น restriction fragment (restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) ทำให้สามารถนำมาประกอบเพื่อพิจารณาถึงความสัมพันธ์ทาง phylogenetic ไม่ว่าจะใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา หรือวิธีทางชีวโมเลกุล เพื่อตอบคำถามอย่างใดอย่างหนึ่งทางด้านวิวัฒนาการ ก็ยังคงเป็นเรื่องที่ต้องถกเถียงกันมาก อย่างไรก็ตาม การใช้ข้อมูลทางด้านชีวโมเลกุลในการอนุมานการสร้าง phylogenetic trees ในปัจจุบันได้รับความสนใจอย่างมากของนักชีววิทยาในหลาย ๆสาขา และก็มักจะต้องใช้ข้อมูลทางด้านสัณฐานวิทยาประกอบ ในการศึกษาถึงความสัมพันธ์ซึ่งจะทำให้มีข้อมูลที่มากขึ้น

ตามทฤษฎีวิวัฒนาการ สิ่งมีชีวิตทุกชนิดมีวิวัฒนาการมาจากบรรพบุรุษดั้งเดิมร่วมกัน โดยย้อนกลับไปยังจุดตั้งต้นของกำเนิดสิ่งมีชีวิต กลไกที่แตกต่างของความแตกต่างของรูปร่างที่ได้รับถ่ายทอดลักษณะมา นำไปสู่ความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตในปัจจุบัน ซึ่งกลไกเหล่านี้รวมทั้งการเกิด mutation การเกิด duplication ของยีน การเกิด reorganization ของ จีโนม การแลกเปลี่ยนยีน เช่น recombination, reassortment และ การส่งผ่านยีนทางด้านข้าง (lateral gene transfer) ด้วยสาเหตุทั้งหมดเหล่านี้ของการเกิด mutations หลาย ๆแบบ (point mutation, insertions, และ deletion) ได้ถูกนำมาใช้ในการอ้างอิงความสัมพันธ์ระหว่างยีน โดยพื้นฐานวิธีทาง phylogenetic แล้ว ยีนที่มีความเหมือนกัน จะสมมุติว่าเป็น homologous กัน (เช่นอาจจะมีบรรพบุรุษมาร่วมกัน) แม้ว่าจะได้สมมุติว่าสิ่งมีชีวิตทุกชนิดมีบรรพบุรุษมาร่วมกัน เมื่อกาลเวลาผ่านไป ความคล้ายคลึงกัน ของยีน 2 ชนิด สามารถกร่อนหายไป ดังนั้นข้อมูลลำดับเบสไม่สามารถเก็บข้อมูลที่มากพอสำหรับความสัมพันธ์ระหว่างยีน 2 ยีน และทั้ง 2 ยีนก็ได้สะสมยีนที่ได้มีการเปลี่ยนแปลงไปมากด้วย ดังนั้น คำว่า homology จึงใช้สำหรับเมื่อบรรพบุรุษที่ร่วมกันนั้น ไม่นานเกินไปสำหรับข้อมูลลำดับเบส เพื่อที่จะคงรักษาความคล้ายคลึงที่มากพอ ที่จะใช้ได้ในการวิเคราะห์ ในเรื่องการถ่ายทอดวิวัฒนาการ (phylogenetic)

เมื่อลำดับเบส 2 เส้นถูกนำมาเปรียบเทียบกัน บางคนก็จะคำนวณ เปอร์เซ็นต์ similarity โดยการนับจำนวนนิวคลีโอไทด์ หรือ กรดอะมิโนที่เหมือนกัน รวมทั้งความยาวของลำดับเบสด้วย ซึ่งเป็นสิ่งที่ทำได้แม้ว่าลำดับเบสจะไม่ได้เป็น homologous กัน DNA นั้นประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ 4 ชนิด คือ A, G, C และ T

2.4.5 วิธีสร้างแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree)

แผนภูมิต้นไม้ เป็นโครงสร้างที่ซึ่งมีชนิดของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆเรียงอยู่บนกิ่ง ที่มีความต่อเชื่อมเข้าด้วยกันในทุก ๆ สิ่งมีชีวิตเหล่านั้นตามความสัมพันธุ์และ/ หรือ การถ่ายทอดลักษณะทางวิวัฒนาการร่วมกันมาช้านาน ตัวอย่าง แผนภูมิต้นไม้ที่มีราก (rooted tree) และมีมาตราส่วนของแต่ละกิ่งแขนง ได้แสดงไว้ดังรูปที่ 1 มีวิธีการอยู่หลายวิธีในการสร้าง แผนภูมิต้นไม้ และมีความแตกต่างกันไปในเรื่องของ ความมีเหตุผล ความน่าเชื่อถือ และความมีประสิทธิภาพ การคำนวณระยะห่างของยีน (genetic distance) และวิธีการทำให้ แผนภูมิต้นไม้มีราก (tree rooting) ก็ยังเป็นที่ถกเถียงถึงข้อดีข้อเสีย

ระยะห่างของยีน (Genetic distance)

ระยะห่างของยีนเป็นเรื่องเกี่ยวกับจำนวนครั้งของการกลายพันธุ์/ หรือจำนวนครั้งของเหตุการณ์ที่ได้วิวัฒนาการไประหว่างชนิดของสิ่งมีชีวิต เริ่มตั้งแต่สิ่งมีชีวิตทั้งสองมีความแตกต่างกัน วิธีที่ง่ายที่สุดที่จะคำนวณคือการนับจำนวนครั้งของความแตกต่างระหว่าง 2 ลำดับเบสที่เกิดขึ้นต่อเนื่องตามลำดับ อย่างไรก็ตามวิธีการที่มักจะถูกอ้างอิงบ่อย อย่างเช่นวิธี hamming method ก็ไม่ได้สะท้อนให้เห็นถึงประวัติลำดับเหตุการณ์ของการมีวิวัฒนาการ เนื่องจากไม่ใช่การกลายพันธุ์ที่เกิดทุกครั้ง ที่ได้ถูกบันทึกไว้ในลำดับเบสของยีนที่พบในปัจจุบัน

ในภาพที่ 2 ได้แสดงตัวอย่างที่ 3 ใน 12 เหตุการณ์ที่เกิดการกลายพันธุ์เท่านั้นที่ได้ถูกตรวจจับได้ระหว่าง homologous gene.

Junkes-Cantor Model ได้เสนอสมการเพื่อแก้ไขปัญหานี้ขึ้นในปี 1969 ดังนี้

$$K = -\frac{3}{4} \ln\left(3-\frac{4}{3}p\right)$$ (รูปที่ 3)

โดย K= ระยะห่างของยีน (genetic distance) เป็นค่าเฉลี่ยของจำนวนครั้งที่มีการแทนที่

P= เปอร์เซ็นต์ของความแตกต่าง

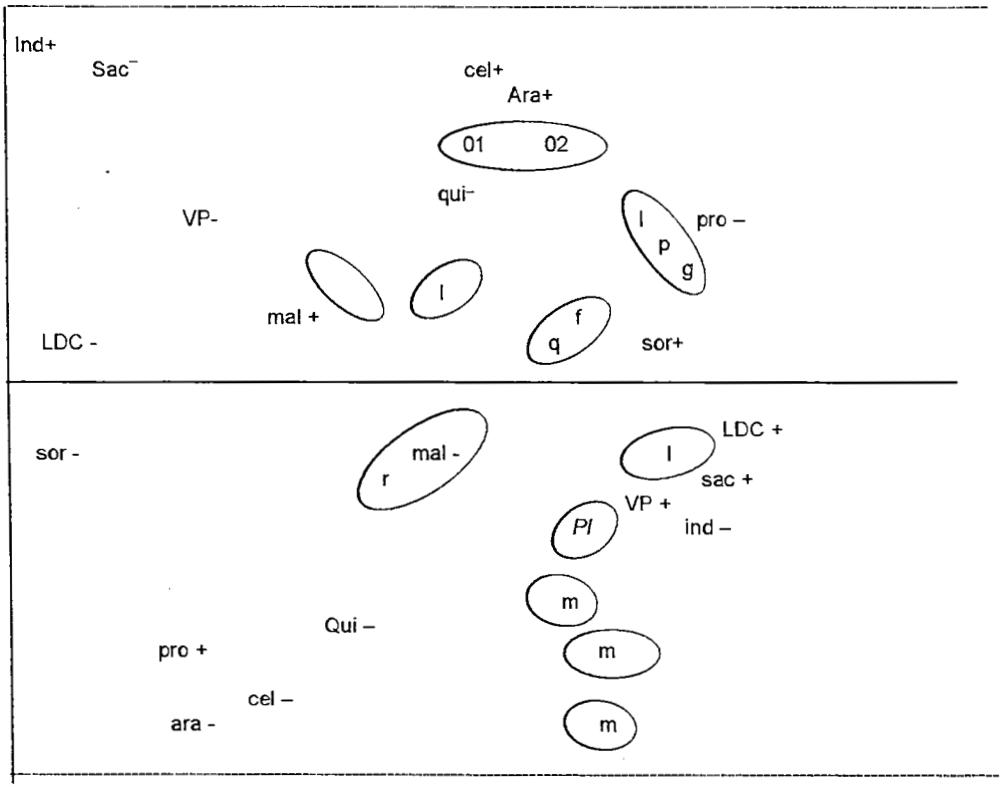
ความสัมพันธ์นี้แสดงถึงความถูกต้อง มีมากขึ้นตามระยะของ genetic distance และเมื่อเปอร์เซ็นต์ของความแตกต่างอิ่มตัวแล้ว (75%) ที่ระยะ genetic distance ที่แท้จริง ที่ไม่สามารถจะคัดลอกออกมาได้ Model ที่ทันสมัยขึ้นได้ถูกพิจารณาในเรื่องของ อัตราการเกิด transition / transversion ของยีน ที่แตกต่างกัน ความถี่ของเบสที่แตกต่าง รวมทั้งอัตราการแทนที่ที่ไม่สม่ำเสมอ ระหว่างจุด 2 จุด ซึ่งรูปแบบทั้งหมดได้ผลแบบเดียวกันที่ low divergence อย่างไรก็ตามที่เปอร์เซ็นต์ความแตกต่างสูง ๆ การเลือกรูปแบบที่เหมาะสมของ tree เป็นสิ่งสำคัญ

เทคนิคในการจัดกลุ่ม (Aggregation Techniques)

1. การวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก ประกอบด้วยการทำให้กระจุกของ จุดต่าง ๆ (n จุด) เห็นเด่นชัดขึ้นในขอบเขตที่ว่างที่ต่ำกว่า ซึ่งปกติแล้ว 2 หรือ 3 dimension space ที่มี กลุ่ม(จุด ๆ) ภายในที่มากสุด ผลของกลุ่มต่าง ๆที่ได้ขึ้นกับเทคนิคในการทำให้เห็นเด่นชัด นอกจากนั้นยังมีข้อจำกัดที่มากกว่า ซึ่งจะเป็นข้อจำกัดการวิเคราะห์สำหรับการจัดจำแนก การวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก ๆ มักจะไม่ค่อยใช้

นอกจากใช้เพื่อการศึกษาจำนวนประชากร หรือ เพื่อเป็นตัวแทนความสำคัญระหว่างชนิดของสิ่งมีชีวิต และ

ความแตกต่างของลักษณะต่าง ๆ



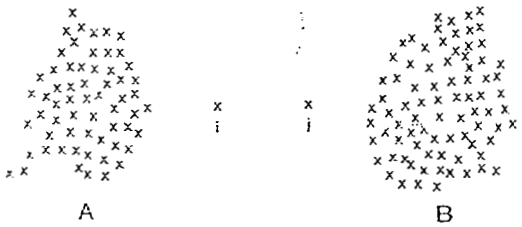
ภาพที่ 1 การวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (principal component analysis) ของ *Serratia* 720 สายพันธุ์ คือ ชนิด และ การทดสอบ ใช้ Jaccard-Sneath coefficient. 01= *S. odorifera* 1 biotype, 02= *S. odorifera* 2 biotype, F= *S. ficaria;* g= *S. Grimesii;* l= *S. Liquefaciens;* m= *S. Marcescens;* p= *S. Proteamaculans;* pl= *S. Plymuthica;*, q= *S. Quinovora;* r= *S. Rubidaea.* การทดสอบ ได้แก่: ara= arabinose utilization; cel= cellobiose utilization; ind= indole production; LDC=lysine decarboxylase; mal=malate utilization; pro= prodigiosin production; qui= quinate utilization; sac= sucrose utilization; sor; sorbitol utilization; VP= acetoin production.

2. การจัดกลุ่มตามลำดับขั้น (Hierachical clustering) ซึ่งประสบความสำเร็จ โดยการรวมกลุ่มเข้าด้วยกัน จากสิ่งมีชีวิตที่มีลักษณคล้ายคลึงกัน เช่น สิ่งมีชีวิตที่มีระยะสั้นที่สุดระหว่างแต่ละตัว แล้วต่อด้วยการทำตามลำดับขั้นดังนี้ การรวมเป็นกระจุก และแยกแต่ละสิ่งมีชีตออกมารวมกลุ่มกันใหม่ ตามระดับขั้นที่สูงขึ้นไป จนกว่าลักษณะ phenotype ทุกอย่างจะถูกจัดรวมกลุ่ม ระยะระหว่างสายพันธุ์สุดท้ายและ/หรือ กลุ่มสุดท้าย จะถูกให้เป็น 100 % hierarchic level

วิธีการรวมกลุ่ม aggregation ในหลาย ๆวิธี จะแตกต่างกันในเรื่องการคำนวณระยะระหว่างสิ่งมีชีวิตเดี่ยว ๆ และ cluster ที่มีขอบเขตแน่นอนแล้ว วิธี single method ประกอบด้วยการพิจารณาว่าระยะระหว่าง สปีชีส์เดี่ยว ๆและ กลุ่มสิ่งมีชีวิต เป็นระยะที่แยกสิ่งมีชีวิตเดี่ยว ๆ จากสิ่งมีชีวิตที่ใกล้เคียงกันที่สุดในกลุ่ม ยกตัวอย่าง cluster I และ cluster jk ตามระยะที่สั้นที่สุด i-j หรือ i-k:

$$D(I, jk) = \min D(I, j), D(i, k).$$

แต่ผลของวิธีนี้ ทำให้เกิดปรากฏการณ์ที่เรียกว่า chaining: สายพันธุ์ที่ที่ใกล้ชิด cluster ที่สุด จะถูกรวมอยู่ในกลุ่ม โดยไม่ต้องสร้าง homogeneous clusters ขึ้น แต่ถ้ามี atypical strains หลาย ๆตัวมากเกินไป เราก็จะได้ tree ที่เป็นลักษณะของขั้นบันได หรือ เหมือนหวี (comb dendrogram) และการศึกษานั้นก็จะไม่สามารถแปลความหมายได้



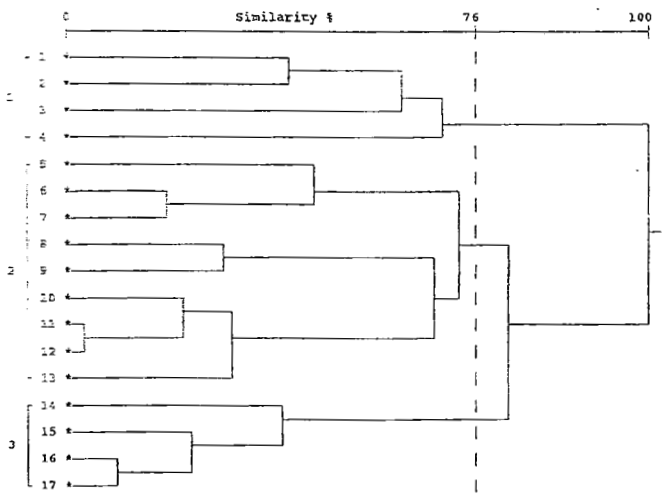
ภาพที่ 2 ปรากฏการ chaining ระยะห่างระหว่าง A และ B ถูกลดลงเหลือเพียงระยะระหว่าง สิ่งมีชีวิต

วิธีการสร้าง tree แบบ complete linkage cluster ให้ผลต่าง ๆกันไป เนื่องจากไม่ทำให้เกิด chaining วิธีนี้จะรวมสิ่งมีชีวิตแต่ละตัว หรือที่รวมอยู่เป็นกระจุก (cluster) ซึ่งลักษณะของสิ่งมีชีวิตแต่ละตัวกับตัวใดตัวหนึ่งในกระจุกนั้นมีความเหมือน น้อยที่สุด (least similarity) เข้ามาอยู่ด้วย

วิธี Unweighted pair group method with averages (UPGMA) เป็นอีกวิธีหนึ่งที่นิยมใช้ ซึ่งด้วยเทคนิคนี้ สิ่งมีชีวิตแต่ละตัวจะถูกรวมเข้าอยู่ในกลุ่มใน ระดับ Taxonomic level หนึ่ง ๆ ที่สอดคล้องกันกับระยะห่างเฉลี่ยของทุกลักษณะที่ประกอบเข้าเป็นกลุ่ม ระยะทาง (*D*) ระหว่างสิ่งมีชีวิต 2 กระจุก (cluster) สามารถคำนวณได้จากขนาดของแต่ละกระจุก ดังนี้

$$D(i, jk) = [Mj \,.\, D(I, j) + Mk \,.\, D(I, k)] \,/\, (Mj + Mk).$$

การรวมกันของสิ่งมีชีวิต 2 กลุ่ม ต้องใช้วิธีคำนวณระยะห่างของสิ่งมีชีวีตแต่ละตัว ในทั้ง 2 กลุ่มไปทีละคู่ และคำนวณค่าเฉลี่ย การคำนวณทางคณิตศาสตร์บอกว่าเทคนิคนี้มีความเหมาะสมที่สุดที่จะเป็นตัวแทนของลักษณะโครงสร้างต่าง ๆ ตามลำดับอนุกรมวิธาน (taxonomic structures) ของสิ่งมีชีวิต แต่มีข้อที่ไม่สะดวก คือต้องใช้เครื่องคอมพิวเตอร์ที่มีกำลังสูงมาก เนื่องจาก matrix distance ทุก ๆ ระยะ จะถูกนำมาคำนวณอีกครั้งในแต่ละระยะของขั้นตอน เช่น ถ้าจะศึกษาใน 100 ลักษณะ phenotypes ก็จะมีการคำนวณประมาณ 1500,000 ครั้งของระยะระหว่าง phenotype และถ้าจะศึกษา 1000 phenotypes ก็จะมีการคำนวณถึง 150,000,000 ครั้ง เป็นต้น

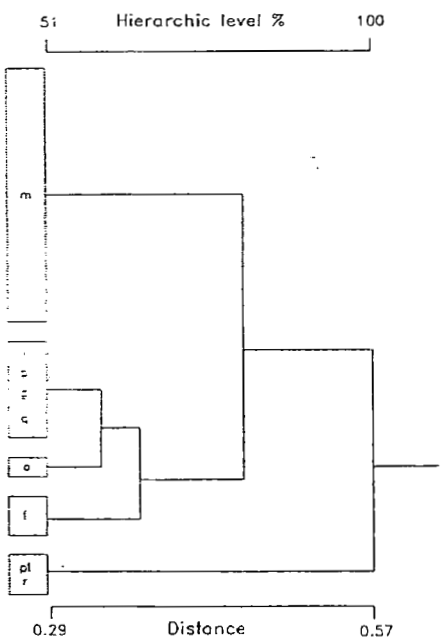


ภาพที่ 3 Cluster diagram ของ *Serratia rubidaea* (1) B2 biotype ที่ไม่มี pigment; (2) B1 biotype ที่สร้าง pigment; (3) B3 biotype ที่สร้าง pigment [ภาพจาก Bollet, C. et al. (1989) *Trop. Agric.* 66, 342-344a

การเป็นตัวแทน *(Representation)*

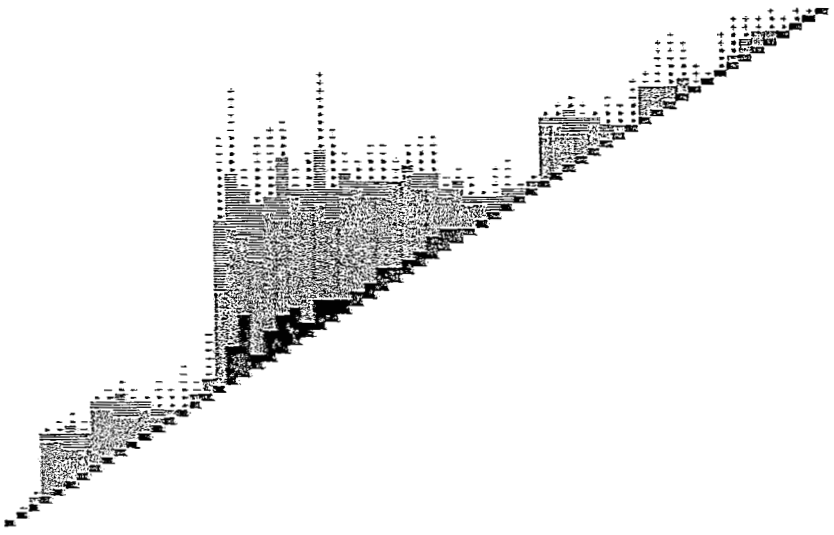
มี 2 diagrams ที่ใช้กันสำหรับเป็นตัวแทน คือ dendrogram และ similarity matrix

1. Dendrogram เป็น dendrogram ที่มีการจัดเรียง cluster ของสิ่งมีชีวิตที่ประสบผลดีมาก รวมทั้งแสดงให้เห็นถึงความกล้ชิดของสิ่งมีชีวิตในแต่ละ cluster ด้วย ในการสร้าง dendrogram จะต้องรู้ถึงจุดที่ตัดกันของ diagram โปรแกรมที่ใช้สร้างค่อนข้างซับซ้อนและต้องการ plotter ขนาดใหญ่ หลายอัน ถ้ามีจำนวน phenotype มาก Dendrogram ยังสามารถทำให้ง่ายขึ้นโดยรวมกลุ่ม ลักษณะ (phenotypes) เข้าด้วยกัน ที่ระดับความเหมือน (similarty) ที่กำหนดล่วงหน้า การคำนวณอย่างง่าย ๆจะทำให้มีการเรียงตามลำดับชั้นตามบระดัความเหมือนของสิ่งมีชีวิต ขึ้นกับระยะห่างของ phenotype



ภาพที่ 4 การทำ Hierachic cluster ของ *Serratia* จำนวน 720 strains โดยใช้ Jaccard-Sneath coefficient, และ จำแนกกลุ่ม cluster โดยวิธี UPGMA ตัด dendrogram ที่ hierarchic level ที่ 51% (dissimilarity 029) f= *S. ficaria;* g= *S. grimesii;* l= *S. liquefaciens;* m= *S. marescens;* o= *S. odorifera;* p= *S. proteamaculans;* pl= *S. plymuthica;* q= *S. quinovora;* r= *S. rubidaea* [จาก Bollet, C. (1988) *Ann. Inst. Pasteur/Microbiol.* 139, 337-349.]

2. Simlarity Matrix เป็นวิธีที่ซับซ้อนน้อยกว่า ซึ่งประกอบด้วยการเรียงตัวกันใหม่ของระยะห่างใน matrix ให้มีหลาย ๆกลุ่ม โดยทำให้แต่ละกลุ่มเป็น เฉดสีเทา สีเข้มน้อย หรือมาก ซึ่งทำให้เห็นชัดเจนว่าแต่ละ cluster สิ้นสุดที่ตรงไหน



ภาพที่ 5 Similarity matrix ของ *Bacillus* 66 strains จากโรงพยาบาล ความเข้มของแถบแรเงา แสดงถึงช่วงของ Similarity ดังนี้ สีขาว (ที่ว่าง) $S < 0.70$; +, $0.70 \leq S < 0.80$; *, $0.80 \leq S < 0.85$; , $0.85 \leq S$ 0.90; ▨ □ $0.90 \leq S < 0.95$; , ■ $95 \leq S$ 1.00.

เป็นที่ยอมรับโดยทั่วไป ว่าถ้าเป็นแบคทีเรีย จะถูกแยกความแตกต่างเป็นคนละชนิดที่ เปอร์เซ็นต์ Similarity 80-85 % โดยใช้ Jaccard-Sneath coefficient, และ จำแนกกลุ่ม cluster โดยวิธี UPGMA ยกเว้นแบคทีเรียในกลุ่มที่รู้จักดี เช่น *Enterobacteriaceae* และไม่เป็นที่ยอมรับในกลุ่มที่ไม่ค่อยรู้จักดี เช่น *Pseudomonas* และในแต่ละกรณีต้องมีการศึกษา DNA/DNA hybridization เพื่อยืนยันความถูกต้องด้วย

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

เนื่องจาก ในปีแรกผลการวิจัยในส่วนของแอคติโนมัยซีทในปีแรก มีความก้าวหน้าไปมาก ส่วนผลของการทดสอบสารออกฤทธิ์ยับยั้งที่สร้างจากราเอ็นโดไฟท์จากการวิจัยในปีแรก ไม่ได้ให้ผลที่น่าสนใจ มากพอ เนื่องจากให้สารออกฤทธิ์ในระดับต่ำในการยับยั้งราโรคพืช ไม่ว่าจะทดสอบกับการยับยั้งเชื้อ *C. gloeosporioide*, *A. brassicicola* หรือ *F. oxysporum* งานวิจัยในระยะปีที่สองนี้จึงได้ทำการเก็บตัวอย่างจากบริเวณป่าชายเลน อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี เพื่อแยกเชื้อ ราเอ็นโดไฟต์ทดแทน ด้วยอาหาร 2 ชนิด คืออาหาร PDAและอาหาร YM เพื่อค้นหาราเอ็นโดไฟท์ที่อาจพบสารออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ที่ดีกว่า และศึกษาความเหมาะสมในการสร้างสารออกฤทธิ์ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกัน รวมทั้งการจัดจำแนกชนิดของราเอ็นโดไฟท์และแอคติโนมัยที่ออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียหรือยีสต์

3.1 วิธีการแยกเชื้อราเอ็นโดไฟท์ จากใบพืชป่าชายเลน และการศึกษาการสร้างสารอกฤทธิ์

นำตัวอย่างใบพืชป่าชายเลนแต่ละชนิด มาล้างน้ำ เช็ดให้แห้ง แล้วฆ่าเชื้อภายนอกใบพืชด้วยอัลกอฮอล์ 70% เป็นเวลา 30 วินาที แล้วใช้กรรไกรที่ปราศจากเชื้อ ตัดใบพืชออกเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วนำไปวางบนจานอาหาร PDA และ YM (3 ซ้ำ) แล้วนำไปบ่มที่ 32 ° C เป็นเวลา 2-5 วัน ตรวจดูเชื้อราที่เจริญออกมาที่ด้านข้างขอบรอยตัดของชิ้นส่วนใบ แล้วนำไปทำให้เชื้อบริสุทธิ์ เก็บไว้ในอาหารวุ้นเพื่อนำไปทดสอบคุณสมบัติในการสร้างสารออกฤทธิ์ต่อไป ด้วยวิธี Cross streak technique โดยใช้ *Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis*, MRSA, และ *Candida albicans* เป็นเชื้อทดสอบ รวมทั้งนำเชื้อที่สร้างสารออกฤทธิ์ได้มาทดสอบการสร้างสารในอาหารที่แตกต่างกัน โดยเลี้ยงในอาหารเหลว เป็นเวลา 10 วัน แล้วจึงกรอง หรือ centrifuge เพื่อ แยกเซลล์ และ ส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อมาสกัดสารออกฤทธิ์ วัดความแตกต่างของปริมาณสารสกัดหยาบด้วยการชั่งน้ำหนักแห้ง

3.2 วิธีการทดสอบคุณลักษณะของแอคติโนมัยซีทในอาหาร ISP (International *Streptomyces* Project) ชนิดต่าง ๆ

แม้ว่า แอคติโนมัยซีท ที่สามารถส์ร้างสารออกฤทธิ์ได้ดีที่เลือกไว้จากการทำการวิจัยในปีแรก และได้ทดลองเลี้ยงปริมาณมากขึ้นในอาหารชนิดต่าง ๆ รวมทั้งได้สกัดสารออกฤทธิ์ และทำให้สารบริสุทธิ์บางส่วนด้วยวิธีทางโครมาโทกราฟี ก็ยังพบว่าแอคติโนมัยซีทที่เลือกไว้นี้ แม้จะสร้างสารออกฤทธิ์ได้ดี แต่เชื้อแต่ละสายพันธุ์ยังมีความไวต่อปัจจัยต่าง ๆ ทำให้การสร้างสารออกฤทธิ์นั้นเปลี่ยนไป ในแต่ละครั้งโดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อมีการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นจึงมีความสำคัญที่ต้องมีการทดลองเลี้ยงเชื้อในอาหารทดสอบชนิดต่าง ๆเพื่อดูคุณสมบัติในการเจริญรูปร่างลักษณะของเส้นใยและโครงสร้างของเส้นสายสปอร์ รวมทั้งสีของรงควัตถุ ที่เป็นได้ทั้งสารที่มีสีและสารออกฤทธิ์ชีวภาพ ด้วยอาหารที่ใช้ทดสอบเฉพาะแอคติโนมัยซีท โดยเลี้ยงเชื้อ (54-4, 54-5, A16-1, A1-3 และ 3-3)ให้เจริญ บนจานอาหาร ISP 2, ISP3, ISP4, ISP5 รวมทั้งอาหาร Actinomycete Isolation Agar บ่มที่อุณหภูมิ 30° C เป็นเวลา 7 วัน แล้วนำมาตรวจดูโครงสร้างของเส้นใย เส้นสายสปอร์ รงควัตถุที่สร้าง สีของกลุ่มสปอร์ (spore mass) สีของ Arial และ Substrate mycelium

3.3 ศึกษาคุณสมบัติทางเคมีของผนังเซลล์ และองค์ประกอบของน้ำตาลใน whole-cell hydrolysate

3.3. 1 วิธีการวิเคราะห์ชนิดของกรดไดอะมิโนไพมิลิค (Diaminopimelic acid,DAP)**ในองค์ประกอบของผนังเซลล์** (ตามวิธีของ Lechevalier and Lechevalier,1980; Ruan,1994)

วิธีการวิเคราะห์ชนิดของกรดไดอะมิโนไพมิลิคมีขั้นตอนดังนี้

1. เลี้ยงเซลล์แอคติโนมัยซีทด้วยอาหาร Bennett หรือ Glucose Yeast Extract โดยบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 32 ° C เป็นเวลา 5-6 วัน เก็บเซลล์ด้วยวิธีปั่นเหวี่ยง (centrifugation) ที่ 8000 rpm ใช้เวลา 8 นาที แล้วล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง

2. แช่เซลล์ไว้ในอัลกอฮอล์ 70 % 1 คืน ทิ้งไว้ให้แห้งบนกระดาษกรอง (พยายามอย่าให้เซลล์แห้งติดกระดาษกรอง)

3. นำเซลล์และเส้นใยปริมาณ 0.01 กรัม (น้ำหนักแห้ง) มาไฮโดรไลซ์ด้วยกรดไฮโดรคลอลิคเข้มข้น 6 N นำมาอบที่อุณหภูมิ 100 ° C 18 ชั่วโมง หรือนึ่งที่ความดัน15 ปอนด์/ตารางนิ้ว 15 นาที 2 ครั้ง แล้วทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง กรองกากเซลล์ทิ้งไป

4. นำสารละลายที่กรองได้มาระเหยให้แห้ง ล้างตะกอนที่แห้งแล้วด้วยน้ำกลั่น แล้วระเหยให้แห้งบน แผ่นความร้อน (hot plate) ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น ครั้งละ 3-4 หยด แล้วระเหยให้แห้ง ทำเช่นนี้อีก 2 ครั้งเพื่อล้างให้หมดกรด

5. นำส่วนของตะกอนที่แห้งติดก้นหลอด มาเติมด้วยน้ำกลั่น 0.3 มล. หรือประมาณ 3-4 หยด ขึ้นกับปริมาณสารที่ได้

6. ดูดสารประมาณ 20 ไมโครลิตรด้วย capillary tube (ถ้าสารเจือจางต้องใช้ปริมาตรมากขึ้น) นำมาจุดลงบนกระดาษโครมาโทกราฟีหรือแผ่น silica gel โดยมี สาร *meso*- DAP(หรือ *L*-DAP) ไกลซีน และไลซีน เป็นสารมาตรฐาน เตรียมสารละลายชะ (ในตู้ควัน) ซึ่งประกอบด้วย เมธานอล: น้ำ : กรดไฮโดรคลอลิคเข้มข้น 10 N: ไพริดีน ในอัตราส่วน 80: 17.5: 2.5: 10 โดยปริมาตร เทลงใน TLC tank ปิดฝา tank ให้สนิทโดยทาด้วยวาสลิน หรือ greese เพื่อไม่ให้สารละลายใน tank ระเหยไป ทิ้งไว้ให้สารละลายอิ่มตัวอย่างน้อย 2 ชั่วโมง ใช้เวลาชะประมาณ 2 ชั่วโมง

7. นำแผ่นโครมาโตแกรมออกมาผึ่งให้แห้งภายในตู้ควัน ตรวจดูตำแหน่งของสารโดย ฉีดพ่นด้วยสารละลายนินไฮดริน 0.2 % น้ำหนักต่อปริมาตรในสารละลายของบูทานอลที่อิ่มตัวด้วยน้ำ (water saturated n-butanol) ทิ้งให้แห้งสักครู่ จากนั้นจึงนำกระดาษไปอบที่ 100 ° C 5 นาที หรือจนกว่าจะเห็น spot ของสาร ใช้ดินสอวงตำแหน่งของสารไว้ วิเคราะห์ว่าแบคทีเรียแต่ละตัวอย่างพบ *meso*- DAP หรือ *L*- DAP ถ้าเป็น *meso*- DAP ค่า rf ของสารจะเท่ากับสารมาตรฐาน *L*- DAP จะถูกชะได้ไกลกว่า และให้ค่า rf ที่มากกว่าเล็กน้อย

3.3. 2 วิธีการวิเคราะห์หาชนิดของน้ำตาลในเซลล์ทั้งหมด (whole-cell hydrolysate)

(Lechevalier and Lechevalier,1980; Ruan,1994)

วิธีการวิเคราะห์หาชนิดของน้ำตาลที่ได้จากการย่อยสลายเซลล์ทั้งหมด มีขั้นตอนดังนี้

1. เลี้ยงเซลล์แอคติโนมัยซีทด้วยอาหาร Bennett หรือ Glucose Yeast Extract บ่มเชื้อที่ 32 ° C เป็นเวลา 5-6 วัน เก็บเซลล์ด้วยวิธีปั่นเหวี่ยง (Centrifugation) ที่ 8000 rpm 8 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง

2. แช่เซลล์ไว้ใน อัลกอฮอล์ 70 % 1 คืน ทิ้งไว้ให้แห้งบนกระดาษกรอง (พยายามอย่าให้เซลล์แห้งติดกระดาษ)

3. นำเซลล์และเส้นใยปริมาณ 50 มก. (น้ำหนักแห้ง) มาไฮโดรไลซ์ด้วยกรดซัลฟุริคเข้มข้น 1 N ปริมาตร 1 มล. ในอ่างน้ำเดือด 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง กรองกากเซลล์ทิ้งไป แล้วปรับ pH ของ filtrate ให้ได้ 5.0-5.5 ด้วยสารละลายแบเรียมไฮดรอกไซด์ ตั้งทิ้งไว้ให้ตะกอนสีขาวของแบเรียมซัลเฟตตกตะกอน นำส่วนใสข้างบนมาจุดลงบนแผ่น TLC (Silica gel 60) ในปริมาณ 20 ไมโครลิตร

4. ใช้น้ำตาลกาแลคโทส แมนโนส ไซโลส อะราบิโนส มาดูโรส ฟิวโคส ไรโบส และแรมโนส เป็นสารละลายมาตรฐาน

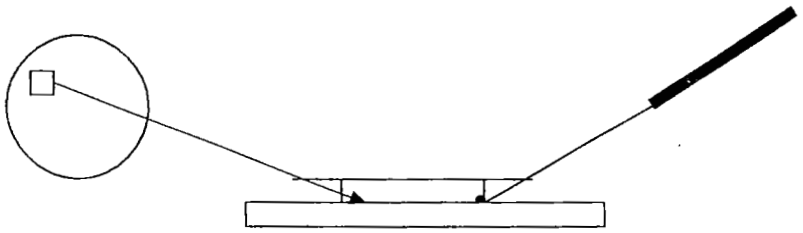
5. เตรียมสารละลายชะ (ในตู้ควัน) ซึ่งประกอบด้วย บิวทานอล : ไพริดีน : น้ำ : โทลูอีน ในอัตราส่วน 5 : 3 : 3 : 4 ใน TLC tank ปิดฝา tank ให้สนิทโดยทาด้วยวาสลิน หรือ greese เพื่อไม่ให้สารละลายใน tank ระเหยไป ทิ้งไว้ให้สารละลายอิ่มตัวอย่างน้อย 2 ชั่วโมง วางแผ่น silica gel 60 ที่มีสารแล้วลงไปอย่างระมัดระวัง โดยจับที่ขอบ ใช้เวลาในการชะประมาณ 2 ชั่วโมง

6. นำแผ่นโครมาโทแกรมออกมาผึ่งให้แห้งภายในตู้ควัน เมื่อ แผ่นโครมาโทแกรมแห้งแล้วฉีดพ่น ด้วยสารละลายกรดของ aniline phthalate (กรด phthalic 3.25 กรัม ในบูทานอลที่อิ่มตัวด้วยน้ำ 100 มล. และเติม aniline 2 มล.) ทิ้งให้แห้งสักครู่ แล้วนำแผ่นโครมาโทแกรมไปอบที่ 100 °C 5 นาที เพื่อตรวจดูตำแหน่งของสารที่เกิดขึ้น ใช้ดินสอวงตำแหน่งของสารไว้ นำมาวิเคราะห์ว่าแบคทีเรียชนิดนั้น ๆ พบน้ำตาลชนิดใดบ้าง

3.4 การจำแนกชนิดของเชื้อ เชื้อที่นำมาศึกษาคือ 54-4, 54-5, A16-1, A1-3 และ A3-3 โดยนำผลของการศึกษาทั้งลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยา ผลการตรวจสอบลักษณะเชื้อ เส้นสายสปอร์/ ลักษณะสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์/ และหรือ ด้วยกล้องอิเลคตรอน และผลของการจำแนกชนิดด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล ด้วยการหาลำดับเบสของ 16S rRNA gene ของเชื้อมาพิจารณาและวิเคราะห์ร่วมกัน

3.4.1 การศึกษาลักษณะรูปร่างทางสัณฐานวิทยา ลักษณะรูปร่างทางสัณฐานวิทยา ยังคงเป็นสิ่งจำเป็นในการบ่งบอกชนิดในระดับสกุล เช่นการสังเกตดูว่ามีหรือไม่มีสปอร์ที่เส้นใยใต้ผิวอาหาร ดูลักษณะของเส้นใยทั้งเหนือผิวอาหาร และใต้ผิวอาหาร รวมทั้งลักษณะของเส้นสายสปอร์ สีของเส้นใยและสีของกลุ่มสปอร์ รวมทั้งรงควัตถุที่สร้างขึ้น ซึ่งการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ทำได้โดย

1. ทำ Slide culture โดยการตัดชิ้นอาหารวุ้นเป็นชิ้นสี่เหลี่ยม แล้ววางบนแผ่นสไลด์ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ถ่ายเชื้อมาแตะที่ด้านข้างของชิ้นอาหาร แล้วปิดด้วยแผ่นกระจกสไลด์ที่ฆ่าเชื้อแล้ว บ่มในตู้บ่มที่มีความชื้น หรือจานเพาะเชื้อที่มีสำลีชุบน้ำ (ฆ่าเชื้อแล้ว) เพื่อให้ความชื้น เมื่อเชื้อเจริญแล้วสามารถส่องดูลักษณะเส้นสายสปอร์ เส้นใยใต้ผิวอาหารและเหนืออาหารได้โดยตรงภายใต้กล้องจุลทรรศน์



ภาพที่ 6 เทคนิคการทำ slide culture เพื่อสังเกตการเจริญของเชื้อที่ขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อและที่กระจกปิดสไลด์

3.4.2 การศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน ด้วยวิธีนี้ จะสามารถเห็นโครงสร้างขนาดเล็กที่ไม่อาจเห็นได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา เนื่องจากสามารถขยายขนาดได้ตั้งแต่ 1000 X เท่า ขึ้นไป จนถึง 10,000 เท่าหรือมากกว่า ซึ่งจะทำให้เห็นลักษณะรูปร่างของสปอร์ ผิวของสปอร์ ก้านชูสปอร์ ลักษณะของเส้นใย อับสปอร์ (ถ้ามี) รวมทั้งรูปร่างลักษณะของเซลล์ ทั้งที่ยังเจริญไม่เต็มที่ และที่เจริญเต็มที่ เป็นต้น

ขั้นตอน วิธีการเตรียมตัวอย่างก่อนนำไปส่องกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนมีดังนี้

1. เลี้ยงเชื้อที่จะศึกษาบน อาหาร ISP2 ที่ 30°C เป็นเวลา 3-7 วัน หรือจนกว่าที่มีการสร้างสปอร์ที่เจริญเต็มที่
2. ใช้มีดที่ ฆ่าเชื้อด้วยอัลกอฮอล์ ตัดชิ้นส่วนของเชื้อที่เจริญบนจานอาหาร ขนาด 5x5 มม. พยายามตัดชิ้นส่วนของ agar ออกให้มากที่สุดเท่าที่จะมากได้ แล้ววางโลโลนีที่จะส่องดู ไว้บนแผ่น อลูมิเนียมฟอล์ย ที่ตัดเป็นรูป กากบาด แล้วพับปลายแผ่นฟอล์ยเข้าหากันเพื่อห่อโคโลนีไว้
3. ใส่ ตัวอย่างโลโลนีเชื้อที่จะส่อง ในข้อ 2 ลงใน Eppendorf tube แล้วเติม 2.5% Glutaraldehyde เพื่อแช่ไว้ 1 คืน ในที่มืด(อาจหุ้มด้วย ฟอล์ย
4. ล้างตัวอย่างด้วย ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (Na_2HPO_4 4.092 g, NaH_2PO_4 1.519 g, deionized water pH 7.0 200 ml) 15 นาที (ทำ2 ครั้ง)
5. ล้างตัวอย่างโคโลนีด้วย เอธานอล 30%, 50, &0%, 85%, 95% และ 100% อย่างละ 5 นาที โดยทำซ้ำ ในแต่ละเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้น
6. แช่ตัวอย่างไว้ที่ -40 °C แล้วจึงนำไปทำให้แห้ง ภายใต้สุญญากาศ
7. นำตัวอย่างไป coat ด้วยทองคำ ในเครื่อง Sputter coater
8. นำตัวอย่างมาติดบน stub แล้วนำไปส่องดูด้วยกล้อง Scanning electron microscope บันทึกภาพที่ได้ลงในแผ่น CD หรือ flash drive

3.4.3 การศึกษาลำดับเบส ของ 16S rDNA ยีน

1. PCR Amplification ของ 16S rDNA

เตรียม DNA template โดยใช้ Genomic DNA mini kit (Geneaid Biotech Ltd., Taiwan) DNA ที่ coding สำหรับบริเวณ 16S rRNA จะถูกเพิ่มปริมาณมากขึ้นโดยวิธีของ PCR ด้วย *Taq* polymerase ตามที่อธิบายโดย Kawasaki et al. (1993), Yamada et al. (2000) และ Katsura et al. (2001) PCR product ที่จะหาลำดับเบส เตรียมโดยการใช้ primer 2 ชนิด คือ 20F (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCA G-3' ที่ตำแหน่ง 9-27 ของ 16S rDNA และ 1500R (5'-GTT ACCTTGTTACGACTT-3' ที่ตำแหน่ง 1509-1492 บน 16S rDNA (Brosius et al., 1981) โดย run ด้วยเครื่อง Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories) โดยใช้ Reaction mixure ปริมาณ 100 µl

2. วิธีการหาลำดับเบส ของ 16S rDNA (แอคติโนมัยซีท)

การหาลำดับเบสของ 16S rDNA ของ PCR Product ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว ทำได้โดยใช้ Terminator Ready Reaction Cycle Sequensing Kit (Version 3.1) โดยใช้ Primer 2 ชนิด คือ 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') และ Primer 800R (5'-TAC CAG GGT ATC TAA TCC-3') สำหรับการหาลำดับเบสบางส่วน และใช้ Primer เพิ่มอีก 2 ชนิด คือ 518F (5'CCA GCA GCC GCG GTA ATA CG-3') และ 1492R (5'TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3') สำหรับการหาลำดับเบสตลอดทั้งสาย (full length) ซึ่ง 10 µl ของส่วนผสมของปฏิกิริยาของการหาลำดับเบส ประกอบด้วย 5-20 ng ของ DNA template, 2.0 µl ของ BigDye™ Terminator ready reaction

mixture, 1.6 pmole ของ sequencing primer, 1.5 µl ของ 5X BigDye™ sequencing buffer และ น้ำ (deionized water) และ ปฏิกิริยา PCR กระทำตามลำดับดังนี้

เริ่มต้น	96 °C	30 วินาที
และ 25 รอบของ		
Denature	96 °C	10 วินาที
Annealing	50 °C	5 วินาที
Elongation	60 °C	4 นาที

แล้วเติมสารละลาย ethanol/acetate ที่เตรียมใหม่ 80 µl ลงใน sequencing reaction mixture (ใน 1.5 ml microcentrifuge tube) ผสมให้เข้ากันด้วย vortex ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที แล้วนำไป centrifuge ที่ 14,500 rpm 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนที่เป็น ethanol ทิ้งไปทันทีด้วยปลายทิปขนาดเล็ก แล้วล้าง DNA ด้วยการเติม 70% ethanol 250 µl ลงใน tube ผสมให้เข้ากัน (vortex) เก็บตะกอนของ DNA โดย centrifuge 5 นาทีที่ความเร็วสูงสุด (14,500 rpm) ดูด ethanol ที่เหลือทิ้งไปด้วยปลายทิป ทำ DNA ที่ได้ให้แห้งบน heat box ที่ 90 °C 1 นาที แล้วเก็บไว้ที่ 4 °C หรือ -20 °C DNA pelletes จะแขวนลอยอยู่ใน 20 µl ของ terminator sequencing reagent ผสมให้เข้ากัน แล้วปั่น spin down สาย DNA เส้นคู่จะถูกแยกตัวออกอย่างสมบูรณ์โดยนำไปผ่านความร้อนที่ 95 °C 2 นาที แล้ววางลงในน้ำแข็งทันที จนกว่าจะนำไป load ลงบนเครื่อง sequencer.

3. การวิเคราะห์ลำดับเบส DNA

ลำดับเบสของนิวคลีโอไทด์ จากทุก ๆ primer จะถูกรวบรวมและนำมาเชื่อมต่อกันโดยใช้ Assembly Program (http://www.mbio.ncsu.edu/Bioedit/Bioedit.htm) การจำแนกชนิดของเชื้อ แต่ละชนิด กระทำโดยการนำเอาลำดับเบสที่ได้มาเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับเบสของเชื้อแอคติโนมัยซีทอื่น ๆใน GenBank โดยวิธีการ BLAST (Altschul et al., 1997) and megaBLAST (Zhang et al., 2000) Programs และประมาณ 50 sequences ของเชื้อที่มีคะแนนของค่าความเหมือน จากการคำนวณ sequence similarity ของเส้น นิวคลีโอไทด์ที่นำมาเข้าคู่กัน โดยใช้ EzTaxon server (http://www.eztaxon.org/; Chun et al., 2007)

4. วิธีการวิเคราะห์ Phylogenetic Tree

ลำดับเบสของนิวคลีโอไทด์ที่ได้ และจาก database จะถูกนำมาเรียงตัวกันด้วยโปรแกรม CLUSTAL X (version 18) (Thomson et al., 1997) ในโปรแกรม BioEdit (Hall, 1999) ช่องว่างที่เกิดขึ้น รวมทั้ง base ที่ไม่สามารถระบุชนิดได้จะถูกตัดทิ้งไป ระยะห่างของวิวัฒนาการจะถูกคำนวณโดยการใช้วิธีของ (Maximum Composite Likelihood) (Tamura, et al., 200) แผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) ของ 16S rRNA ยีนของแอคติโนมัยซีทที่นำมาศึกษา จะถูกสร้างขึ้นโดยวิธี Neighbor –joining method) ของ Saitou and Nei (1987)
ความแข็งแรงของกิ่งแขนงของเชื้อแต่ละชนิด จะถูกประเมินโดยวิธี bootstrap ที่ 1000 replications (Felsenstein, 1985) ด้วยโปรแกรม MEGA Version 5.0 (Tamura et al., 2007)

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

3.4.4 การศึกษาลำดับเบส ของ บริเวณ D1/D2 บน 23S rDNA ยีน (ราเอ็นโดไฟท์)

ทำการสกัด DNA ของราเอ็นโดไฟท์ ที่สร้างสารออกฤทธิ์ได้ดี ด้วยชุดสกัด DNA เพื่อศึกษาลำดับเบสของยีน บริเวณ D1/D2 บน 26S ribosomal DNA ตามภาพที่ 3 นำ DNA ที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณโดยวิธี PCR และ หาลำดับเบสของเส้นสาย DNA ในทำนองเดียวกันกับของแบคทีเรีย เว้นแต่ จำนวนรอบของแต่ละ cycle ในการทำ PCR และ primer

ภาพที่ 7 ไดอะแกรม แสดงตำแหน่งต่าง ๆ ของ rDNA locus ในเชื้อรา

DNA ที่ถูกเพิ่มปริมาณ รวมทั้ง ITS1, 5.8S และ ITS2 ของ rDNA การเพิ่มปริมาณทำในส่วนผสมของปฏิกิริยา ปริมาตร 50 µl ซึ่งประกอบด้วย 10mM Tris-HCl (pH 9.0), 50 mM KCl, 01% TritonX 100, 2 mM $MgCl_2$ 0.2 mM dNTPs, 0.4µM primers, 0.5 unit ของ Taq polymerase และ 2 µl genomic DNA ของรา ส่วน PCR Condition ของการเพิ่มปริมาณ DNA ในราเอ็นโดไฟท์ จะใช้ตาม condition ข้างล่างนี้:

Predenaturaton	ที่ 94	°C	5 .นาที
และ 30 รอบ ของ			
Denature	ที่ 94	°C	30 วินาที
Annealing	ที่ 55	°C	30 วินาที
Extension	ที่ 72	°C	30 วินาที
และ final extension	ที่ 72	°C	7 นาที

3.4.5 ศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของแอคติโนมัยซีท ที่สร้างสารแอนติไบโอติก

ในกรณีที่พบเชื้อสายพันธุ์ใหม่จากผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA/ 28S rRNA จะนำเชื้อสายพันธุ์ใหม่ดังกล่าวมาทำการศึกษาลักษณะทางจีโนไทป์ (genotypic characterization) เพื่อใช้เป็นแม่พิมพ์ในการเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ทำการเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA โดยใช้เทคนิคโพลีเมอเรส รีแอคชั่น (Polymerase chain reaction) หาลำดับเบสของยีน 16S rRNA ที่ได้โดยใช้เครื่อง ABI automated DNA sequencer แล้วเชื่อมต่อลำดับเบสของยีน 16S rRNA ที่ได้ให้สมบูรณ์ และทำ sequence alignment ของยีน 16S rRNA/ 28S rRNA ด้วยโปรแกรม Phydit และสร้างแผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเชื้อ

579.1751
5377ก
2535
ฉ.3
337541

บทที่ 4 ผลการวิจัย

จากการเก็บตัวอย่างใบจากพืชป่าชายเลน ณ. ตำบล เสม็ด อำเภอเมือง ในจังหวัดชลบุรี จำนวน 9 ตัวอย่าง จากพืชป่าชายเลนต่อไปนี้

ตัวอย่างที่ 1 โพทะเล (*Thespesia populneoides*(Roxb) Kostel

ตัวอย่างที่ 2 ตะบูนดำ (*Xylocarpus granatum*)

ตัวอย่างที่ 3 โกงกางใบเล็ก (*Rhizophora apiculata* BL)

ตัวอย่างที่ 4 สักขี (*Dalbergia candenatensis* (Dennst) Prain)

ตัวอย่างที่ 5 ฝาดดอกขาว (*Lumnitzera nacemosa*)

ตัวอย่างที่ 6 โกงกางใบใหญ่ (*Rhizophora macronata*)

ตัวอย่างที่ 7 โปรงขาว (*Ceriops Decanolra*)

ตัวอย่างที่ 8 ปอทะเล (*Hibiscus tilliaceus*)

ตัวอย่างที่ 9 ไม่ทราบชื่อ (Unknown species) ลักษณะใบ ออกตรงกันข้าม ปลายใบแหลม โคนก้านใบมีใบเล็ก ปลายแหลมอีกคู่หนึ่ง ออกตรงกันข้าม

ตารางที่ 4 เชื้อราเอ็นโดไฟท์ที่แยกได้จากป่าชายเลน ในจังหวัดชลบุรี และฤทธิ์ชีวภาพยับยั้งจุลินทรีย์ที่ตรวจพบ

Isolate ID	Color of aerial/ substrate	Spore/mycelium type	Antibiosis to			
			S. aureus	*B. subtilis*	MRSA 21	*C. albicans*
ISP2 medium						
CD7-1	Cw					
CD7-2	C		-			
CD7-3	Cw		-			
CD7-13	LBn		-			
DC4-1	BG		-		5.0 mm	
DC4-3	BG	'	-	5.0 mm	6.0 mm	
DC4-4	GB	'	-	4.5 mm		
DC4-5	BG	'	-	-	6.0 mm	
DC4-6	BG		-	-	3.0 mm	-
DC4-1	BG	'	-		5.0 mm	
DC4-3	BG	'	-	-	6.0 mm	
DC4-10	B		-	-		
DC4-1	W		-		-	
DC4-12	B	'	-	-		
HT8-11	W	'	-	-		

HT8-12	W		-	-	-	-
HT8-13	CW		-	-	-	-
LW5-2	CW		-	-	-	-
LW5-4	YW		-	-	-	-
LW5-5	W		-	-	-	-
LW5-7	GnB		-	-	-	-
LW5-13	GnB		-	-	-	-
LW5-16	W		-	-	-	-
LW5-17	GnB		-	-	-	-
LW5-22	W		-	-	-	-
LW5-24	GnB		22 mm	25 mm	35 mm	-
LW5-27	GnW		0.5 mm	1.0 mm	-	-
LW5-28	W		21 mm	25 mm	35 mm	-
LR7-2	CW		-	-	-	-
LR7-4	CW		-	-	-	-
LR7-7	GB		-	-	-	-
LR7-13	GB		-	-	-	-
LR7-16	GB		-	-	-	-
LR7-17	GB		-	-	-	-
LR7-24	W		21.0 mm	25.0 mm	30.0 mm	-
RA2-1	C		-	6.0 mm	5.0 mm	7.0 mm
RA2-3	C		-	7.0 mm	7.0 mm	4.0 mm
RM9-11	GyGnR		-	22.0 mm	22.0 mm	30.0 mm
RM9-12	Gy		-	-	-	-
RM9-14	Bn		-	-	-	-
RM9-15	C		-	-	-	-
RM9-16	Gy		-	-	-	-
RM9-17	B		-	-	-	-
TP3-3	C		-	-	-	-
TP3-4	CW		-	-	-	-
TP3-8	BWC		-	-	-	-
TP3-17	YW		-	-	-	-
TP3-22	C		-	-	20.0 mm	15.0 mm
UN6-2	CW		-	-	-	-
UN6-12	Gy		-	-	8.5 mm	-

UN6-13	GyB		-	-	-	15.0 mm
UN6-14	W		-	-	-	-
UN6-17	W		-	20.0 mm	23.0 mm	35.0 mm
UN6-18	WGn		-	-	-	-
XG2-2	BGy		-	-	-	-
XG2-3	GyBn		-	-	-	-
XG2-3	Gy		-	-	-	-
XG2-6	BGy		40.0 mm	40.0 mm	-	-
YM medium	-			-		-
DC4-1	GnB		-	-	5.0 mm	-
DC4-2	BGy		-	-	3.5 mm	-
DC4-4	BGy		-	-	3.0 mm	-
DC4-9	BGy		-	-	20.0 mm	-
LR7-24	CW		-	-	5.0 mm	-
RM9-11	-		-	12.0 mm	10.0 mm	-

ได้เลือกเชื้อราเอ็นโดไฟท์ 7 ไอโซเลตที่สร้างสารออกฤทธิ์ที่ดี มาทดสอบสภาวะเหมาะสมในการสร้างสารออกฤทธิ์ ด้วยอาหารที่แตกต่างกัน 3 ชนิด คือ อาหาร YM (Yeast Malt) อาหาร PDB(Potato Dextrose Broth) และอาหาร Oat meal โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 °C ระยะเวลา 10 วัน กรองหรือ centrifuge เพื่อแยกส่วนของเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ สกัดสารจากอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย Ethyl acetate หรือ solvent ที่เหมาะสม และจากเซลล์ด้วย methanol ได้ผลดังตารางที่ 2

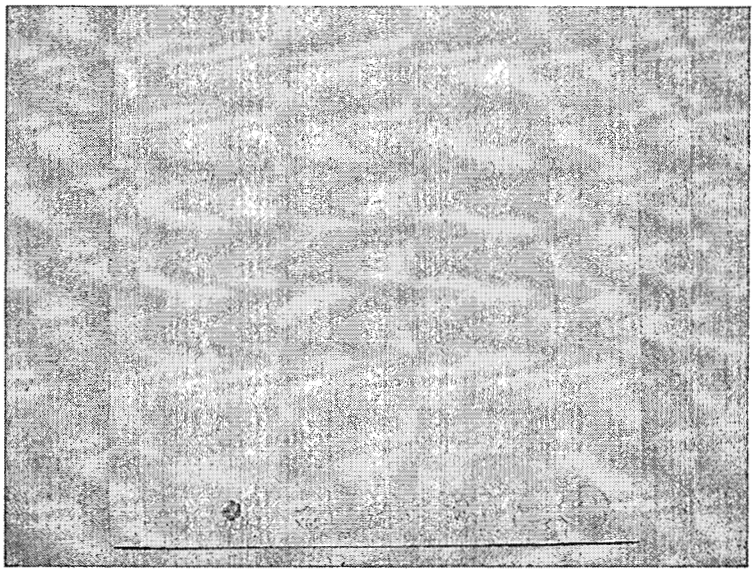
a. DC4-1 b. UN6-13 c. XG2-6

ภาพที่ 8 เชื้อราเอ็นโดไฟท์ที่แยกจากใบพืชป่าชายเลน a, จากต้นสักขี b.,จากพืชป่าชายเลนไม่ทราบชื่อ c., จากต้นตะบูนดำ

ตารางที่ 5 ผลการสกัดสารออกฤทธิ์จากส่วนของเซลล์ และอาหารเลี้ยงเชื้อ ของไอโซเลต DC 4-5, DC4-1, RM 9-11, UN 6-12, UN6-13, RA 2-1 และ XG 2-6 ได้ปริมาณสารแตกต่างกัน

Isolate ID	อาหาร YM (g/250ml)		อาหาร PDA (g/250ml)		อาหาร Oat meal
	จากcell	จาก medium	จากcell	จาก medium	(g/250ml) จาก medium
DC4-1	0.01	-	0.02	น้อย	0.002
DC4-1		0.01	-	-	0.013
RM9-11	0.011	0.001	0.023	น้อย	-
UN6-12	-	-	0.049	-	0.034
UN6-13	Cell ไม่แห้ง		0.035	น้อย	0.034
RM2-1	Cell ไม่แห้ง	น้อยมาก	0.029	-	0.032
XG2-6	0.01	-	0.029	-	0.058

เมื่อได้นำสารสกัดหยาบของสารออกฤทธิ์ของเชื้อราเอ็นโดไฟท์ แต่ละชนิดที่สกัดได้มาแยกเบื้องต้นด้วย Thin Layer Chromatography (siliga gel 60) ใน Chloroform: methanol =9:1 ได้ผลดังในภาพที่ 9



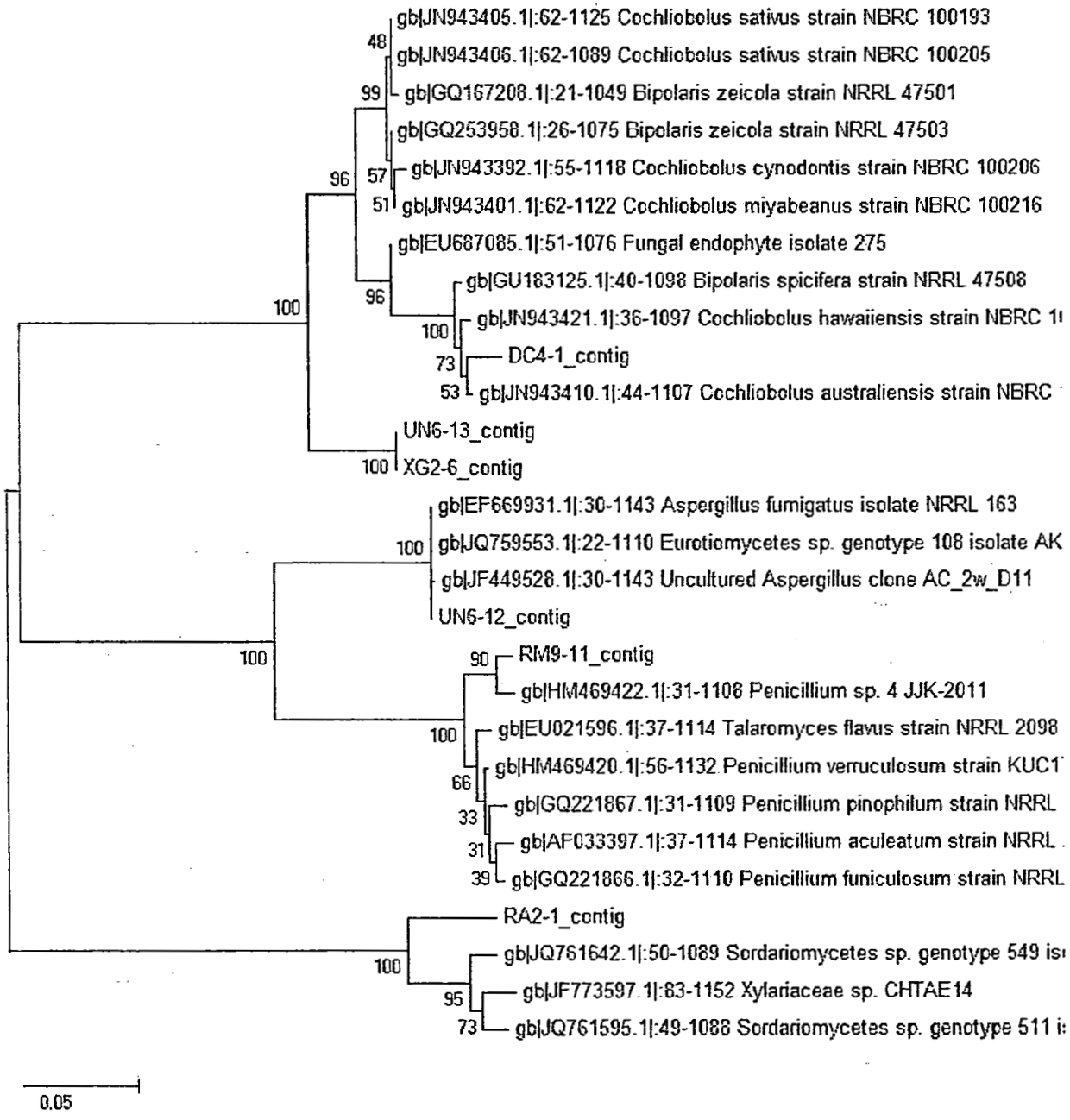
ภาพที่ 9 สารสกัดหยาบ จากเชื้อราเอ็นโดไฟท์ที่สร้างสารออกฤทธิ์ บนแผ่นโครมาโทแกรม (silica gel 60)

ได้คัดเลือก ราเอ็นโดไฟท์ที่สร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งทั้งเชื้อแบคทีเรีย และยีสต์ *Candida albcans* มาสกัด DNA และ ศึกษาลำดับเบส ของ 26S rRNA ยีน (ใช้บริการวิเคราะห์ลำดับเบสจาก บริษัท Macrogen เกาหลี) เพื่อจำแนกชนิด จำนวน 6 สายพันธุ์ คือ DC4-1, RA2-1, RM9-11, UN6-12, UN6-13 และ X G2-6 ได้ผลตามตารางที่ 3 สรุปได้ดังนี้ (ดูภาคผนวกประกอบ)

ตารางที่ 6 ผลของการจำแนกชนิดราเอ็นโดไฟท์ ที่สร้างสารออกฤทธิ์ชีวภาพที่ดี ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล

Isolate ID	ใกล้เคียงมากที่สุดกับ	% Similarity	length
DC4-1	*Cochliobolus hawaiiensis*	98%	1122
	Cochliobolus australiensis	97%	1124
	Bipolaris spicifera strain NRRL 47508	97%	1115
RA2-1	*Xylariaceae* sp.	94%	1155
	Sordariomycetes sp. Genotype 549 isolate NC 0992	95%	1089
	Sordariomycetes sp. Genotype 511 Isolate NC0607	95%	1098
RM9-11	*Penicillium* sp. 4JJK 2011	94%	1108
	Penicillium verruculosum strain KUC 1794	97%	1436
UN6-12	*Aspergillus fumigatus*	99%	1154
	Eurotiomycetes sp. Genotype108 Isolate AK1211	99%	1110
UN6-13	*Cochliobolus cynodontis* strain NBRC 9793	94 %	1125
	Cochliobolus sativus NBRC 100193	95%	1142
	Cochliobolus cynodontis strain NBRC 100206	94%	1118
	Cochliobolus cynodontis strain NBRC100207	94%	1130
XG2-6	*Bipolaris zeicola* NRRL 47506	94%	1098

และได้นำเอา ลำดับเบสของ rRNA gene ของเชื้อราแต่ละชนิดที่ศึกษาได้มาสร้างแผนภูมิต้นไม้เพื่อแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ โดยโปรแกรม Phydit (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 10 แผนภูมิต้นไม้ ของราเอ็นโดไฟท์ ที่ให้สารออกฤทธิ์ชีวภาพ DC4-1, RA2-1, RM9-11, UN6-12, UN6-13 และ X G2-6

แอคติโนมัยซีท

1. การศึกษาคุณสมบัติทางเคมีของผนังเซลล์ และ ชนิดของน้ำตาล

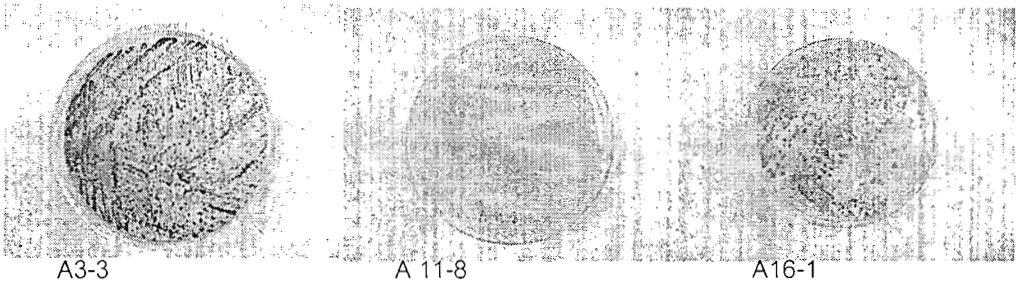
ผลของการศึกษาคุณสมบัติทางเคมีของผนังเซลล์ และ ชนิดของน้ำตาลใน whole-cell hydrolysates รวมทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางประการ ของเชื้อที่ได้นำมาศึกษาได้ผลดังในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 คุณสมบัติทางเคมีของผนังเซลล์ ชนิดของน้ำตาลใน whole-cell hydrolysates และลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางประการของแอคติโนมัยซีทที่สร้างสารออกฤทธิ์ที่ดี

Isolate ID	สีของ spore mass	สีของ reverse mycelia	ลักษณะของ spore chain	ชนิดของ DAP	ชนิดของน้ำตาล
A1-3	เทาแดง	เทาแดง	spirale	*L*-DAP	ไม่มี
A3-3	เทาแดง	น้ำตาลแดง	Spirale,	*L*-DAP	ไม่มี
A11-8	ขาวเทา	เหลือง	Rectiflexibile, spirale	*L*-DAP	ไม่มี
A16-1	แดง	แดง	spirale	*L*-DAP	ไม่มี
A19-5	เทาน้ำตาล	น้ำตาลแดง	rectiflexibile	*L*-DAP	ไม่มี
CH 54-4	แดง	แดง	rectiflexibile	*L*-DAP	ไม่มี

2. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

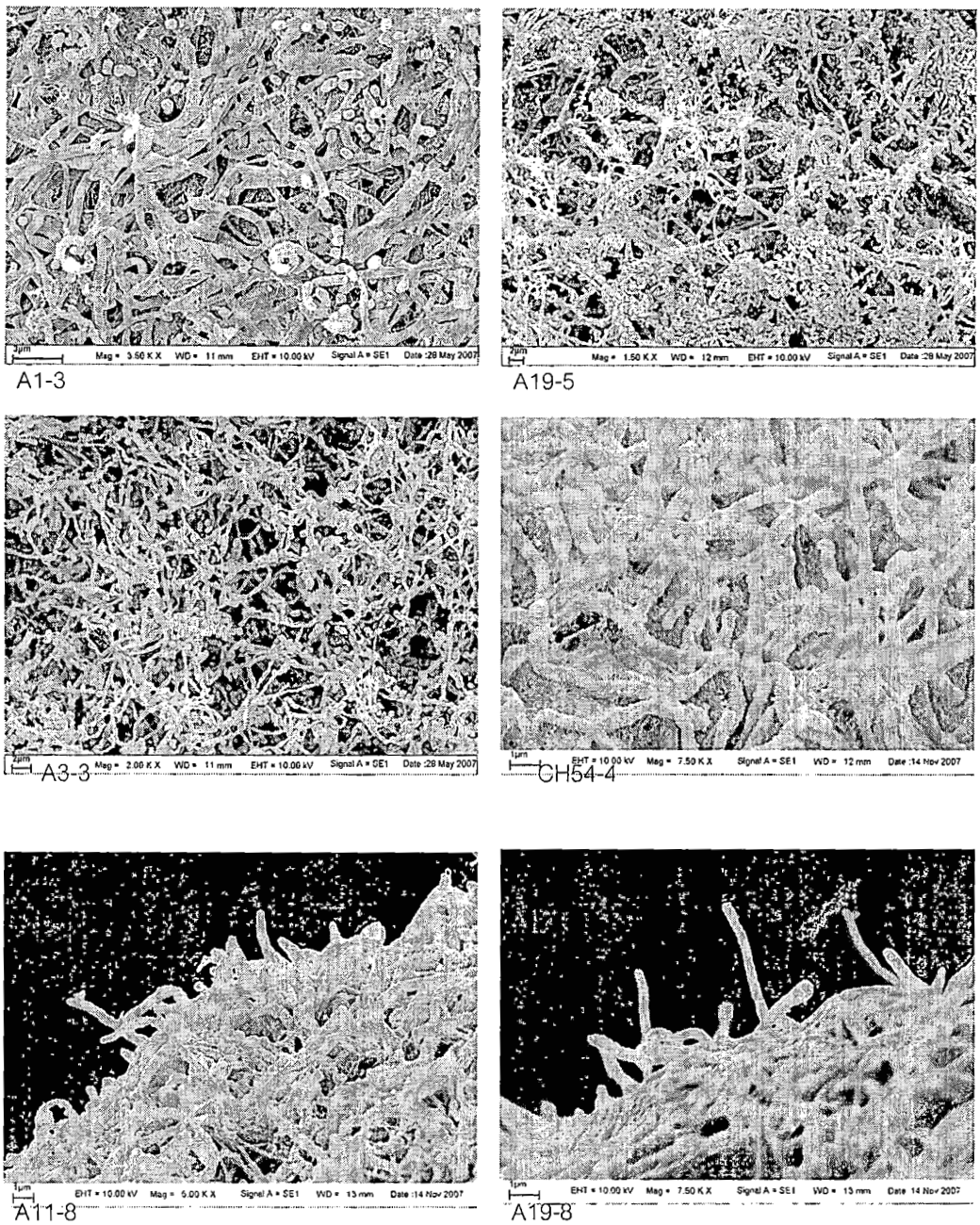
ได้ศึกษาลักษณะสีของ aerial และ substrate mycelium, สี ของ spore mass, รูปร่างลักษณะของ spore chain ทั้งภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (light microscope) และกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน รวมทั้งลักษณะการเจริญในอาหารชนิดต่าง ๆ (ดูตารางที่ 8)



A3-3 A 11-8 A16-1

ภาพที่ 11 แอคติโนมัยซีท A3-3, A 11-8 และ A16-1 บนจานอาหาร ISP2 อายุ 5 วัน

จากการศึกษารูปร่างลักษณะของเส้นใยและเส้นสายสปอร์ ของแอคติโนมัยซีทที่เลือกมาศึกษา พบว่า แอคติโนมัยซีท A1-3, A3-3 เส้นสายสปอร์มีลักษณะเป็นเกลียว A19-5, A11-8 และ A 11-9 มีลักษณะเป็นตรงสั้นจนถึงยาว (Rectiflexibile) ดังภาพที่ 12



ภาพที่ 12 ภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน ของ A1-3, A19-5, A3-3, CH54-4, A11-8, A19-8 ที่เลี้ยงด้วยอาหาร ISP2 ที่ 30 ° C เป็นเวลา 1 สัปดาห์

ตารางที่ 8 การศึกษาการเจริญบนอาหารชนิดต่างๆ ของแอคติโนมัยซีทที่สร้างสารออกฤทธิ์

Isolate No	Actinomycete Isolation Agar	ISP2	ISP3 (Oat Meal Agar)	Glucose-Yeast Extract Agar
A1-3	เจริญปานกลาง Aerial mycelium สีม่วงน้ำตาล Substrate สีม่วงน้ำตาล	เจริญปานกลาง Aerial mycelium สีเทาแดง Substrate สีน้ำตาลแดง	เจริญปานกลาง Aerial mycelium สีน้ำตาลชมพู Substrate น้ำตาลชมพู	เจริญปานกลาง Aerial mycelium น้ำตาลชมพูอ่อน Substrateน้ำตาลชมพูอ่อน
A3-3	เจริญปานกลาง Aerial mycelium สีม่วงอ่อน Substrate สีม่วงเข้ม	เจริญดีมาก Spore mass สีขาวเทา Substrate สีแดงเข้ม	เจริญดีมาก Spore mass สีเทา Substrate สีแดง	เจริญปานกลาง Spore mass สีขาวเทา Substrate สีเหลือง
A19-5	เจริญปานกลาง ไม่มี aerial mycelium Substrate สีครีม	เจริญดีมาก Spore mass สีขาวเทา Substrate สีแดงน้ำตาลเข้ม	เจริญดีมาก Spore mass สีเทา Substrate สีแดงเข้ม	เจริญปานกลาง Spore mass สีน้ำตาล Substrate สีน้ำตาล
A16-1	เจริญปานกลาง ไม่มี aerial mycelium Substrate สีม่วงแดง	เจริญดีมาก Spore mass ชมพูแดง Substrate สีชมพูแดง	เจริญดีมาก Spore mass ขาวชมพู Substrate สีส้มแดง	ไม่เจริญ
A19-5	เจริญปานกลาง ไม่มี aerial mycelium Substrate สีครีม	เจริญดีมาก Spore mass สีขาวเทา Substrate ชมพูน้ำตาล	เจริญดีมาก Spore mass ชมพู Substrate สีแดง	เจริญปานกลาง ไม่มี aerial mycelium Substrate สีเหลืองอ่อน
A16-1	เจริญดีมาก Spore mass สีขาวเทา Substrate สีเขียว	เจริญดีมาก Spore mass สีเทาเขียว Substrate สีเขียว	เจริญดีมาก Spore mass สีเทาเขียว Substrate สีเทา	เจริญปานกลาง Spore mass สีขาวเทา Substrate สีเหลืองอ่อน

3. การจำแนกชนิดด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล

(ใช้บริการการวิเคราะห์จาก Biotec Thailand ทั้งหมด) ได้ผลดังตารางที่ 6-10) โดย ส่งเชื้อไปวิเคราะห์ลำดับเบสทั้งหมด 7 เชื้อ คือ CH 54-4, CH54-5, A1-3, A3-3, A16-1, C17-1 และ C17-5 พบว่า CH54-4 และ CH 54-5 มีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces thermocarboxydus*, และมีความใกล้เคียงกับ A16-1 แอคติโนมัยซีท A1-3 และ A3-3มีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces indiaensis* แอคติโนมัยซีท A16-1,แม้จะมี % similarity ใกล้เคียงกับ *Streptomyces indiaensis* มากกว่า แต่ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสปอร์ ผิวสปอร์ จากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนมีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces spinoverrucosus* มากกว่า ส่วน แอคติโนมัยซีท C17-1 มีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces diastaticus*

ตารางที่ 9 ผลการจำแนกชนิดของ แอคติโนมัยซีท A16-1 เมื่อได้เปรียบเทียบกับลำดับเบสที่มีอยู่ใน GenBank แล้ว พบว่ามีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces indiaensis* 99.101 %

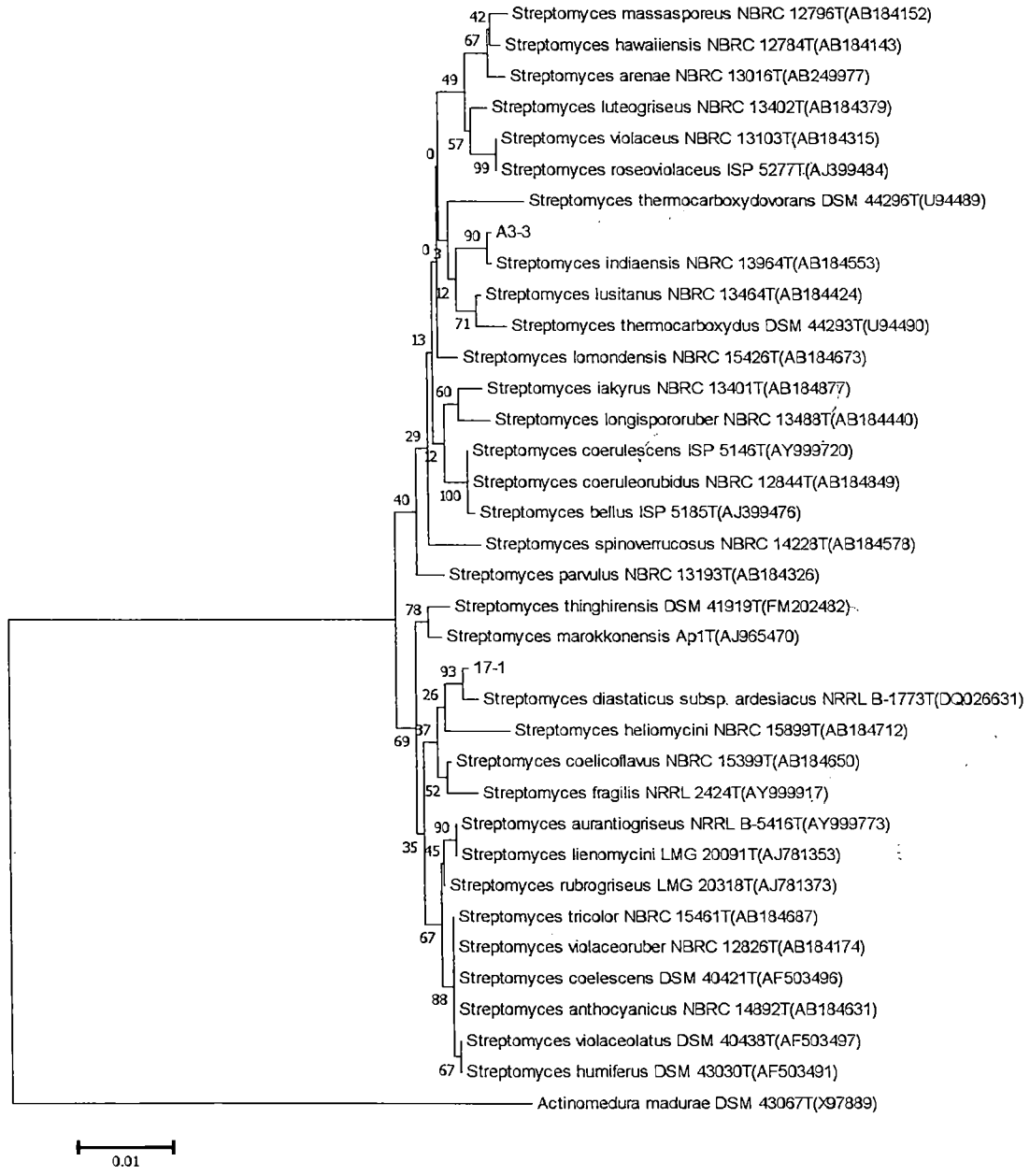
Rank	Name/Title	Authors	Strain	Accession	Pairwise Similarity	Diff/Total nt	megaBLAST score	BLASTN score	Tasks
1	Streptomyces indiaensis	(Gupta 1965) Kudo and Seino 1987	NBRC 13964(T)	AB184553	99.101	13/1446	2739	2692	
2	Streptomyces thermocarboxydus	Kim et al. 1998	DSM 44293(T)	U94490	98.964	15/1448	2720	2680	
3	Streptomyces purpurascens	Lindenbein 1952	NBRC 13077(T)	AB184859	98.963	15/1446	2716	2676	
4	Streptomyces spinoverrucosus	Diab and Al-Gounaim 1982	NBRC 14228(T)	AB184578	98.961	15/1444	2696	2650	
5	Streptomyces lusitanus	Villax 1963	NBRC 13464(T)	AB184424	98.948	15/1426	2676	2637	

ตารางที่ 10 จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของ 16S rDNA ของแอคติโนมัยซีท CH 54-5 ไม่สามารถจำแนกถึงสปีชีส์ได้ แต่มีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces indiaensis* ความคล้ายคลึง(%similarity)ที่ 99.241%

Rank	Name/Title	Authors	Strain	Accession	Pairwise Similarity	Diff/Total nt	megaBLAST score	BLASTN score	Tasks
1	*Streptomyces indiaensis*	(Gupta 1965) Kudo and Seino 1987	NBRC 13964(T)	AB184553	99.241	11/1449	2789	2767	
2	*Streptomyces thermocarboxydus*	Kim et al. 1998	DSM 44293(T)	U94490	99.172	12/1450	2761	2734	
3	*Streptomyces purpurascens*	Lindenbein 1952	NBRC 13077(T)	AB184859	99.103	13/1449	2765	2752	
4	*Streptomyces spinoverrucosus*	Diab and Al-Gounaim 1982	NBRC 14228(T)	AB184578	99.102	13/1447	2745	2726	
5	*Streptomyces lusitanus*	Villax 1963	NBRC 13464(T)	AB184424	99.090	13/1429	2726	2712	

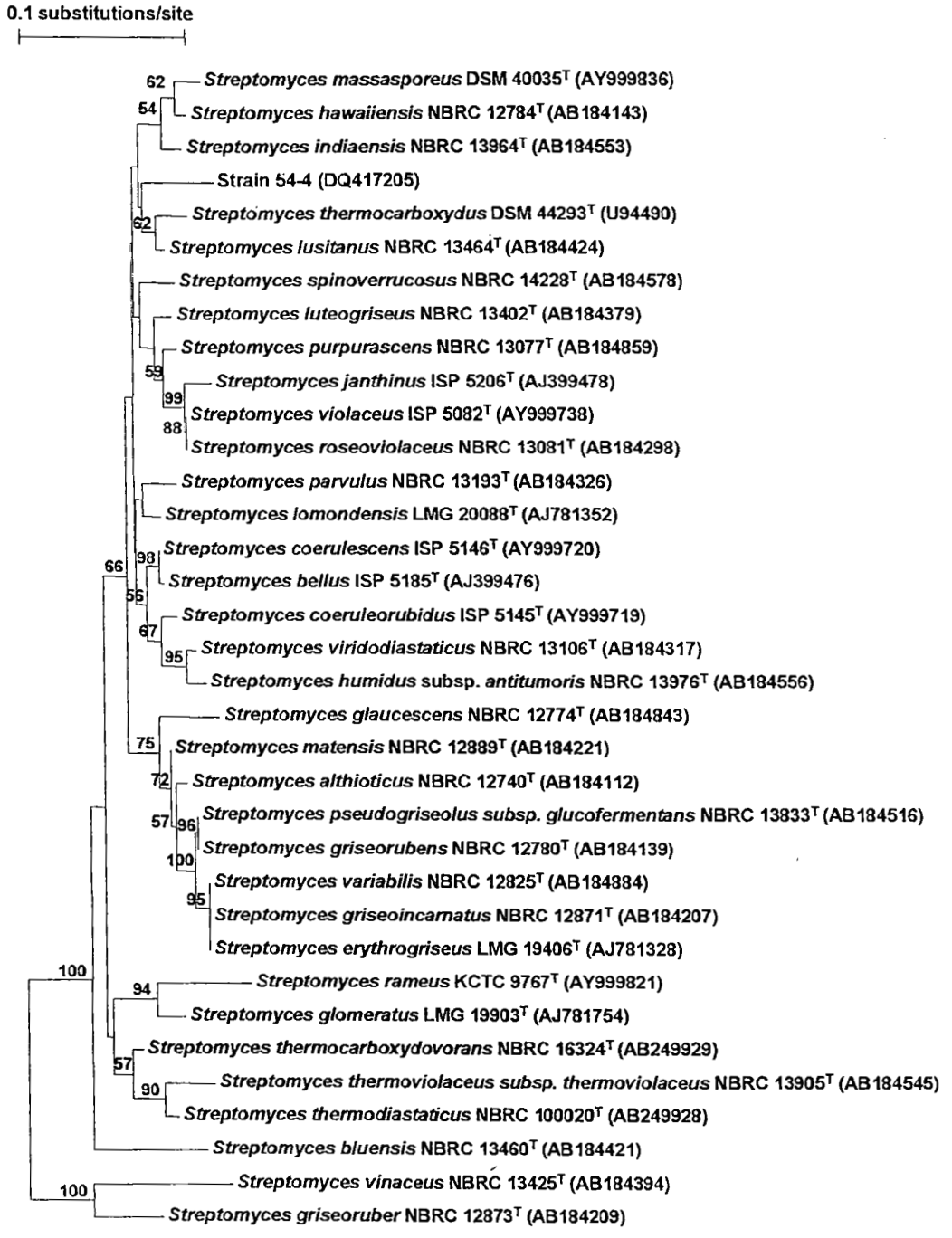
ตารางที่ 11 จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของ 16S rDNA ของแอคติโนมัยซีท C 17-5 ไม่สามารถจำแนกถึงสปีชีส์ได้ แต่มีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces avermitilis* ด้วยความคล้ายคลึง(%similarity)ที่ 99.0%

Rank	Name/Title	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
1	*Streptomyces hygroscopicus* subsp. *jinggangensis*	2555	15291	99%	0.0	99%	NC_017765.1
1	*Streptomyces hygroscopicus* subsp. *jinggangensis* TL01, complete genome	2555	15291	99%	0.0	99%	CP003720.1
3	*Streptomyces avermitilis* MA-4680, complete genome	2427	14565	99%	0.0	97%	NC_003155.4
3	Streptomyces davawensis strain JCM 4913 complete genome	2388	14333	99%	0.0	97%	HE971709.1
3	*Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome, complete genome	2357	14105	99%	0.0	97%	NC_003888.3



ภาพที่ 13 แผนภูมิต้นไม้ ของแอคติโนมัยซีทที่ให้สารออกฤทธิ์ชีวภาพ A17-1 และ A3-3

หมายเหตุ แอคติโนมัยซีท A3-1 และ A3-3 ผลการจำแนกชนิดด้วยการหาลำดับเบสของ 16S rRNA ยีน ให้ผลใกล้เคียงใน species เดียวกัน



ภาพที่ 14 แผนภูมิต้นไม้ ของแอคติโนมัยซีทที่ให้สารออกฤทธิ์ชีวภาพ CH54-4 (ซึ่งมีผลของ ลำดับเบส ใกล้เคียงหรือไม่แตกต่างจาก ลำดับเบสของ A 16-1 และ CH54-5)

บทที่ 5 อภิปรายผลและสรุป

จากการคัดแยกเชื้อราเอ็นโดไฟท์ จากใบพืชป่าชายเลน 9 ชนิด ได้เชื้อราเอ็นโดไฟท์ทั้งหมด 59 ไอโซเลท และจากจำนวนราทั้งหมดนี้ให้สารออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ รวม 20 ไอโซเลท โดยราที่ออกฤทธิ์นั้นได้ใบจากต้นสักขี 8 ไอโซเลท จากต้น ฝาดดอกขาว 3 ไอโซเลท จากต้น ฝาดดอกแดง 1 ไอโซเลท จากต้นโกงกางใบใหญ่ 1 ไอโซเลท จากต้นโกงกางใบเล็ก 2 ไอโซเลท จากต้นโพทะเล 1 ไอโซเลท ต้นตะบูนดำ 1 ไอโซเลท และจากต้นพืชป่าชายเลนไม่ทราบชื่อ อีก 3 ไอโซเลท โดยเชื้อราเอ็นโดไฟที่ออกฤทธิ์ทั้งหมดนี้ สามารถยับยั้ง MRSA มากที่สุดถึง 16 ไอโซเลท มี 6 ไอโซเลทที่สามารถยับยั้ง *Candida albicans* และมี 5 ไอโซเลทที่ยับยั้งได้ทั้ง MRSA และ *C. albicans*

เมื่อนำเชื้อราเอ็นโดไฟท์ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งได้ดี 6 ไอโซเลท คือ รา DC4-1, RA2-1, RM 9-11, UN6-12, UN6-13 และ XG2-6 มาทดสอบการสร้างสารในอาหารต่าง ๆ พบว่าบนอาหาร PDA / PDB จะสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ได้ดีกว่าอาหารชนิดอื่น ๆ (ISP2 และ YM) และได้เลือก PDB เป็นอาหารสำหรับการสร้างสารออกฤทธิ์ปริมาณมากเพื่อการทดสอบในขั้นต่อไป (เพื่อทำให้สารบริสุทธิ์ ศึกษาโครงสร้างสาร และทดสอบฤทธิ์อื่น ๆของสาร)

จากการศึกษาลำดับเบสของ 26S rRNA ยีนของราเอ็นโดไฟท์ ทั้ง 6 ไอโซเลทนี้ พบว่า DC4-1 มีความใกล้เคียงกับรา *Cochliobolus hawaiiensis* ที่ 98% similarity, รา RA2-1 มีความใกล้เคียงกับรา *Sordariomycetes* sp. Genotype 511 Isolate NC0607 ที่ 95% similarity (และมีความใกล้เคียงกับ *Xylariaceae* sp. ที่ 45% similarity) รา RM 9-11,มีความใกล้เคียงกับรา *Penicillium verruculosum* strain KUC 1794 ที่ 97% similarity รา UN6-12 มีความใกล้เคียงกับรา *Eurotiomycetes* sp. Genotype108 Isolate AK1211 ที่ 99 % similarity (แม้ว่าจะมี % similarity m 99% กับ *Aspergillus fumigatus* เหมือนกันแต่เนื่องจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสปอร์ ก้านชูสปอร์ ไม่เหมือนกันกับ *Aspergillus fumigatus*) ส่วนรา UN6-13 และ XG2-6 มีความใกล้เคียงกับรา *Cochliobolus sativus* NBRC 100193 และรา *Bipolaris zeicola* NRRL 47506 ที่ % similarity 95% และ 94% ตามลำดับ

อย่างไรก็ดีเมื่อได้นำลำดับเบสที่ได้มาสร้างแผนภูมิต้นไม้ด้วยโปรแกรม Phydit พบว่า รา UN6-13 และ XG2-6 เป็นชนิดเดียวกัน ซึ่งอาจไม่ใช่ทั้ง *Bipolaris zeicola* NRRL 47506 และ *Cochliobolus sativus* NBRC 100193 เนื่องจาก % similarity น้อย ส่วนรา DC4-1 จะใกล้เคียงกับ *Cochliobolus australiensis* มากกว่า *C. hawaiiensis* หรือ *C. sativus* อย่างไรก็ดี มี % similarity เพียง 98% ส่วนรา RA2-1 ก็เช่นเดียวกัน ไม่น่าจะใช่ทั้ง *Sordariomycetes* sp. และ *Xylariaceae* sp. เพราะตามแผนภูมิ อยู่กันคนละ clade ส่วนรา RM 9-11 จะเป็น species เดียวกันกับ *Penicillium* sp. 4JJK-2011 มาก

ผลจากการตรวจดูองค์ประกอบย่อยของสารสกัดหยาบด้วยโครมาโทกราฟฟีผิวบาง บนแผ่น Silica Gel 60 พบว่าองค์ประกอบของสารสกัดหยาบนั้น มีองค์ประกอบย่อยไม่มากชนิด อาจเนื่องจาก solvent ที่ใช้สกัดยังไม่เหมาะสม ทำให้สกัดสารออกมาได้ไม่ทั้งหมดและยังคงมีเหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ส่วนสเตรปโตมัยซีท CH 54-4 (รวมทั้ง A16-1 และ CH54-5) ก็ไม่ได้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เหมือนกันกับ *S. thermocarboxydus* เสียทีเดียวซึ่งสอดคล้องกันเมื่อพิจารณาจากแผนภูมิต้นไม้ ซึ่งเป็นไปได้ที่จะเป็นชนิดใหม่ สเตรปโตมัยซีท A1-3 และ A3-3 น่าจะใช่ *Streptomyces indiaensis* เนื่องจากใกล้เคียงกับ strain

NBRC13964 มากถึง 99.79% similarity และ 99.85% similarity ตามลำดับ แต่เมื่อพิจารณาผลการศึกษาลำดับวิวัฒนาการจากแผนภูมิต้นไม้ พบว่ามีความสัมพันธ์ที่แตกต่างออกไปจากแบคทีเรียที่ใกล้เคียง ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าอาจเป็นแบคทีเรียชนิดใหม่ ซึ่งอาจต้องมีการศึกษาคุณลักษณะอื่น ๆ เพิ่มเติมเช่น ศึกษาชนิดของฟอสโฟไลปิด และเมนาควิโนน ศึกษา DNA-DNA hybridization เพื่อยืนยันผลพิสูจน์ว่าเป็นชนิดใหม่หรือไม่ (ซึ่งได้ศึกษาชนิด ของเมนาควิโนนใน *Streptomysis* A3-3 พบว่ามีทั้ง MK-9(H6) และ MK-9(H8) (hexa- และ octahydrogenated menaquinones ที่มี 9 isoprene units) เป็นเมนาควิโนนหลัก ส่วนฟอสโฟไลปิด พบ Phosphatidylethanolamine (PII) และ diphosphatidylglycerol (ไม่ได้แสดงข้อมูล)

สิ่งที่ได้ทำวิจัยในขั้นต่อไปอันเนื่องมาจากงานวิจัยนี้

1. เชื้อราเอ็นโดไฟท์ 2 ชนิด (RM9-11 และ UN6-13 ได้นำมาเลี้ยงในปริมาณมาก เพื่อสกัดสารออกฤทธิ์ทำสารห้บริสุทธิ์ และศึกษาโครงสร้างของสาร ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร พนารัตน์ อรุณรัติยากร ภาควิชาเคมี มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

2 แอคติโนมัยซีท CH 54-4 , A16-1 ได้นำมาศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเซลลมะเร็ง ปากมดลูก และเซลลมะเร็งช่องปาก (โดยทำวิจัยร่วมกับ ผศ. ดร. จันทรวรรณ แสงแข จาก คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิยาลัยบูรพา)

3 แอคติโนมัยซีท CH 54-4 นำไปหา whole gnome (ได้รับความอนุเคราะห์จาก Prof. Keiichi Enomoto แห่ง มหาวิทยาลัย Kochi University of Technology ประเทศญี่ปุ่น

4 ผลิตสารสกัดปริมาณมาก จากแอคติโนมัยซีททุกสายพันธุ์ของโครงการนี้ เพื่อทดสอบฤทธิ์ชีวภาพต่าง ๆ เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง เป็นต้น รวมทั้งการทำสารให้บริสุทธิ์ และศึกษาโครงสร้างสาร (งานวิจัยของสถาบันวิยาศาสตร์ทางทะเล)

เอกสารอ้างอิง

ชัยวัฒน์ บุญมากาศ 2550 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในพืชจากราเอนโดไฟท์ของพืชในวงศ์ *Stemonaceae* การประชุมวิชาการ วิจัยพืชเขตร้อน และกึ่งร้อนครั้งที่ 1 19-20 กรกฎาคม 2550 มหาวิยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

นิตยา โนคำ. 2552. การควบคุมโรคแอนแทรคโนสของกล้วยโดยเชื้อราเอ็นโดไฟท์ . วิทยานิพนธ์ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาโรคพืช, บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

พูนลาภ ป้อมเป็ง นงลักษณ์ ศรีอุบลมาศ นาตยา งามโรจนวณิชย์ 2553. สารออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์จากราเอนโดไฟต์ที่แยกจากกรวยป่า Casearia grewiaefolia Vent กอมขม Picrasma javanica Bl. เพกา Oroxylum indicum (L.) Vent. และทองหลางลาย Erythrina variegata Linn วิทยานิพนธ์ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ, คณะวิทยาศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

Abbanat, D., Leighton, M., Maiese, W., Jones, E. B. G., Pearce, C. and Greenstein, M. 1998. Cell wall active antifungal compounds product by the marine fungus *Hypoxylon oceanicum* L-15G256I. Taxonomy and fermentation. Journal of Antibiotics. 51, 296-302.

Adaskaveg, J.E. and Hartin, R.J. 1997. Characterization of *Colletotrichum acutatum* isolates causing anthracnose of almond and peach in Califonia. Phytopathology. 87, 979-987.

Ananda, K. and Sridhar K. R. 2002. Diversity of endophytic fungi in the roots of mangrove species on the west

Coast of India. *Canadian J. Microbiology*. 48: 871-878

Arnold A. E., Lutzoni, F. 2007. Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hostspots *Ecology:* 88: 541-549

Bister, B. , Bischoff, D., Strobele, M., Riedlinger, J.,. Reicke, A., Wolter, F., Bull, A. T., Zahner, H., Fiedler, H. P. and Sussmuth, R.D., 2004. Abyssomicin C- a polycyclic antibiotic from a marine *Verrucosispora* strain as an inhibitor of the p- aminobenzoic acid/tetrahydrofolate biosynthesis pathway. *Angew. Chem. Int. Edit.* 43: 2574-2576

Bredholdt, H., Galatenko, O. A., Engelhardt, K., Fjaervik, E., Terekhova, L. P. And Zotchev, S. B.2007. Rare actinomycetes bacteria from the shallowwater sediments from of the Trondheim fjord, Norway: Isolation, diversity and biological activity. Environmental Microbiology. 9:2756-2764

Bredholdt, H., Fjaervik, E., Johnsen, G., and Zotchev, S. B.2008. Actinomyetes from sediment in the Trondheim fjord, Norway: Diversity and Biological Activity. *Mar. Drugs.* 6: 12-24

Bugni, T. and Ireland C.M. 2004. Marine-derived fungi :a chemically and biologically diverse group of microorganisms. Natural Product Reports 21, 143-163.

Bull, A.T., Stach, J.E., Ward, A.C. & Goodfellow, M. (2005) Marine actinobacteria: perspectives, challenges, future directions. *Antonie Van Leeuwenhoek* 87(1), 65-79.

Bugni, T. and Ireland C.M. 2004. Marine-derived fungi : a chemically and biologically diverse group of microorganisms. Natural Product Reports. 21, 143-163.

Chaeprasert, S., Piapukiew, J., Whalley, A. and Sihanonth, P. 2010. Endophytic fungi from mangrove plant species of Thailand: Their antimicrobial and anticancer poteincial. Botanica Marina. 53, 555-564.

Davis, N. D., Cole, R. T., Dorner, J. W. Weete, J. D., Backman, P. A., Clark, E. M., King, C. C., Schmidt, S. P. and Diener, U. L. 1986. Steroid metabolites of *Acremonium coenophialum*, an endophyte of tall fescue. Agricultural Food Chemistry. 34, 105-108.

Ganesh, M., Vasudevan, M. and Sivakumar, T. 2009. Synergistic activity of methanolic extract of *Thespesia populnea* (Malvaceae) flowers with oxytetracycline. Bangladesh Journal of Pharmacology. 4, 13-16

Ghanem, N. B., Sabry, S. A. El-Sherif, Z. M. and El-Ela, G. A. Abu. 2000. Isolation and enumeration of marine actinomycetes from seawater and sediments in Alexandria. *J. Gen. Appli. Microbiol.*46:105-111

Gouy M., Guindon S. & Gascuel O. 2010. SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. Molecular Biology and Evolution 27(2):221-224.

Guan, S.H., Sattler, I., Lin, W.H., Guo, D.A. and Grabley, S. 2005. *p*-Aminoacetophenonic acids produced by a mangrove endophyte: *Streptomyces griseus* subsp. Journal of Natural products 68, 1198-1200.

Guo, B., Wang, Y., Sun, X. and Tang, K. 2008. Bioactive natural products from endophyte: A review. Applied Biochemistry and Microbiology. 44,136-142.

Hostettmann, K. and Marston, A. 1994. Search for new antifungal compounds from higher plants. Pure and Applied Chemistry. 66, 2231-2234.

Hong, K., Gao, A-H., Xie, Q-Y., Gao, H., Zhuang, L., Lin, H-P., Yu, H-P., Yao, S-H., Goodfellc, M., and Ruan, J-S. 2009. Actinomycetes for marine drug discovery isolated from mangrove Soils and plants in China. *Mar. Drugs.* **7**:24-44

Intana, W., Suwanno, T. and Chamswarng, C. 2005. Use of antifungal metabolite from *Trichoderma virens* for controlling Chinese kale leaf spots caused by *Alternaria brassicicola*. Walailuk Journal of Science and Technology. 2, 1-9.

Isaka, M., Suyarnsestakorn, C, Tanticharoen, M., Kongsaeree, P. and Thebtaranonth, Y. 2002. .Aigialomycins

A-E, new resorcylic macrolides from the marine mangrove fungus *Aigialus parvus*. Journal of Organic Chemistry. 67, 1561-1566.

Joseph, B., Priya, R.M. 2011. Bioactive compounds from endophytes and their potential in Pharmaceutical effect: A Review. American Journal of Biochemistry and Molecular Biology. 1,291-309.

Keller, S., Nicholson, G., Drahl, C., Sorensen, E., Fiedler, H. P. and Sussmuth, R.D. 2007. Abyssomicins G and H and atrop-abyssomicin C from the marine *Verrucosospora* strain AB-18-032. J. Antibiot. 60: 391-394.

Kjer, J. 2009. New natural products from endophytic fungi from mangrove plants structure elucidation and biological screening. *Bioresource Technology*, 2, 3-35. Retrieved December15, 2010, from http://docserv.uni-duesseldorf. de/servlets/ DerivateServlet/Derivate-17938/Dissertation_JuliaKjer.pdf.

Kumaresan, V. and Suryanarayanan, T.S. 2001. Occurrence and distribution of endophytic fungi in a mangrove community. Mycological Research. 105, 1388-1391.

Lam, K. S. 2006. Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. *Current Openion in Microbiology*. 9: 245-251

Lazzarini, A., L. Cavaletti., G. Toppo, and F. Marinelli. 2000. Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. *J. Antonie van Leeuwenhoek* 78: 399-405

Li, L., Qiao, B. and Yuan, Y. 2007. Nitrogen sources affect Streptolydigin production and related secondary metabolites distribution of *Streptomyces lydicus* AS 4.2501. Chinese Journal of Engineering. 15, 403-410.

Lin, W., Li, L., Fu, H., Sattler, I., Huang, X. and Grabley, S. 2005. New cyclopentenone derivatives from an endophytic *Streptomyces* sp. isolated from the mangrove plant *Aegiceras comiculatum*. Journal of Antibiotics. 58, 594–598.

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

Maldonado, L. A., Stach, J. E: M., Pathom-aree, W., Ward, A. C., ., Bull, A. T. and Goodfellow, M. 2005.Diversity of cultivable actinobacteria in geographically widespread marine sediments. *Antonie van Leeuwenhoek*. 87: 11-18

Menzies, J.G., Koch, C. and Seywerd, F. 1990. Addition to the host range of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. Plant disease. 74, 569-572.

Miller, J.D. 2000. Screening for secondary metabolites *In:* Marine Mycology - A practical approach (eds. K.D. Hyde and S.B. Pointing), Fungal Diversity Research Series I, Fungal Diversity Press, Hong Kong, 158-171.

Miyadoh, S., H. Anzai, S. Amano and T. Shomura. 1989. *Actinomadura malachitica* and *Microtetraspora viridis* are synonyms and should be transfered as *Actinomadura*

viridis. Int. J. Syst. Bacteriol. 39:152-158

Motti, C. A., Bourne, D. G., Burnell, J. N., Dcyle, J. R., Haines, D. S., Liptrot, C. H., Liewellyn, L. E., Ludke, S., Muirhead, A. and Tapiolas, D. M. 2007. Screening marine fungi for inhibitors of the C4 plant enzymes pyruvate phosphate dikinase: Unguinol as a potential novel herbicide candidate. Applied and Environmental Microbiology. 73, 1921-1927.

Muto, M., Mulabagal, V., Huang, H. C., Takahashi, H., Tsay, H. S. and Huang, J. W. 2006. Toxicity of black nightshade (*Solanum nigrum*) extracts on *Alternaria brassicicola*, causal agent of black leaf spot of Chinese cabbage (*Brassica pekinensis*). Phytopathology. 154, 45-50.

Okami, Y., T. Okazaki, T. Kitahara and H. crassa Umezewa. 1976 . Study on marine micro-organisms : A new antibiotic, Aplasmomycin, Produced by a streptomycetes isolated from shallow sea mud. *Japanese Journal of antibiotic.* 29:1019-1023

Oh, Ki-Bong., Hamada, Kazu., Saito, Mikako., Lee, Hun-Jun. and Matsuoka, Hideaki. 1999. Isolated and properties of an extracellular β-glucosidase from a filamentous fungus, *Cladosporium resinae*, isolated from kerosene. Biochemistry. 63, 281-287.

Park, J.H., Choi, G.J., Lee, H.B., Kim, K.M., Jung, H.S., Lee, S.W., Jang, K.S. and Cho, K.Y., 2005. Griseofulvin from *Xylaria* sp. Strain F0010, and endophytic fungus of *Abies holophylla* and its antifungal activity against plant pathogenic fungi. Journal of Microbiology and Biotechnology. 15, 112-117.

Pathom-aree, W., Nogi, Y., Sutcliffe, I.C., Ward, A.C., Horikoshi, K., Bull, A.T. and Goodfellow, M. (2006). *Williamsia*

marianensis sp. nov., a novel actinomycete isolated from the Mariana Trench. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 56: 1123–1126.

Pretini, O. 1991. Fungal endophytes of tree leaves. *In* : Microbial Ecology of leaves. (eds. J. Andrews and S. Hirano), Springer-Verlag, New York, 179-197.

Proksch, P., Putz, A., Ortlepp, S., Kjer, J. and Bayer, M. 2010. Bioactive natural products from marine sponges and fungal endophytes. Phytochemistry Reviews. 9, 475-489.

Rodriguez, R. J., White, J. F., Arnold, A. E., and Redman, R. S. 2008. Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist.* 1-17

Saikkonen, K. 2007. Forest structure and fungal endophytes. Fungal Biology Reviews. 21, 67-74.

Schmeda-Hirschmann, G., Hormazabal, E., Astudillo, L., Rodriguez, J. and Theoduloz, C. 2005. Secondary metabolites from endophytic fungi isolated from the Chilean gymnosperm *Prumnopitys andina* (Lleuque). World Journal of Microbiology and Biotechnology. 21, 27- 32.

Srinon, W., Chuncheen, K., Jirattiwarutkul, K., Soytong, K. and Kanokmedhakul, S. 2006. Efficacies of

antagonistic fungi against Fusarium wilt disease of cucumber and tomato and the assay of its enzyme activity. Journal of Agriculture Technology. 2, 191-201.

Sriviboo1, R. and Sukchotiratana, M. 2006. Bioperspective of actinomycetes isolated from coastal Soils: A new source of antimicrobial producers. *Songklanakarin Journal of Scince and Technology*. 32:353-358.

Strobel, G. 2003. Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes Infect*. 5: 535-544.

Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U., Harper, J. 2004 Natural products from endophytic microorganisms. *J Nat Prod*.;67:257-68.

Vichitsoonthonkul, T., Boonmakad, C. and Supatrakul, A. 2007. Bioactive compound produced by endophytic fungi of *Stemona* spp. for bacterial plant pathogen control. Agricultural Science. 38, 339-343.

Xiao, J., Xu, J., Xie, S., Zhang, X., Yu, Z., and Xu, J. 2008. Isolation of mangrove Actinomycetes and their antagonistic activities. *Chin J Appl Environ Biol*. 14: 244-248

Xie, L.W., Jiang, S.M., Zhu, H.H., Sun, W., Ouyag, Y.C., Dai, S.K. and Xiang, L. 2008. Potential inhibitors against *Sclerotinia sclerotium* produced by the fungus *Myrothecium* sp. associated with the marine sponge *Axinella* sp. European Journal of Plant Pathology. 122, 571-578.

Xing, Yong-Mei., Chen, Juan., Cui, Jin-Long., Chen, Xiao-Mei. and Guo, Shun-Xing. 2009. Antimicrobial activity and biodiversity of endophytic fungi in *Dendrobium devonianum* and *Dendrobium thyrsiforum* from Vietman. Current Microbiology. 10, 284-289.

Xu, J., Kjer, J., Sendker, J., Wray, V., Guan, H., Edrada, R., Müller, Werner E. G., Bayer, M., Lin, W., Wu, J. and Proksch, P. 2009. Cytosporones, coumarins, and an alkaloid from the endophytic fungus *Pestalotiopsis* sp. isolated from the Chinese mangrove plant *Rhizophora mucronata*. Bioorganic & Medicinal Chemistr. 17, 7362–7367.

Zulfiqar, M., Brlansky, R.H. andTimmer, I.W. 1996. Infection of flower and vegetative tissues of citrus by *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides*. Mycologia. 88, 121-128.

ภาคผนวก

2. BlastN Report

- **Query name : RA2-1_contig_1**
- **Query length : 1086**

Query		Subject					Score			Identities			
Start	End	Description	AC	Length	Start	End	Bit	Raw	EV	Match	Total	Pct.(%)	Strand
3	1085	Xylariaceae sp. CHTAB14 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	JF773597.1	1155	83	1152	1616	875	0.0	1021	1088	94	Plus/Plus
3	1047	Sordariomycetes sp. genotype 549 isolate NC0992 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	JQ761642.1	1089	50	1089	1609	871	0.0	993	1050	95	Plus/Plus
3	1047	Sordariomycetes sp. genotype 511 isolate NC0607 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	JQ761595.1	1088	49	1088	1609	871	0.0	994	1051	95	Plus/Plus
3	1047	Sordariomycetes sp. genotype 511 isolate NC1163 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	JQ761807.1	1094	55	1094	1604	868	0.0	992	1050	94	Plus/Plus
3	1047	Sordariomycetes sp. genotype 511 isolate NC0263 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	JQ761303.1	1088	49	1088	1604	868	0.0	992	1050	94	Plus/Plus

2. BlastN Report

- **Query name : DC4-1_contig_1**
- **Query length : 1058**

Query			Subject				Score			Identities			
Start	End	Description	AC	Length	Start	End	Bit	Raw	EV	Match	Total	Pct.(%)	Strand
5	1058	Cochliobolus hawaiiensis strain NBRC 100201 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	JN943421.1	1122	36	1097	1810	980	0.0	1038	1064	98	Plus/Plus
5	1058	Cochliobolus australiensis strain NBRC 100213 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	JN943410.1	1124	44	1107	1807	978	0.0	1040	1067	97	Plus/Plus
5	1058	Bipolaris spicifera strain NRRL 47508 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	GU183125.1	1115	40	1098	1796	972	0.0	1036	1064	97	Plus/Plus
5	1058	Uncultured ascomycete clone C31_H02 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	EU490088.1	1548	197	1255	1796	972	0.0	1036	1064	97	Plus/Plus
5	1058	Uncultured ascomycete clone 4S1_C01 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	EU489973.1	1589	197	1255	1796	972	0.0	1036	1064	97	Plus/Plus

2. BlastN Report

- **Query name : UN6-12_contig_1**
- **Query length : 1112**

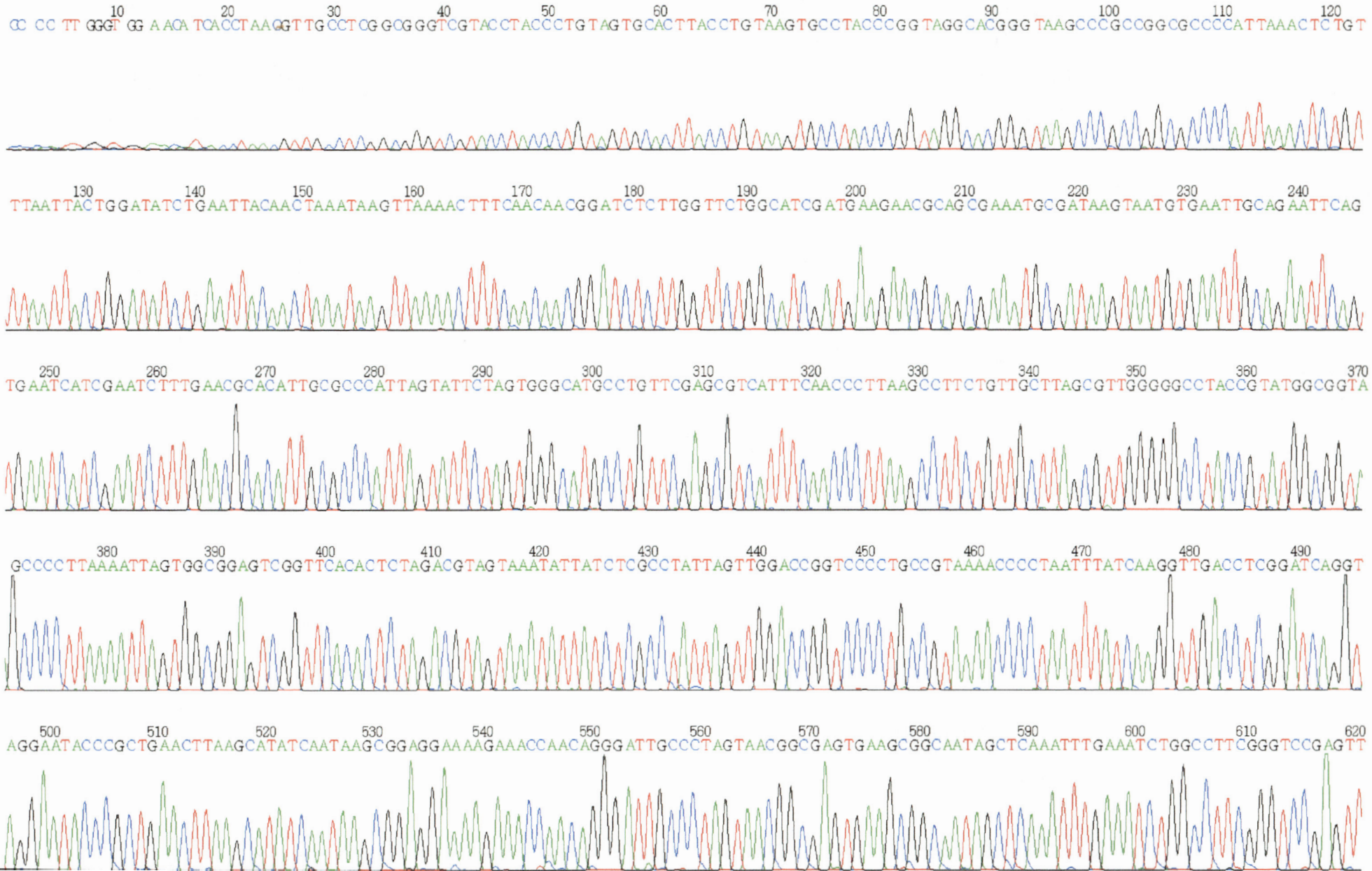
Query			Subject				Score			Identities			
Start	End	Description	AC	Length	Start	End	Bit	Raw	EV	Match	Total	Pct.(%)	Strand
1	1112	Aspergillus fumigatus isolate NRRL 163 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	EF669931.1	1154	30	1143	2034	1101	0.0	1111	1115	99	Plus/Plus
1	1112				30	1143	2034	1101	0.0	1111	1115	99	Plus/Plus
1	1112	Uncultured Aspergillus clone AC_2w_D11 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	JF449528.1	1154	30	1143	2028	1098	0.0	1110	1115	99	Plus/Plus
1	1112	Aspergillus fumigatus isolate NRRL 35223 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	EF634403.1	1154	30	1143	2028	1098	0.0	1110	1115	99	Plus/Plus
1	1087	Eurotiomycetes sp. genotype 108 isolate AK1211 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	JQ759553.1	1110	22	1110	1999	1082	0.0	1087	1089	99	Plus/Plus
1	1087	Eurotiomycetes sp. genotype 108 isolate AK1206 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	JQ759548.1	1110	22	1110	1999	1082	0.0	1087	1089	99	Plus/Plus

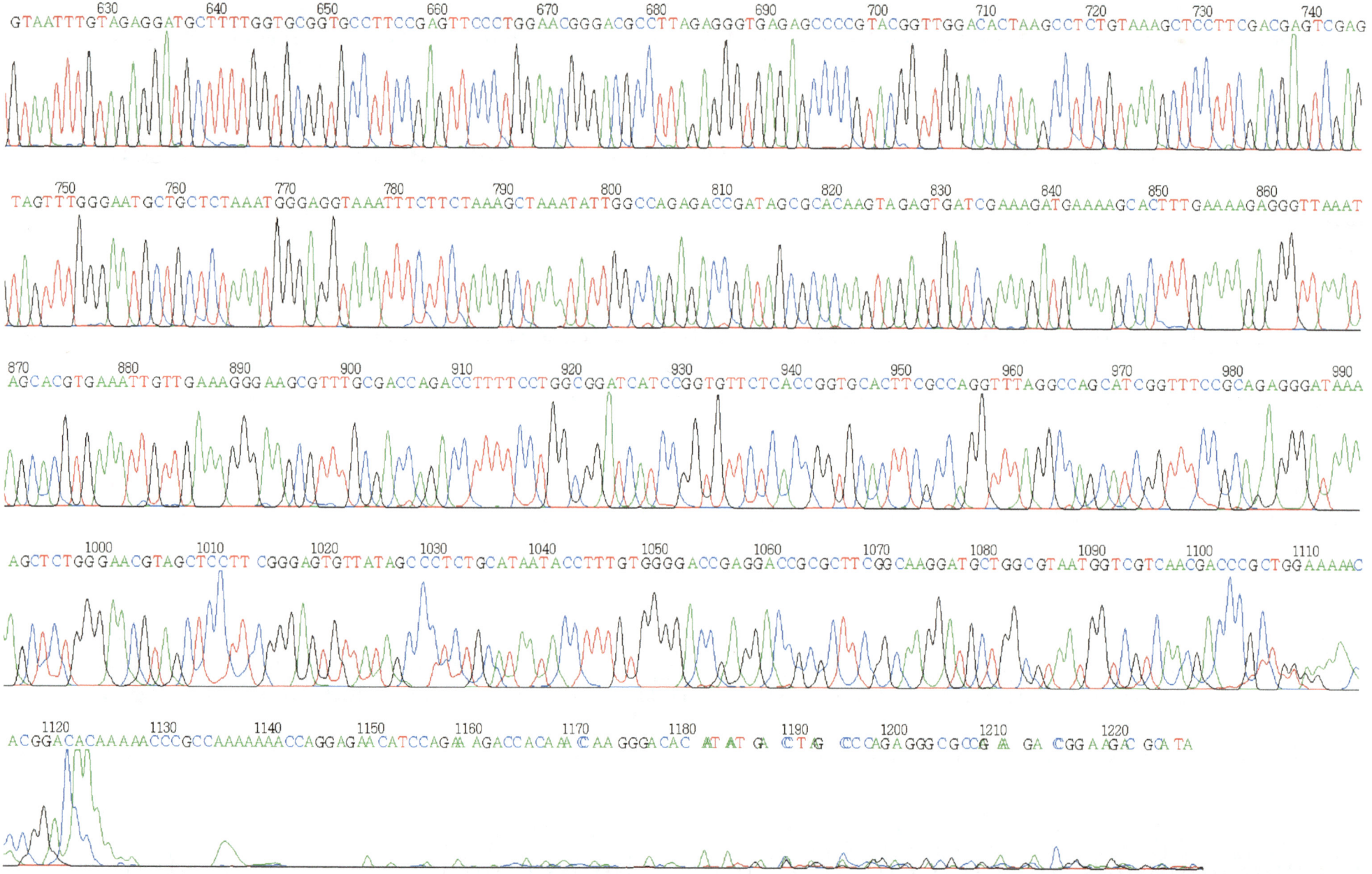
2. BlastN Report

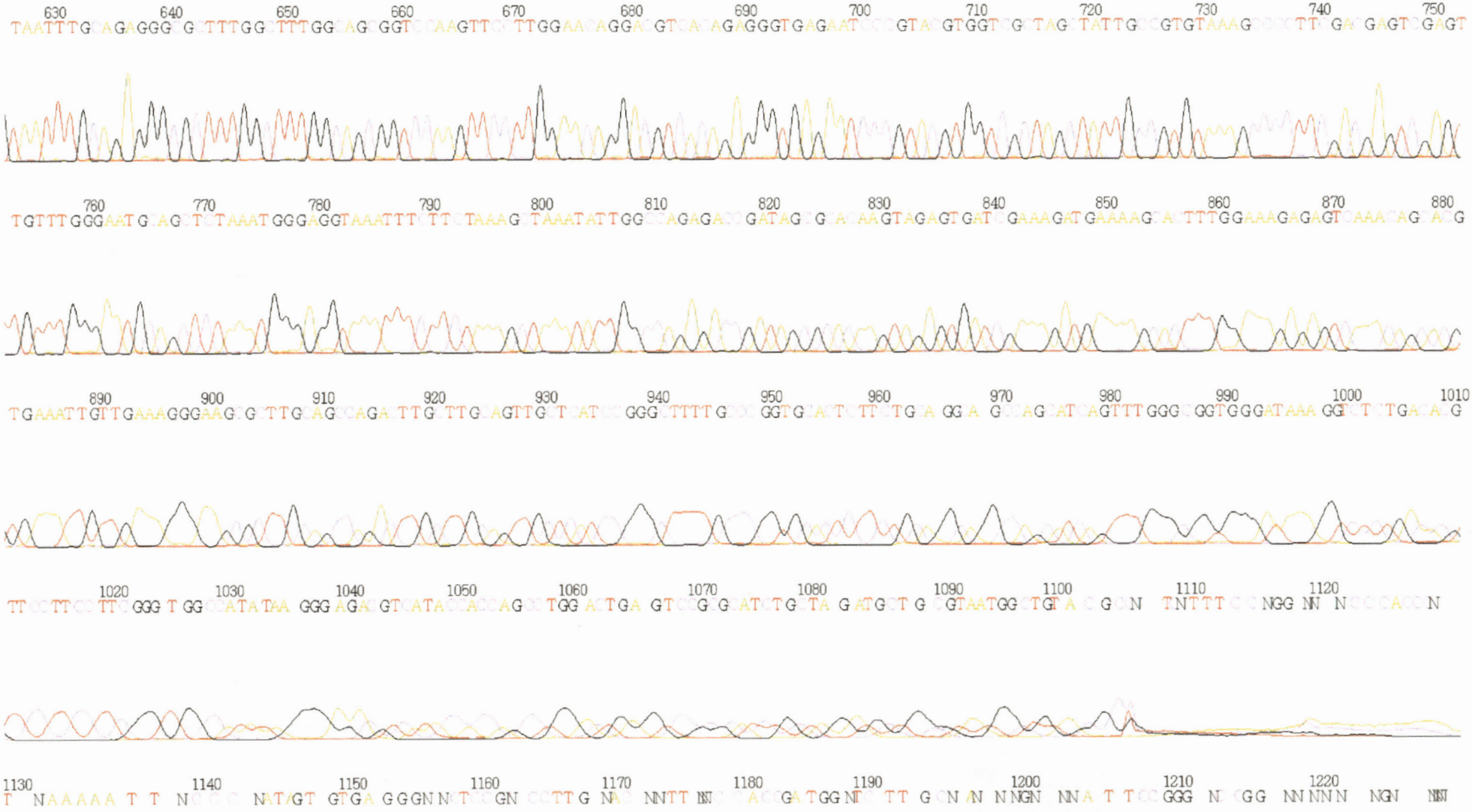
- **Query name : XG2-6_contig_1**
- **Query length : 1044**

Query			Subject				Score			Identities			
Start	End	Description	AC	Length	Start	End	Bit	Raw	EV	Match	Total	Pct.(%)	Strand
8	1044	Bipolaris zeicola culture-collection NRRL:47501 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	GQ167208.1	1058	21	1049	1581	856	0.0	990	1049	94	Plus/Plus
8	1044	Cochliobolus sativus strain NBRC 100205 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	JN943406.1	1112	62	1089	1580	855	0.0	990	1049	94	Plus/Plus
8	1044	Cochliobolus sativus strain NBRC 100193 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	JN943405.1	1142	62	1089	1580	855	0.0	990	1049	94	Plus/Plus
8	1044	Bipolaris zeicola strain NRRL 47503 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	GQ253958.1	1075	26	1053	1574	852	0.0	988	1048	94	Plus/Plus
6	1044	Fungal endophyte isolate 275 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	EU687085.1	1090	51	1076	1574	852	0.0	989	1049	94	Plus/Plus

MACROGEN
Advancing through Genomics



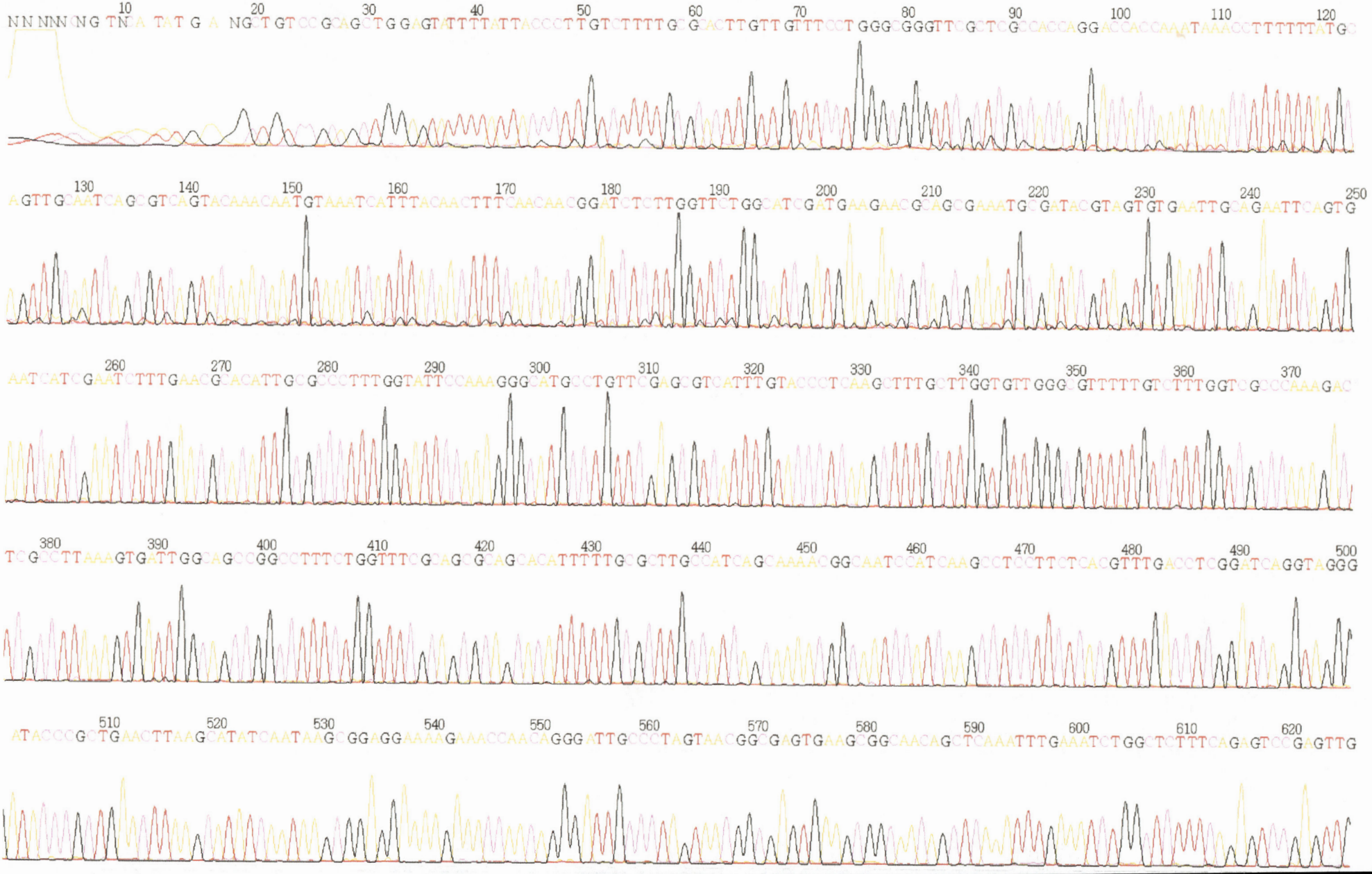

630 640 650 660 670 680 690 700 710 720 730 740
GTAATTTGTAGAGGATGCTTTTGGTGCGGTGCCTTCCGAGTTCCCTGGAACGGGACGCCTTAGAGGGTGAGAGCCCCGTACGGTTGGACACTAAGCCTCTGTAAAGCTCCTTCGACGAGTCGAG
750 760 770 780 790 800 810 820 830 840 850 860
TAGTTTGGGAATGCTGCTCTAAATGGGAGGTAAATTTCTTCTAAAGCTAAATATTGGCCAGAGACCGATAGCGCACAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGGGTTAAAT
870 880 890 900 910 920 930 940 950 960 970 980 990
AGCACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCGTTTGCGACCAGACCTTTTCCTGGCGGATCATCCGGTGTTCTCACCGGTGCACTTCGCCAGGTTTAGGCCAGCATCGGTTTCCGCAGAGGGATAAA
1000 1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110
AGCTCTGGGAACGTAGCTCCTT CGGGAGTGTTATAGCCCTCTGCATAATACCTTTGTGGGGACCGAGGACCGCGCTTCGGCAAGGATGCTGGCGTAATGGTCGTCAACGACCCGCTGGAAAAAC
1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200 1210 1220
ACGGACACAAAAACCCGCCAAAAAAACCAGGAGAACATCCAGAAAGACCACAAACAAGGGACAC AT AT GA CTAG CCCAGAGGGCGCCGAA GA CGGAAGAC GCA TA


630 640 650 660 670 680 690 700 710 720 730 740 750
760 770 780 790 800 810 820 830 840 850 860 870 880
890 900 910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000 1010
1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120
1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200 1210 1220

File: DC4-1_ITS1.ab1 Run Ended: 2013/1/7 21:16:13 Signal G:1131 A:990 C:1287 T:1219

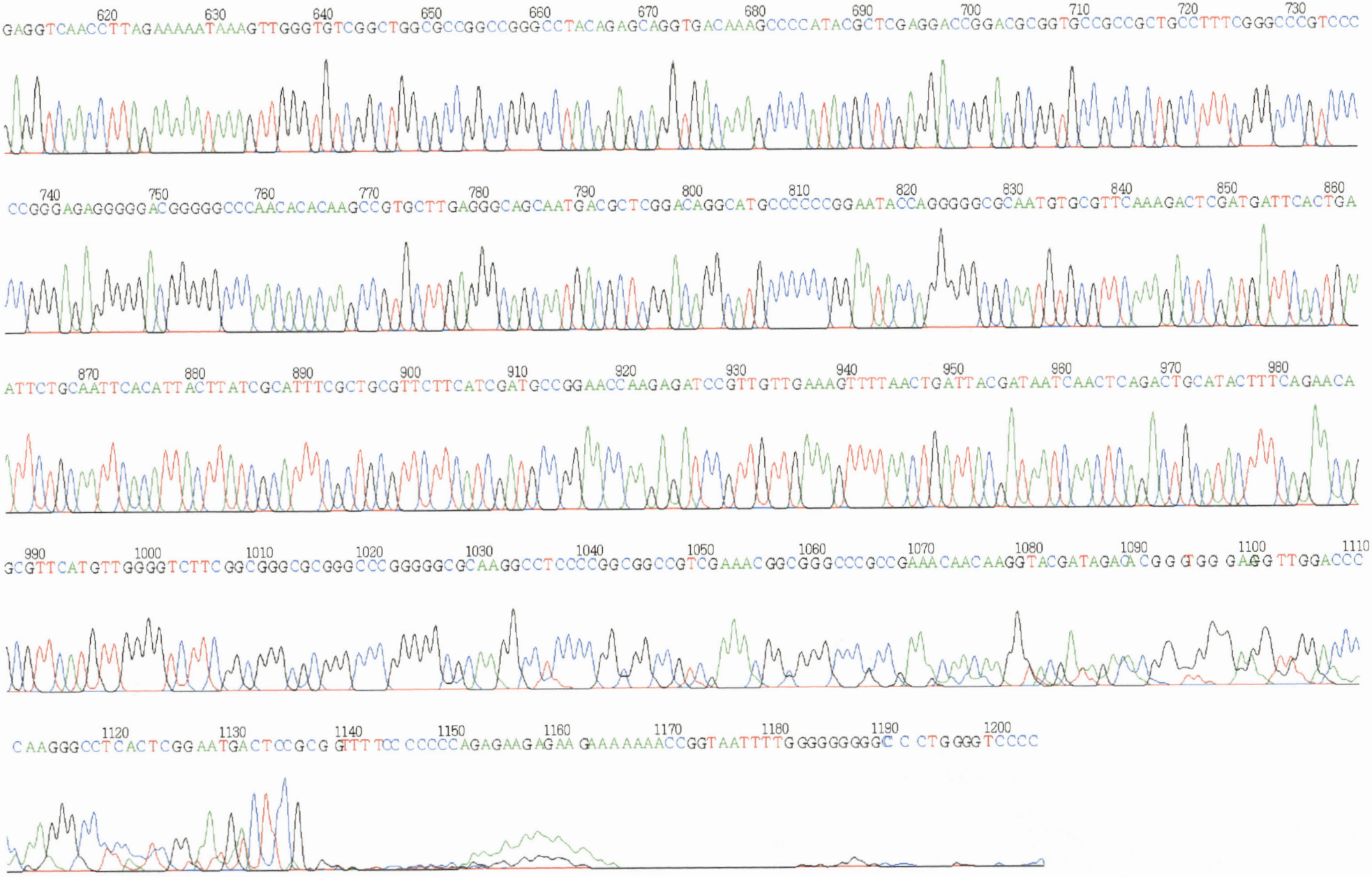
Sample: DC4-1_ITS1 Lane: 29 Base spacing: 15.617793 1298 bases in 16300 scans

MACROGEN
Advancing through Genomics

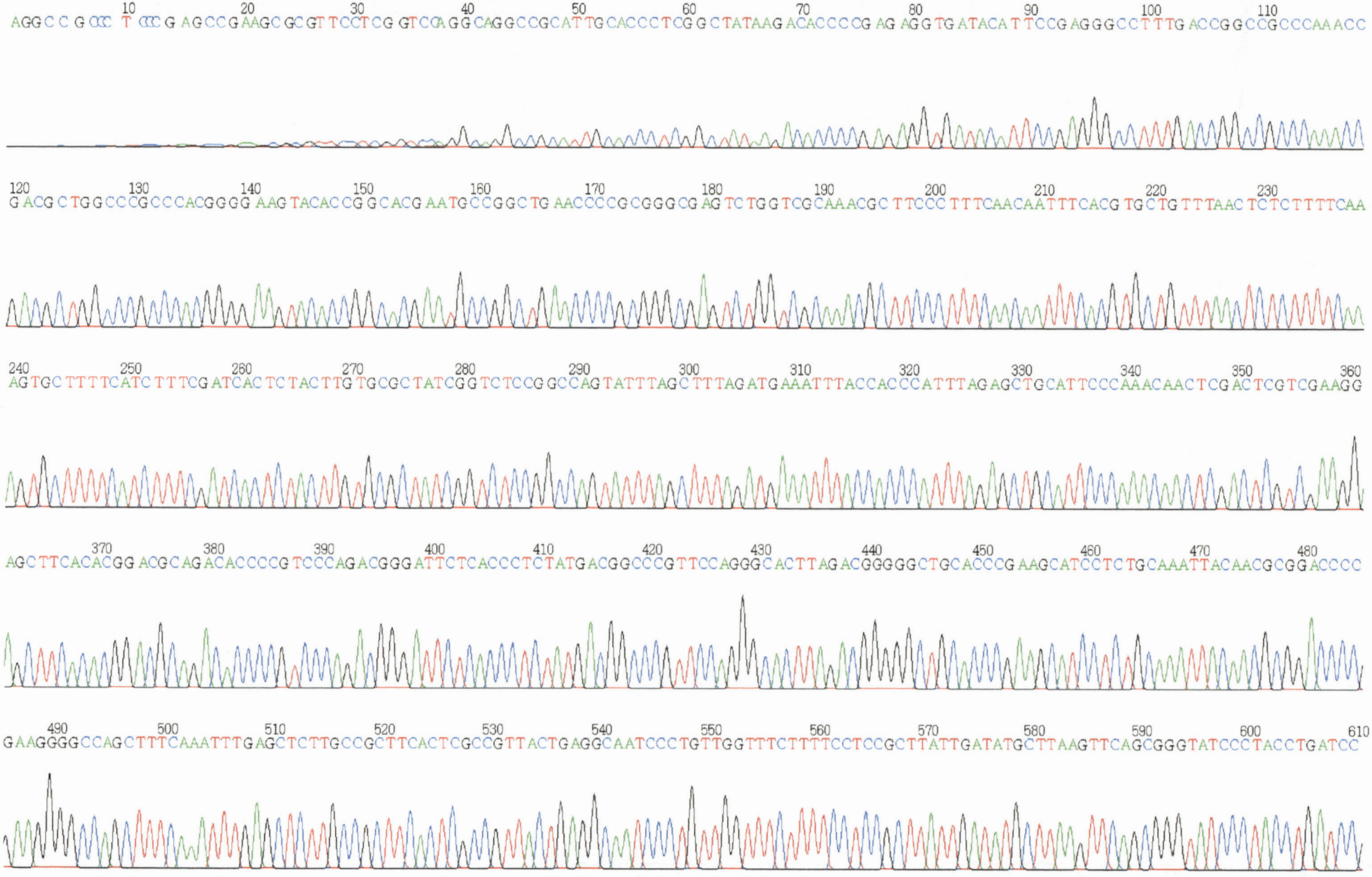


File: UN6-12_LR3R.ab1 Run Ended: 2013/1/3 20:48:57 Signal G:1156 A:1430 C:2568 T:1730

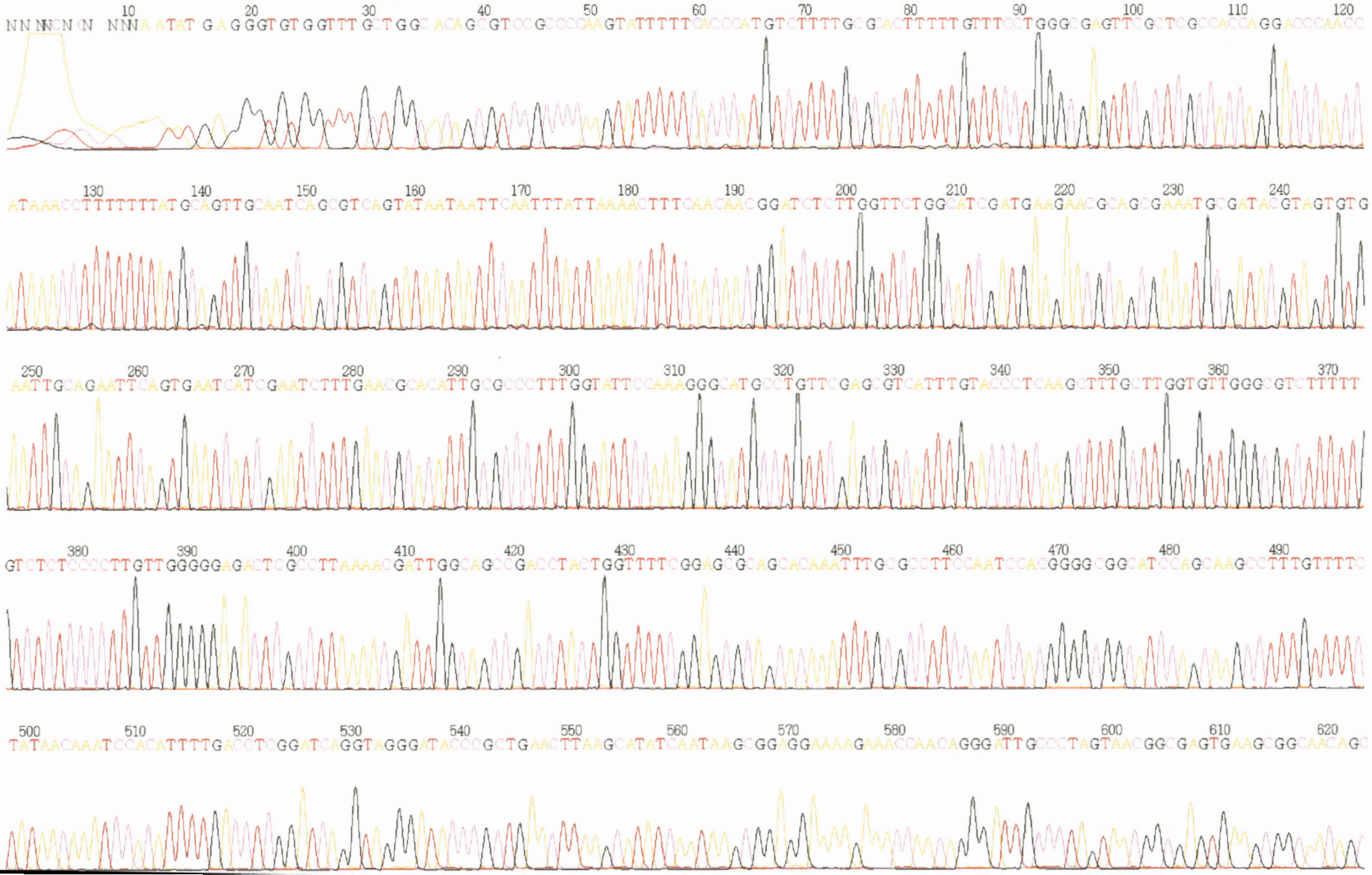
Sample: UN6-12_LR3R Lane: 13 Base spacing: 16.666857 1204 bases in 14651 scans

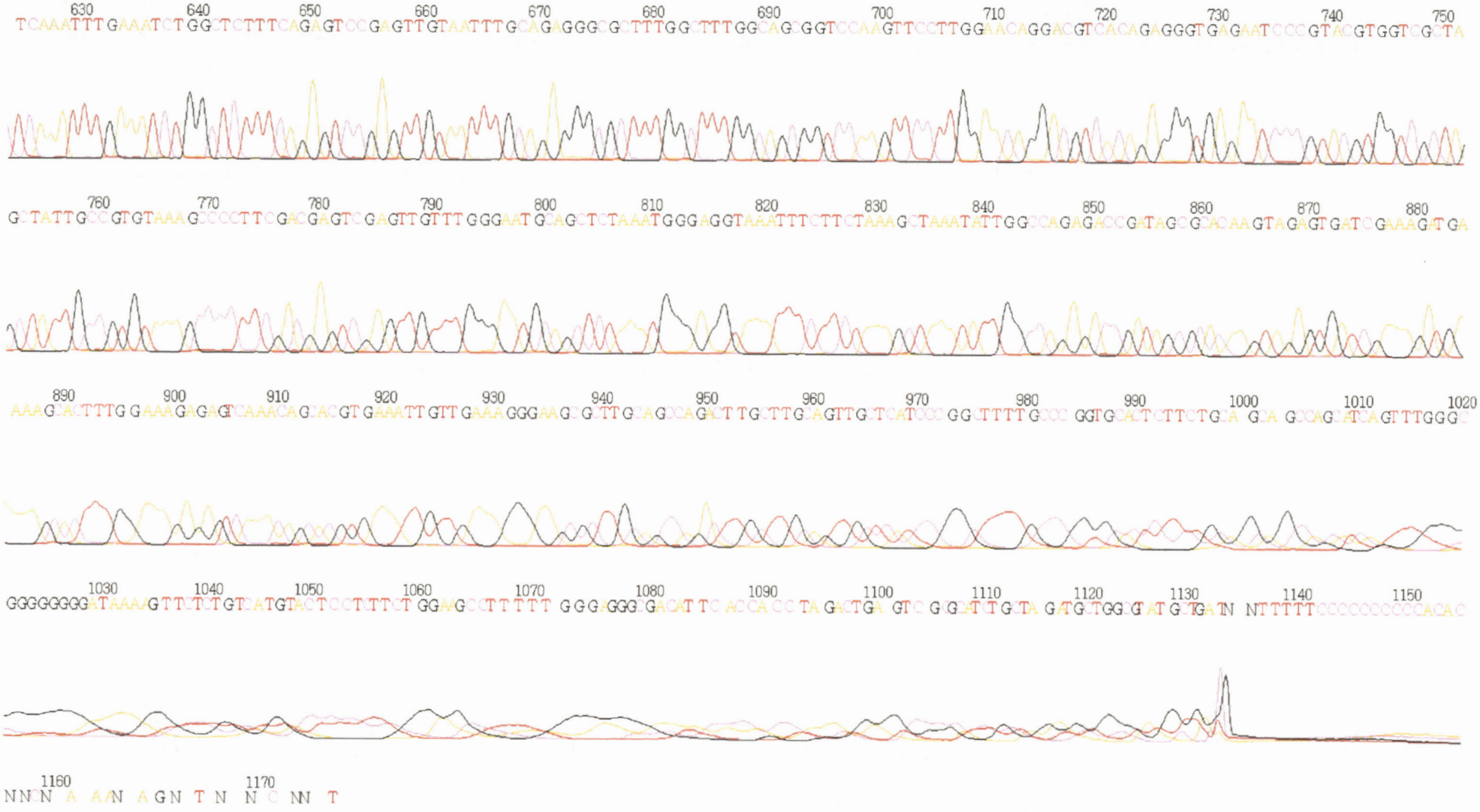


MACROGEN
Advancing through Genomics

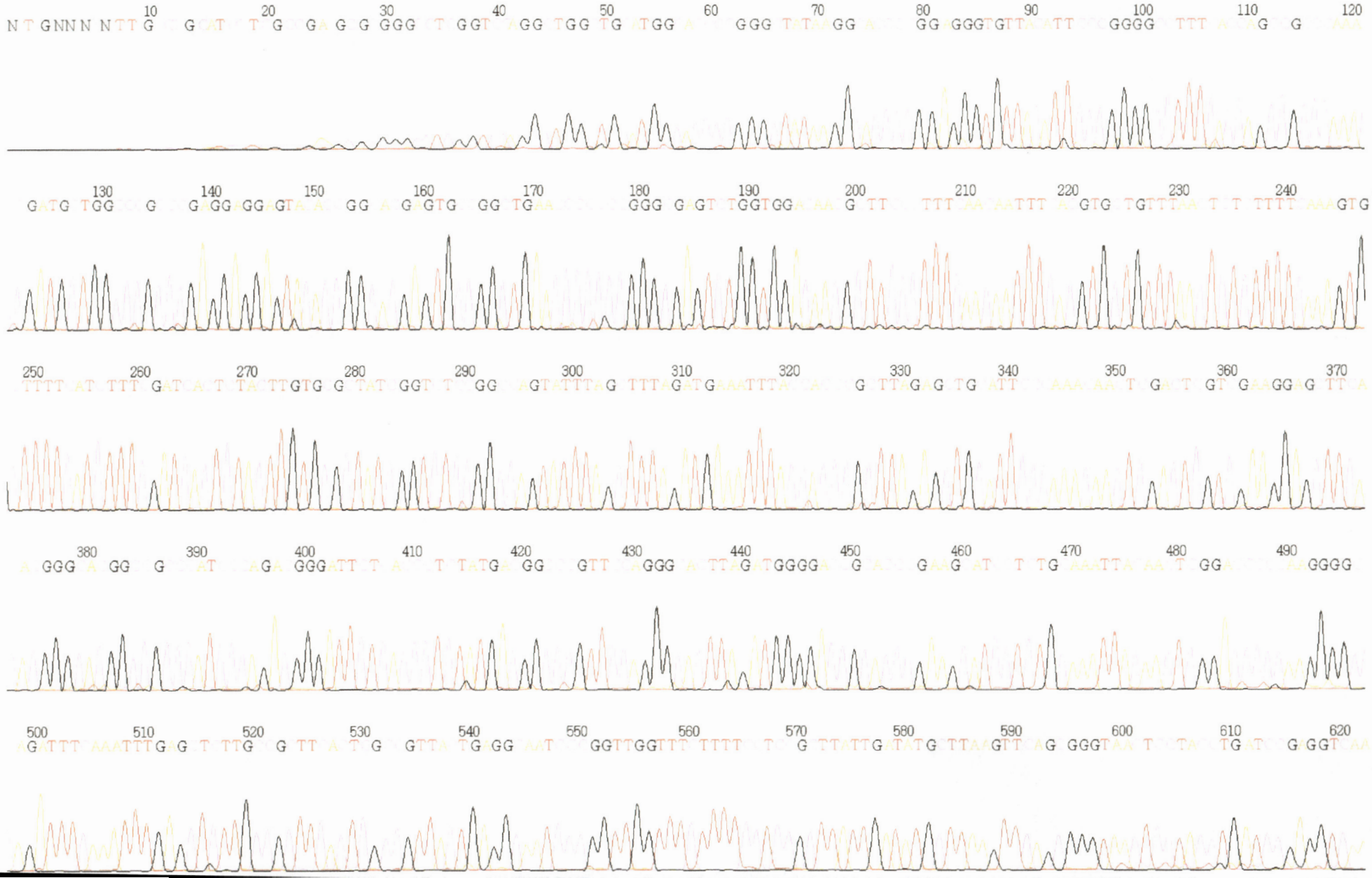


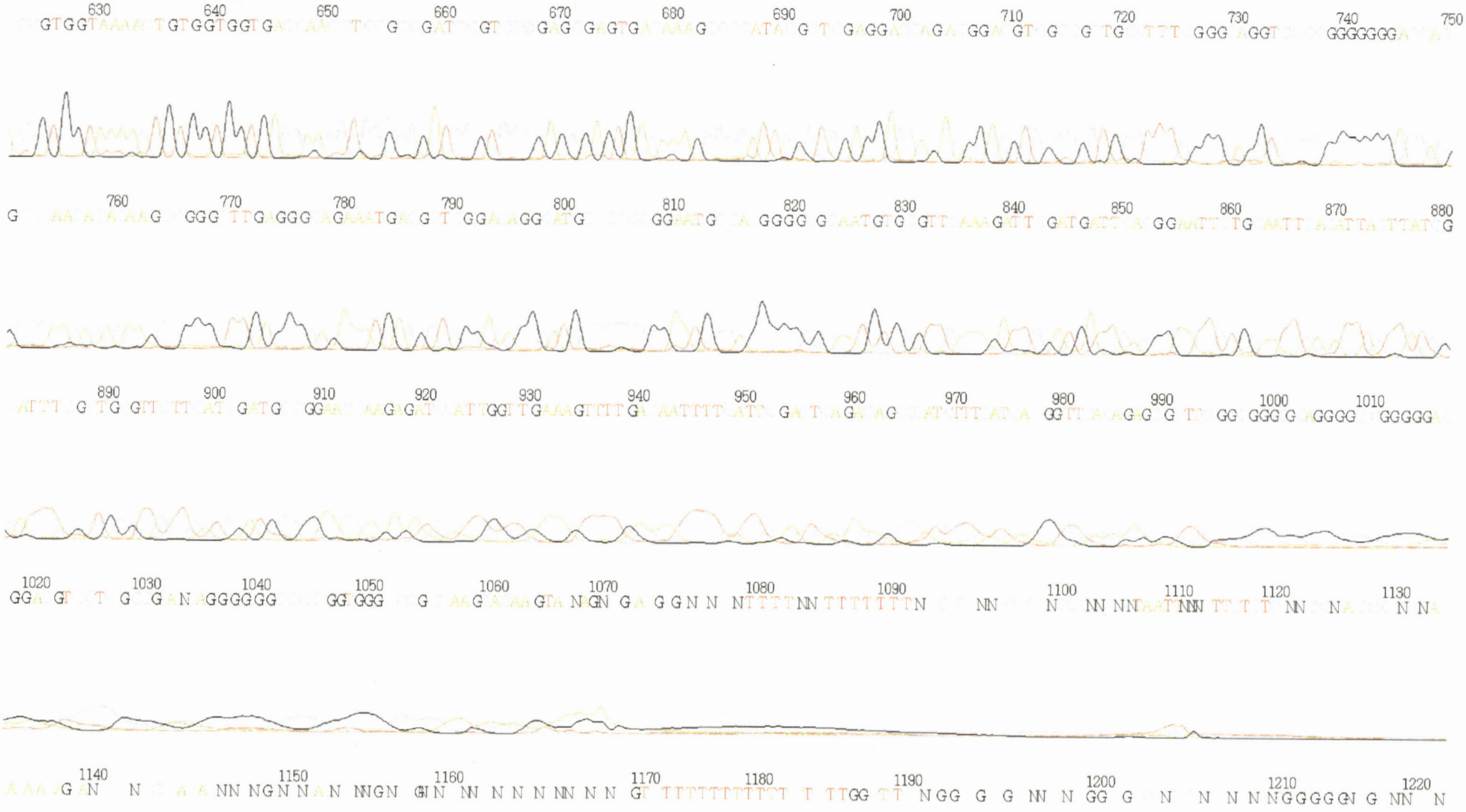
MACROGEN
Advancing through Genomics



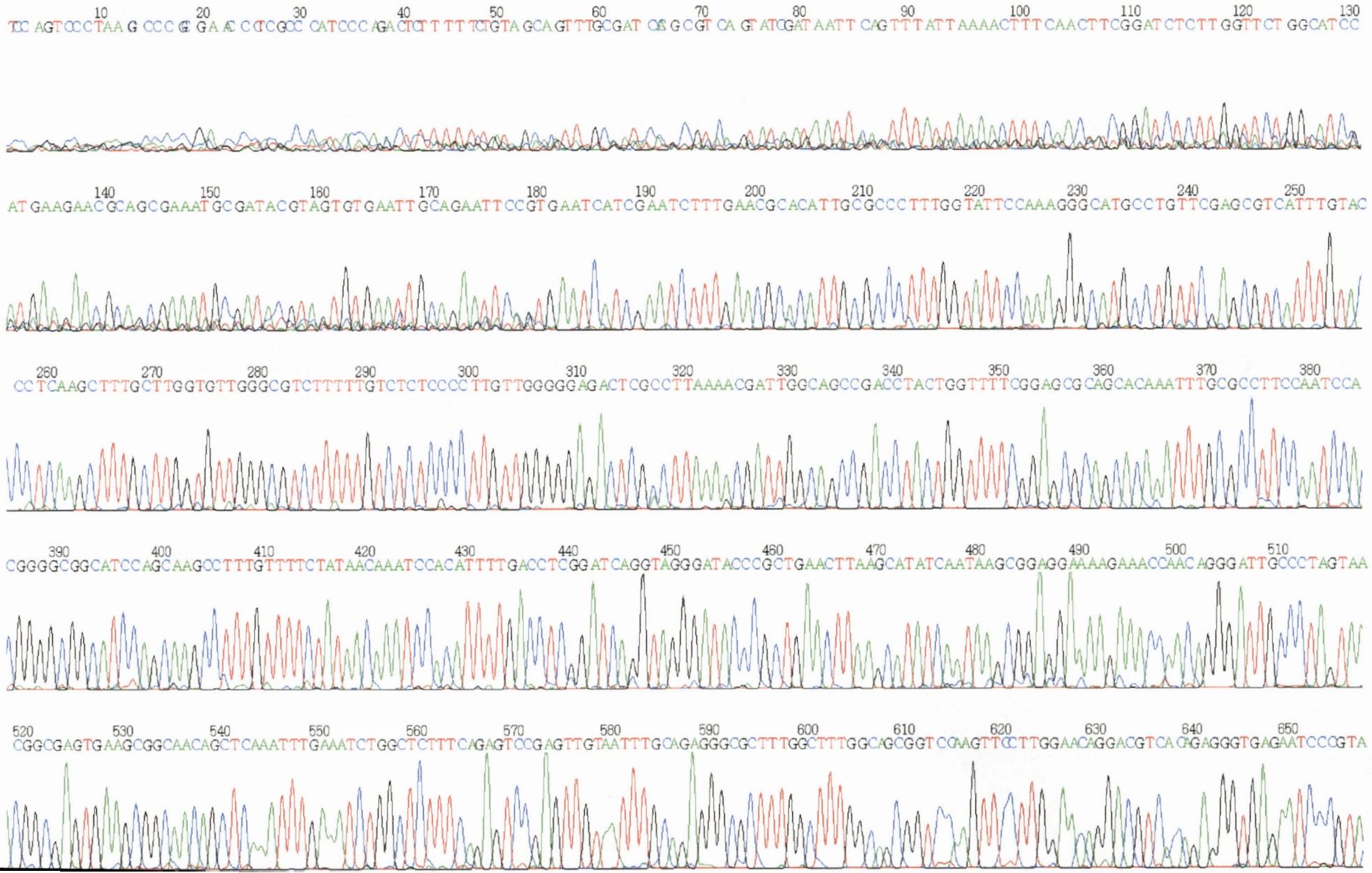

630 640 650 660 670 680 690 700 710 720 730 740 750
760 770 780 790 800 810 820 830 840 850 860 870 880
890 900 910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000 1010 1020
1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120 1130 1140 1150
1160 1170

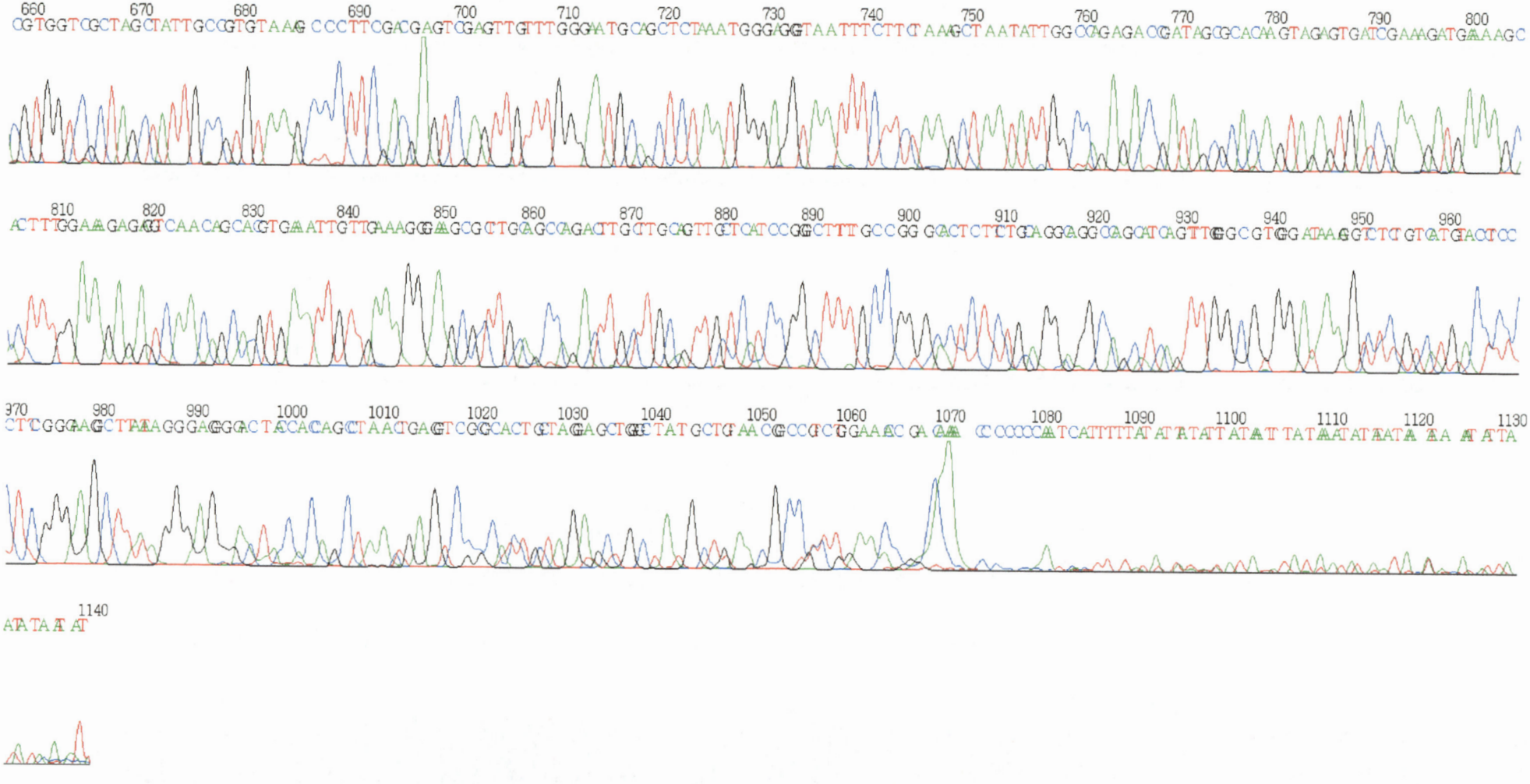
MACROGEN
Advancing through Genomics





MACROGEN
Advancing through Genomics




660
670
680
690
700
710
720
730
740
750
760
770
780
790
800
810
820
830
840
850
860
870
880
890
900
910
920
930
940
950
960
970
980
990
1000
1010
1020
1030
1040
1050
1060
1070
1080
1090
1100
1110
1120
1130
1140

BIOTEC Culture Collection (BCC)
National Center for Genetic Engineering and Biotechnology
113 Thailand Science Park, Paholyothin Road,
Klong 1, Klong Luang, Pathumthani 12120, Thailand
Tel: +66-2-564-6700 ext 3336 Fax: +66-2-564-6707

BIOTEC
a member of NSTDA

เอกสารแนบ / Attached document 2

ลำดับนิวคลีโอไทด์ / Nucleotide sequence(s)

ลำดับที่ No.	รหัสตัวอย่าง Sample No.	บริเวณของลำดับนิวคลีโอไทด์ Nucleotide region of	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' -> 3') Nucleotide sequence (5' -> 3')
1	17-1	16S rDNA	>17-1 GGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAACCACCTTCGGGTGGGGATTAGTGGCG AACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATACTGA CCTGCCAAGGCATCTTGGCGGGTCGAAAGCTCCGSCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGAGGTA ATGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTC CTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCT TCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCC AGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCGCGT CGGTTGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAAT TCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGC TGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGCACTAGGTGTGG GCAACATTCCACGTTGTCCGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTC AAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCT TGACATACACCGGAAAGCATCAGAGATGGTGCCCCCCTTGTGGTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCG TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCCGTGTTGCCAGCAACTCTTCGGAGGTTGGGG ACTCACGGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATGTCTTGGGCT GCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGCAAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTC GGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTT CCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGGAG GGAGCTGTCGAAGGTGGGACTGGCGATTGGGACGAATC
2	A1-3	16S rDNA	>A1-3 TCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAAGCCCTTCGGGGTGGATTAGTGGCGAACGG GTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATACTGACCACT GGGGGCATCCTTGGTGGTCGAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGAGGTAGTGGC TCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACG GGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGG TTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAG CCGCGGTAATACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCACGTCGGTT GTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTG GTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGG AGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAAC ATTCCACGTTGTCCGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGG AATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACA TACACCGGAAAGCGTCCAGAGATGGGCGCCCCCTTGTGGTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCG TGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCCGTGTTGCCAGCAGGCCCTTGTGGTGCTGGGGACTC ACGGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATGTCTTGGGCTGCAC ACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGCGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGAT TGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCG GGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGGA
3	A3-3	16S rDNA	>A3-3 ACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAAGCCCTTCGGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAG TAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATACTGACCACTGGGGG CATCCTCGGTGGTCGAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGAGGTAGTGGCTCACC AAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGG CAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTA AACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG GTAATACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCGCGTCGGTTGTGAA AGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTA GCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGA AAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCC ACGTTGTCCGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTG ACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACAC CGGAAACGTCCAGAGATGGGCGCCCCCTTGTGGTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGA TGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCCGTGTTGCCAGCAGGCCCTTGTGGTGCTGGGGACTCACGGG AGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTG CTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGCGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGG TCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCT TGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGGAGGGAGCTGT CGAAGGTGGGACTGGCGTTGGAC

A16-1sequence

>A16-1
CGTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAAGCCCTTCG
GGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGAC
AAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATACTGACCATCTTGGGCATCCTTGATGGTGG
AAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCT
CACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGAC
ACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTG
ATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGA
AGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGC
GGTAATACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGG
CTTGTCGCGTCGGTTGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCA
GGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATC
AGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAA
GCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGCACTA
GGTGTGGGCAACATTCCACGTTGTCCGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCCTGG
GG-AGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGG
AGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGA
AACGTCCAGAGATGGGCGCCCCCTTGTGGTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCA
GCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCCGTGTTG
CCAGCAGGCCCTTGTGGTGCTGGGGACTCACGGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAA
GGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAA
TGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGCGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCA
GTTCGGAATTGGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGA
TCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGA
AAAGTCGGTAACACCCGAAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGGAAAGGAGCTGTCGAAA
GTGGGACTGGCGATTGGACA

>54-5
GCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAAAGCCCTTC
GGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGA
CAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATACTGACCATCTTGGGCATCCTTGATGGTG
GAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGC
TCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGA
CACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCT
GATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGG
AAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCG
CGGTAATACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCG
GCTTGTCGCGTCGGTTGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGC
AGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATAT
CAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAA
AGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGCACT
AGGTGTGGGCAACATTCCACGTTGTCCGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCCTG
GGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGG
AGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGA
AACGTCCAGAGATGGGCGCCCCCTTGTGGTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCA
GCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCCGTGTTG
CCAGCAGGCCCTTGTGGTGCTGGGGACTCACGGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAA
GGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAAT
GGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGCGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAG
TTCGGAATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATC
AGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAA
GTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGGAGGGAGCTGTCGAAGGTGGG
ACTGGCGATTGGGACAAT