

การคัดเลือกราเอนโดไฟท์จากพืชป่าชายเลนที่สร้างเอนไซม์ไลเปส
เซลลูเลส อะไมเลส หรือ โปรติเอส

**Screening of Endophytic Fungi from Mangrove Plants which Produce Lipase,
Cellulase, Amylase or Protease Enzymes**

ประไพพิศ ชาวลิต
Prapaipit Chaowalit

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Microbiology
Prince of Songkla University**

2552

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์



การคัดเลือกราเอนโดไฟท์จากพืชป่าชายเลนที่สร้างเอนไซม์ไลเปส
เซลลูเลส อะไมเลส หรือ โปรติเอส

**Screening of Endophytic Fungi from Mangrove Plants which Produce Lipase,
Cellulase, Amylase or Protease Enzymes**

ประไพพิศ ชาวลิต
Prapaipit Chaowalit

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Microbiology
Prince of Songkla University**

2552

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

(1)

ชื่อวิทยานิพนธ์ การคัดเลือกกราเอนโดไฟท์จากพืชป่าชายเลนที่สร้างเอนไซม์ไลเปส
 เซลลูเลส อะไมเลส หรือ โปรติเอส
ผู้เขียน นางสาวประไพพิศ เชาวลิต
สาขาวิชา จุลชีววิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร) (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปรียานุช บวรเรืองโรจน์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร)

.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เยาวลักษณ์ ดิสระ)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เยาวลักษณ์ ดิสระ)

.....กรรมการ
(ดร.จริยา สากยโรจน์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยฉบับนี้
เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.เกริกชัย ทองหนู)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์	การคัดเลือกราเอนโดไฟท์จากพืชป่าชายเลนที่สร้างเอนไซม์ไลเปส เซลลูเลส อะไมเลส หรือ โปรติเอส
ผู้เขียน	นางสาวประไพพิศ เชาวลิต
สาขาวิชา	จุลชีววิทยา
ปีการศึกษา	2551

บทคัดย่อ

ทำการแยกราเอนโดไฟท์ จากพืชป่าชายเลนในภาคใต้ของประเทศไทย และสุ่ม
เลือกมา 300 isolates เพื่อศึกษาการสร้าง lipase และ cellulase และ 180 isolates เพื่อศึกษา
การสร้าง amylase และ protease ด้วยวิธี plate method โดยทดสอบการสร้าง lipase,
cellulase, amylase และ protease บนอาหารพื้นฐานที่เติม 1% tributyrin, 0.5%
carboxymethylcellulose (CMC), 2% soluble starch และ 2% sodium caseinate เป็น
สับสเตรท ตามลำดับ ประเมินผลโดยใช้ค่า extracellular enzyme production ratios (EPR) คือ
อัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone ต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเรา พบว่า
ราเอนโดไฟท์จำนวน 31.7, 24.0 และ 1.1% ของราเอนโดไฟท์ที่นำมาทดสอบสามารถสร้าง
lipase, cellulase และ amylase ได้ตามลำดับ แต่ไม่พบการสร้าง protease จากนั้นเลือก
ราเอนโดไฟท์ 3 อันดับแรก ที่สามารถสร้าง lipase (MA1, MA2 และ PMA1) และ cellulase
(MA130, MA145 และ MA150) ได้ นำมาทดสอบกิจกรรมในการสร้างเอนไซม์ โดยทดสอบ
กิจกรรมของ cellulase โดยการเลี้ยงในอาหารเหลวที่มี 1% CMC เป็นสับสเตรท และ ในอาหาร
แข็งที่มีฟางข้าว และฟางข้าวผสมใบพืชป่าชายเลนอัตราส่วน 3:2 เป็นสับสเตรท พบว่าการเลี้ยง
ในอาหารเหลว เชื้อราทั้ง 3 isolates ได้แก่ MA 130, MA145 และ MA150 ให้ค่ากิจกรรม
ใกล้เคียงกัน โดยค่ากิจกรรมสูงสุดอยู่ระหว่าง 0.2-0.3 U/ml สำหรับการเลี้ยงเชื้อในอาหารแข็งที่
มีฟางข้าวเป็นสับสเตรท โดยมีความชื้นเริ่มต้น 75% และฟางข้าวผสมใบพืชป่าชายเลน
อัตราส่วน 3:2 ซึ่งมีความชื้นเริ่มต้น 70% พบว่าเชื้อราทั้ง 3 isolates สร้างเอนไซม์ cellulase
เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งได้ดีกว่าในอาหารเหลว และให้ค่ากิจกรรมเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่
มีฟางข้าวผสมใบพืชป่าชายเลนได้สูงกว่าการใช้ฟางข้าวอย่างเดียว โดยพบว่า MA150 ให้ค่า
กิจกรรมในการสร้างเอนไซม์สูงที่สุดเท่ากับ 2.7 U/ml ส่วน MA130 และ MA145 ให้ค่ากิจกรรม
1.3 และ 1.1 U/ml ตามลำดับ การทดสอบกิจกรรมของ lipase โดยการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว
เพียงอย่างเดียวโดยมี 1% tributyrin เป็นสับสเตรทพบว่าเชื้อราที่นำมาทดสอบไม่สามารถสร้าง
เอนไซม์ได้ในสภาวะดังกล่าว นอกจากนี้ยังได้คัดเลือกราเอนโดไฟท์ที่มีประสิทธิภาพในการ

สร้าง lipase และ cellulase จำนวน 47 isolates มาศึกษาความสามารถในการสร้างเอนไซม์ชนิดต่างๆ ด้วยชุดทดสอบ API ZYM test kit พบว่าราเอนโดไฟท์ที่ทดสอบสามารถสร้างเอนไซม์ได้รวม 17 ชนิด จากเอนไซม์ที่ทดสอบทั้งหมด 19 ชนิด โดยเชื้อราทุก isolates สามารถสร้าง acid phosphatase (100%) รองลงมาคือ naphthol-AS-BI-phosphohydrolase (91.5%) และเชื้อราส่วนใหญ่สร้างเอนไซม์กลุ่ม lipase ชนิด esterase (C4) และ esterase lipase (C8) (57.5%) เมื่อนำราเอนโดไฟท์ที่มีศักยภาพในการสร้างเอนไซม์ lipase และ cellulase รวมทั้งสิ้น 21 isolates ไปจัดจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและข้อมูลทางพันธุกรรมโดยวิเคราะห์ลำดับเบสบน ribosomal DNA ส่วน Internal Transcribed Spacers (ITS1-5.8S-ITS2, ITS) และ large subunit (LSU) สามารถจัดจำแนกได้ทั้งหมด 19 isolates โดยพบว่ามีการกระจายตัวอยู่ใน phylum Basidiomycota และ Ascomycota รวม 6 orders ได้แก่ Agaricales, Capnodiales, Pleosporales, Botryosphaerales, Diaporthales และ Xylariales โดยมี 2 isolates ที่ไม่สามารถจัดจำแนกได้คือ MA132 และ MA148 สำหรับราเอนโดไฟท์ที่สร้างเอนไซม์ lipase ได้แก่ MA1, MA2 และ PMA1 แยกได้จากต้นแสมดำ (*Avicennia officinalis*) จำแนกได้เป็น *Diaporthe* sp. MA1, *Diaporthe* sp. MA2 และ *Cladosporium* sp. PMA1 ส่วนราเอนโดไฟท์ที่สร้างเอนไซม์ cellulase ได้แก่ MA145, MA130 และ MA150 ที่แยกได้จากต้นโกงกางใบใหญ่ (*Rhizophora mucronata*) ต้นตะบูน (*Xylocarpus granatum*) และต้นฝาดดอกแดง (*Lumnitzera littorea*) จำแนกได้เป็น Pleosporales sp. MA130, Botryosphaerales sp. MA145 และ *Massarina corticola* MA150 ตามลำดับ จากผลการทดลองทั้งหมดแสดงให้เห็นว่า ราเอนโดไฟท์จากพืชป่าชายเลนมีความหลากหลายทางชีวภาพ และสามารถสร้าง lipase และ cellulase ได้

Thesis Title Screening of Endophytic Fungi from Mangrove Plants which Produce Lipase, Cellulase Amylase or Protease Enzymes
Author Miss Prapaipit Chaowalit
Major Program Microbiology
Academic Year 2008

ABSTRACT

Endophytic fungi were isolated from mangrove plants in the south of Thailand. Three hundred isolates were screened for their abilities to produce lipase and cellulase and 180 isolates were screened for amylase and protease production using basal medium supplemented with 1% tributyrin, 0.5% carboxymethylcellulose (CMC), 2% soluble starch and 2% sodium caseinate for lipase, cellulase, amylase and protease, respectively. The ratio of clear zone diameter to that of colony diameter were calculated and recorded as extracellular enzyme production ratios (EPR). 31.7, 24.0 and 1.1% of the tested fungi exhibited lipase, cellulase and amylase activities, respectively while none of them produced protease. The first three lipase producers (MA1, MA2 and PMA1) and cellulase producers (MA130, MA145 and MA150) were evaluated for enzyme production. Cellulase activity was evaluated using both submerged and solid substrate fermentations. It was found that MA130, MA145 and MA150 exhibited the highest activities between 0.2-0.3 U/ml in submerged fermentation with 1% CMC as substrate. For solid substrate fermentation using rice straw with 75% moisture and rice straw mixed with mangrove leaves 3:2 with 70% moisture as substrate, it was found that all tested fungi exhibited higher activities than submerged fermentation. The cellulase activities of fungi cultured on rice straw mixed with mangrove leaves 3:2 were higher activities than those on rice straw only. Isolate MA150 exhibited the highest activity of 2.7 U/ml followed by MA130 and MA145 with 1.3 and 1.1 U/ml, respectively in the solid substrate fermentation. Lipase production was evaluated using only submerged state fermentation with 1% tributyrin as substrate. No lipase activity was detected under this condition. Moreover, 47 isolates of fungi that produced lipase or cellulase were selected for other enzyme detection using API ZYM test kit. A total of 17

enzymes were detected from these fungi. All of them produced acid phosphatase (100%) followed by naphthol-AS-BI-phosphohydrolase (91.5%). Most of them produced lipolytic enzymes, esterase (C4) and esterase lipase (C8) (57.5%). Twenty-one isolates which produced lipase or cellulase were identified based on morphology and the ribosomal DNA-Internal Transcribed Spacers (ITS1-5.8S-ITS2) and large subunit (LSU) analyses. It was revealed that 19 isolates belonged to six orders; Agaricales, Capnodiales, Pleosporales, Botryosphaerales, Diaporthales and Xylariales. Two isolates were unidentified. Lipase producers: MA1, MA2 and PMA1 were from *Avicennia officinalis*. Cellulase producers: MA145, MA130 and MA150 were from *Rhizophora mucronata*, *Xylocarpus granatum* and *Lumnitzera littorea*, respectively. These isolates were identified as *Diaporthe* sp. MA1, *Diaporthe* sp. MA2, *Cladosporium* sp. PMA1, Pleosporales sp. MA130, Botryosphaerales sp. MA145 and *Massarina corticola* MA150. The results indicated that endophytic fungi from mangrove plants were diverse and able to produce lipase and cellulase.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยครั้งนี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีเนื่องมาจากบุคคลหลายฝ่ายดังต่อไปนี้ ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร อาจารย์ประจำภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้โอกาสแก่ข้าพเจ้าในการศึกษาต่อปริญญาโท ให้คำแนะนำช่วยเหลือพร้อมทั้งช่วยแก้ไขปัญหาทั้งด้านการเรียน การทำวิจัย และอื่นๆ อีกมากมาย ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.เยาวลักษณ์ ดิสรระ อาจารย์ประจำภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สำหรับคำแนะนำและการช่วยเหลือในการทำวิจัย พร้อมทั้งให้ความรู้และข้อเสนอแนะมากมายในการทำวิจัยครั้งนี้ ขอขอบพระคุณ ดร.จริยา สากยโรจน์ ห้องปฏิบัติการ phylogenetics ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) สำหรับการให้ความรู้และคำแนะนำสั่งสอนในงานวิจัยด้าน phylogenetics และยังคงสละเวลาสอนการพูดภาษาอังกฤษให้ข้าพเจ้าในวิชาสัมมนา อีกทั้งให้การดูแลข้าพเจ้าเป็นอย่างดีในระหว่างที่ทำวิจัยในห้องปฏิบัติการ phylogenetics ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.ปรียานุช บวรเรืองโรจน์ ประธานการสอบวิทยานิพนธ์ ในความกรุณาช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น และข้าพเจ้าขอขอบพระคุณอาจารย์ผ่องผกา เขียวมนตรี อาจารย์ประจำภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สำหรับความช่วยเหลือในทุกๆ ด้าน ทั้งในการทำวิจัย ด้านการเรียน และด้านต่างๆ มากมาย เป็นมากกว่าอาจารย์ขอบคุณที่เข้าใจและให้คำปรึกษาที่ดีแก่ข้าพเจ้าเสมอมา

งานวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ ประจำปี 2551 บางส่วนจากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ทุนผู้ช่วยสอน ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และขอขอบพระคุณโครงการทุนสถาบันบัณฑิตวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีไทย (Thailand Graduate Institute of Science and Technology, TGIST) สังกัดสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) กระทรวงวิทยาศาสตร์ สำหรับทุนสนับสนุนการศึกษา รวมถึงค่าใช้จ่ายส่วนตัว ตลอดจนสำเร็จการศึกษา

ข้าพเจ้าขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทุกท่านที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสารเคมี ขอบคุณ พี่ เพื่อนๆ ภาควิชาจุลชีววิทยา และสมาชิกห้องปฏิบัติการ PR504 ทุกคน พี่มุก พี่ส้ม พี่ชิง ปลา น้องฟ้า น้องเกต น้องต๋ม ที่คอยช่วยเหลือ เป็นที่ปรึกษา ให้กำลังใจ และมอบมิตรภาพดีๆ ให้ข้าพเจ้า ขอขอบคุณพี่ๆ ที่ห้องปฏิบัติการ phylogenetics ทุกคน พี่น้อยหน้า พี่วุฒิ พี่ต่อ พี่รุ่ง พี่กล้วย พี่สิตา พี่ป้อม พี่เอ๋ ที่คอยให้คำแนะนำและช่วยแก้ปัญหาต่างๆ ที่เกิดขึ้นในระหว่างการทำวิจัย ขอคุณน้ำใจ และเสียงหัวเราะที่มอบให้

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่าน ที่อบรมสั่งสอนข้าพเจ้าในด้านต่าง ๆ มาจนถึงทุกวันนี้ และที่ขาดไม่ได้คือคุณพ่อ และคุณแม่ ที่คอยเป็นกำลังใจ และสนับสนุนข้าพเจ้าในทุกๆ ด้านมาโดยตลอด

ประไพพิศ เชาวลิต

สารบัญ

สารบัญ	หน้า
รายการตาราง	(10)
รายการรูป	(12)
ลักษณะคำย่อและตัวย่อ	(15)
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
บทตรวจเอกสาร	2
วัตถุประสงค์	26
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	27
3. ผลการทดลอง	43
4. วิเคราะห์ผลการทดลอง	95
5. สรุปผลการทดลอง	108
เอกสารอ้างอิง	110
ภาคผนวก ก	124
ภาคผนวก ข	130
ภาคผนวก ค	134
ประวัติผู้เขียน	152

รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
1. ข้อมูลพื้นที่ป่าชายเลนในประเทศไทย สํารวจเมื่อ ปี พ.ศ. 2543	5
2. ตัวอย่างเอนไซม์ที่ผลิตโดยเชื้อรา	9
3. จำนวนคาร์บอนอะตอมของกรดไขมันแต่ละชนิด	11
4. จำนวนชนิดของเชื้อราที่มีรายงานการศึกษาจากป่าชายเลน	16
5. ส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR (PCR mixture)	40
6. จำนวนราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากพืชป่าชายเลน	44
7. จำนวนราเอนโดไฟท์จากพืชป่าชายเลนทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษา	45
8. ราเอนโดไฟท์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ lipase, cellulase, amylase และ protease ทดสอบโดยวิธี plate method	47
9. จำนวนราเอนโดไฟท์ที่มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์โดยแยกได้จากพืชป่าชายเลนแต่ละชนิด	48
10. ราเอนโดไฟท์ที่มีศักยภาพในการสร้าง lipase 10 อันดับแรก	49
11. ราเอนโดไฟท์ที่มีศักยภาพในการสร้าง cellulase 10 อันดับแรก	49
12. ราเอนโดไฟท์ที่มีศักยภาพในการสร้างเอนไซม์ lipase บนอาหาร tributyrin และ rhodamine B	50
13. เอนไซม์ที่สร้างโดยราเอนโดไฟท์เมื่อทดสอบด้วย API ZYM test kit	51
14. เปรียบเทียบผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์ lipase ด้วยวิธี plate method และ API ZYM test kit	59
15. ราเอนโดไฟท์ที่สร้าง lipase ชนิดต่างๆ ทดสอบโดย API ZYM test kit	59
16. เปรียบเทียบผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์ cellulase ด้วยวิธี plate method และ API ZYM test kit	60
17. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราเอนโดไฟท์ 21 isolates ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์	66
18. สรุปผลการจัดจำแนกราเอนโดไฟท์ โดยใช้ข้อมูลลำดับเบส ribosomal DNA	93
1ก อัตราส่วนการเตรียม acetate buffer pH ต่างๆ	128
1ข การเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี Nelson-Somogyi	130
2ข การเตรียมสารละลายกรดบิวทิริกมาตรฐาน	131

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
1ค รายละเอียดของเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกจากพืชป่าชายเลน โดย น.ส.จิรายุ บัวทอง	137
2ค รายละเอียดของเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกจากพืชป่าชายเลน โดย น.ส.ประไพพิศ เซาวลิต	148
3ค ผลการทดสอบเอนไซม์ cellulase เมื่อเลี้ยงราเอนโดไฟท์ในอาหารเหลว และ อาหารแข็งโดยมีฟางข้าว และฟางข้าวผสมใบพืชป่าชายเลน อัตราส่วน 3:2 เป็น สับสเตอร์ท	151

รายการรูป

รูปที่	หน้า
1. พื้นที่ป่าชายเลนของโลก	3
2. การแพร่กระจายของพื้นที่ป่าชายเลนในประเทศไทย	4
3. เส้นใยของราเอนโดไฟท์ที่เจริญภายในพืช	17
4. เส้นใยของราเอนโดไฟท์เข้าสู่ผนังเซลล์ของพืชชายเลน	22
5. ตำแหน่งของยีนส่วน ITS และ LSU ที่ใช้ในการศึกษา	39
6. เฟอร์เซนต์ของเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากส่วนต่างๆ ของพืชป่าชายเลน	43
7. การทดสอบการสร้างเอนไซม์ของราเอนโดไฟท์โดยวิธี plate method	46
8. การทดสอบการสร้างเอนไซม์ด้วยชุดทดสอบ (API ZYM test kit)	50
9. จำนวนของเอนไซม์ที่ราเอนโดไฟท์สร้างได้ ทดสอบด้วยชุดทดสอบ (API ZYM test kit)	58
10. ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ cellulase ที่ราเอนโดไฟท์ MA130, MA145, MA150 และ <i>Aspergillus</i> sp. (control) สร้างเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่มี carboxymethylcellulose ความเข้มข้น 1% (w/v) เป็นสับสเตรท	62
11. การเจริญของราเอนโดไฟท์ MA130, MA145, MA150 และ <i>Aspergillus</i> sp. ในอาหารเหลว ที่มี carboxymethylcellulose ความเข้มข้น 1% (v/v) เป็นสับสเตรท	62
12. การเจริญของราเอนโดไฟท์ (ก) MA150 (ข) MA145 (ค) MA130 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีฟางข้าวและใบพืชป่าชายเลนอัตราส่วน 3:2 เป็นสับสเตรท	63
13. ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ cellulase ที่ราเอนโดไฟท์ MA130, MA145, MA150 และ <i>Aspergillus</i> sp. สร้างในอาหารแข็งที่มีฟางข้าวเป็นสับสเตรท	64
14. ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ cellulase ที่ราเอนโดไฟท์ MA130, MA145, MA150 และ <i>Aspergillus</i> sp. (control) สร้างในอาหารที่มีฟางข้าวผสมกับใบพืชป่าชายเลนอัตราส่วน 3:2 เป็นสับสเตรท	64
15. ลักษณะโคโลนีราเอนโดไฟท์จำนวน 18 isolates ที่สร้างเอนไซม์ที่นำมาจัดจำแนกชนิด	68
16. ลักษณะโคโลนีและโคนิเดียของราเอนโดไฟท์จำนวน 3 isolates ที่สร้างเอนไซม์ที่นำมาจัดจำแนกชนิด	69

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
17. MPTที่เหมาะสมที่สุดจากการวิเคราะห์ส่วน LSU rDNA sequence โดย หลักการ MP ของราเอนโดไฟท์ MA56 ที่	72
18. MPTที่เหมาะสมที่สุดจากการวิเคราะห์ส่วน ITS rDNA sequence โดยหลักการ MP ของ ราเอนโดไฟท์ MA56	73
19. MPTที่เหมาะสมที่สุดจากการวิเคราะห์ส่วน LSU rDNA sequence โดย หลักการ MP ของราเอนโดไฟท์ order Capnodiales (MA111 และ PMA1)	76
20. MPTที่เหมาะสมที่สุดจากการวิเคราะห์ส่วน ITS rDNA sequence โดยหลักการ MP ของราเอนโดไฟท์ MA111	77
21. MPTที่เหมาะสมที่สุดจากการวิเคราะห์ส่วน LSU rDNA sequence โดย หลักการ MP ของราเอนโดไฟท์ order Pleosporales (MA150, MA158 และ MA164)	80
22. MPTที่เหมาะสมที่สุดจากการวิเคราะห์ส่วน ITS rDNA sequence โดยหลักการ MP ของราเอนโดไฟท์ order Pleosporales (MA122, MA130, MA150, MA158 และ MA164)	81
23. MPTที่เหมาะสมที่สุดจากการวิเคราะห์ส่วน LSU rDNA sequence โดย หลักการ MP ของราเอนโดไฟท์ order Botryosphaeriales (MA127, MA140, MA145, MA161 และ MA169)	84
24. MPTที่เหมาะสมที่สุดจากการวิเคราะห์ส่วน ITS rDNA sequence โดยหลักการ MP ของราเอนโดไฟท์ order Botryosphaeriales (MA127, MA140 และ MA145)	85
25. MPTที่เหมาะสมที่สุดจากการวิเคราะห์ส่วน LSU rDNA sequence โดย หลักการ MP ของราเอนโดไฟท์ order Diaporthales (MA1, MA81 และ MA154)	88
26. ค่า MPTที่เหมาะสมที่สุดจากการวิเคราะห์ส่วน ITS rDNA sequence โดย หลักการ MP ของราเอนโดไฟท์ order Diaporthales (MA1, MA2 และ MA81)	89
27. MPTที่เหมาะสมที่สุดจากการวิเคราะห์ส่วน ITS rDNA sequence โดยหลักการ MP ของราเอนโดไฟท์ order Xylariales (MA105 และ MA129)	92
1x กราฟมาตรฐานกลูโคส	131

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
2ข กราฟมาตรฐานกรดบิวทีริก	132
3ค แผ่นมาตรฐานเทียบสีของชุด API ZYM test kit	133

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

°C	=	degree celcius
U/ml	=	unit/milliliter
pH	=	hydrogen ion concentration
%	=	percentage
µ/ml	=	microgram/milliliter
µl	=	microliter
ng	=	nanogram
mM	=	millimolar
µM	=	micromolar
M	=	molar
v/v	=	volume/volume
w/v	=	weight/volume

บทที่ 1

บทนำ

บทนำตั้งเรื่อง

มีการประมาณการกันว่าความหลากหลายทางชีววิทยาของเชื้อราในโลกมีประมาณ 1.5 ล้านสายพันธุ์ พบในประเทศไทยประมาณ 6,000 สายพันธุ์ (Jones and Hyde, 2004) ราบกเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมากมายหลายชนิดแต่เนื่องจากการทำวิจัยกันอย่างแพร่หลายเป็นเวลานาน ทำให้ปัจจุบันการที่จะค้นพบสารเมทาบอลิท์ใหม่ๆ จากราบกมีน้อยลงดังนั้นจึงมีผู้สนใจค้นหาสารเมทาบอลิท์จากรากลุ่มอื่นๆ เช่น ราทะเล และ ราเอนโดไฟท์เพิ่มมากขึ้น ภาคใต้ของไทยมีพื้นที่ติดทะเล ทำให้มีทรัพยากรป่าชายเลนกระจายอยู่ในหลายพื้นที่ มีรายงานการวิจัยหลายฉบับเกี่ยวกับเชื้อราที่เกี่ยวข้องกับป่าชายเลน แต่การศึกษาเกี่ยวกับเชื้อราเอนโดไฟท์จากพืชป่าชายเลนยังจำกัดอยู่ในวงแคบ (Maria *et al.*, 2005) ราเอนโดไฟท์เป็นราที่อาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อพืช โดยไม่ทำให้เกิดโรค สันนิษฐานได้ว่ามีอยู่ในพืชทุกชนิด (Gao *et al.*, 2005; Muller *et al.*, 2001; Lumyong *et al.*, 2002) ราเอนโดไฟท์เป็นแหล่งของสารเมทาบอลิท์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ ที่มีประโยชน์ทางการแพทย์ การเกษตร และทางอุตสาหกรรม (Tan and Zou, 2001) โดยเฉพาะเอนไซม์ มีรายงานพบเอนไซม์หลายชนิดที่สร้างโดยราเอนโดไฟท์ โดยราจะสร้างเอนไซม์เพื่อการเข้าสู่พืชที่เป็นเจ้าบ้าน เพื่อการแพร่พันธุ์และการเจริญเติบโต ตัวอย่างเอนไซม์ที่สร้างจากราเอนโดไฟท์ เช่น pectinase, xylanase, cellulase และ lipase ส่วนเอนไซม์ protease และ phenoloxidase พบได้ไม่บ่อยนัก (Wang *et al.*, 2006)

อุตสาหกรรมหลายประเภทจำเป็นต้องใช้เอนไซม์พื้นฐานหลายชนิดเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในกระบวนการผลิตและเพิ่มประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์โดยเฉพาะเอนไซม์ lipase, cellulase, amylase และ protease ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้พบได้ในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ต่างๆ ทั้งรา ยีสต์ และแบคทีเรีย โดยการผลิตเอนไซม์จากเชื้อราได้รับความนิยมเป็นอย่างมากเนื่องจาก เลี้ยงง่ายและให้ผลผลิตสูงสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่างๆ ที่ต้องใช้เอนไซม์เข้ามาเกี่ยวข้อง เอนไซม์ lipase ใช้ในอุตสาหกรรมหลายประเภท เช่น ผงซักฟอก ผลิตภัณฑ์นม และกระบวนการผลิตเครื่องหนัง เป็นต้น เอนไซม์ cellulase นำมาใช้ในการย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งจำพวกเซลลูโลส เช่น วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ และอุตสาหกรรมกระดาษ และสิ่งทอ เป็นต้น เอนไซม์ amylase นำมาใช้ในการบวนการย่อยสลายแป้ง ใช้ในอุตสาหกรรมสิ่งทอและการผลิตผงซักฟอก เป็นต้น และ

เอนไซม์ protease ใช้ในอุตสาหกรรมผลิตอาหาร การผลิตผงซักฟอก และอุตสาหกรรมยา เป็นต้น (Kavitha *et al.*, 1997) นอกจากนี้เอนไซม์ lipase, protease และ amylase ยังมีบทบาทในการจัดการสิ่งแวดล้อม โดยใช้ในการบำบัดน้ำเสียและขยะในชุมชนด้วย (ขจีนาฏ, 2541) เนื่องจากการเติบโตของอุตสาหกรรมต่างๆ เหล่านี้ทำให้ความต้องการในการใช้เอนไซม์เพิ่มขึ้น จึงจำเป็นต้องหาแหล่งของเอนไซม์ใหม่ๆ เพื่อสนองตอบความต้องการของภาคอุตสาหกรรม (Torres *et al.*, 2003)

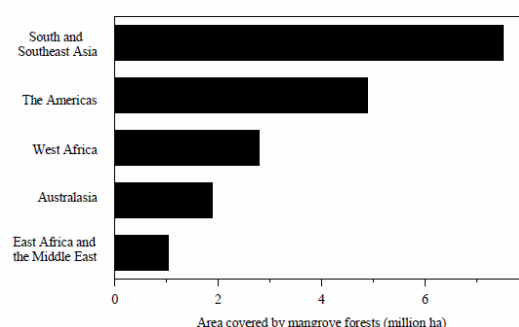
บทตรวจเอกสาร

1.1 ป่าชายเลน

ป่าชายเลนหรือป่าโกงกาง มีชื่อภาษาอังกฤษว่า “mangrove forest”, “intertidal forest”, “coastal woodlands” หรือ “oceanic rain forests” เป็นกลุ่มสังคมพืชที่ขึ้นอยู่ตามแนวชายฝั่งในเขตน้ำล้นต่ำสุด และน้ำขึ้นสูงสุด บริเวณปากแม่น้ำ อ่าว ทะเลสาบ บึงน้ำเค็ม และเกาะ ซึ่งเป็นบริเวณที่น้ำทะเลท่วมถึง (Kathiresan and Bingham, 2001; Sridhar, 2004) อีกความหมายหนึ่งหมายถึงสังคมพืชที่ประกอบด้วยพันธุ์ไม้หลายชนิดหลายตระกูล ทั้งไม้ยืนต้นซึ่งเป็นพวกที่มีใบเขียวตลอดปี (evergreen species) ซึ่งส่วนใหญ่เป็นไม้ไม่ผลัดใบ นอกจากนี้ยังมีพันธุ์พืชอื่นๆ เช่น ไม้พุ่ม ปาล์ม และเฟิร์น ที่มีการปรับตัวทางโครงสร้างที่คล้ายคลึงกัน ทำให้สามารถเจริญเติบโตในที่ที่น้ำทะเลท่วมถึง ดินเป็นดินเลน หรือดินเลนปนทราย และสามารถทนต่อสภาวะที่มีเกลือได้ การเจริญเติบโตของพันธุ์ไม้ในป่าชายเลนจะขึ้นอยู่กับแนวเขต แต่ละแนวเขตจะประกอบด้วยพืชกลุ่มเดียวกัน ซึ่งแตกต่างไปจากสังคมพืชบก โดยส่วนใหญ่ป่าชายเลนจะแพร่กระจายอยู่ในบริเวณแถบโซนร้อน (tropical region) ส่วนเขตเหนือหรือใต้โซนร้อน (sub-tropical region) จะพบป่าชายเลนอยู่บ้างแต่ไม่มาก (Gilbert *et al.*, 2002; Cheng *et al.*, 2008)

พื้นที่ป่าชายเลนมีประมาณ 1 ใน 4 ของพื้นที่ชายฝั่งโดยแพร่กระจายอยู่ใน 112 ประเทศทั่วโลก (Sridhar, 2004) ส่วนใหญ่มักพบป่าชายเลนในกลุ่มประเทศภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยเฉพาะในประเทศอินโดนีเซีย มาเลเซีย พม่า และไทย เป็นต้น พื้นที่ป่าชายเลนของโลกมีประมาณ 113,428,089 ไร่ อยู่ในเขตร้อน 3 เขตใหญ่ คือ เขตร้อนแถบเอเชีย มีพื้นที่ประมาณ 52,559,339 ไร่ หรือ ร้อยละ 46.4 ของป่าชายเลนทั้งหมด (รูปที่ 1) โดยประเทศอินโดนีเซียมีป่าชายเลนมากที่สุดถึง 26,568,818 ไร่ สำหรับในเขตร้อนอเมริกา มีพื้นที่ป่าชายเลนทั้งหมดประมาณ 39,606,250 ไร่ หรือร้อยละ 34.9 ของพื้นที่ป่าชายเลนทั้งหมด ในเขตร้อนอเมริกา ประเทศบราซิลมีพื้นที่ป่าชายเลนประมาณ 15,625,000 ไร่ รองจาก

อินโดนีเซีย ส่วนเขตร้อนแอฟริกาที่มีพื้นที่ป่าชายเลนน้อยที่สุดประมาณ 21,262,500 ไร่ หรือร้อยละ 18.7 ของพื้นที่ป่าชายเลนทั้งหมด โดยประเทศไนจีเรียมีพื้นที่ป่าชายเลน 6,062,500 ไร่ (www.wikipedia.org/wiki/%E0%B8%9B%E0%B9%88%E0%B8%B2%E0%B8%8A%E0%B8%B2%E0%B8%A2%E0%B9%80%E0%B8%A5%E0%B8%99)



ก

ข

รูปที่ 1 พื้นที่ป่าชายเลนของโลก (ก) พื้นที่ป่าชายเลนโดยรวมของโลก (ข) พื้นที่ป่าชายเลนเปรียบเทียบกันระหว่างภูมิภาคต่างๆ ของโลก

ที่มา: (ก) <http://www.dmcr.go.th/st03/forest2.html>

(ข) Kathiresan and Bingham (2001)

1.1.1 การแพร่กระจายของพื้นที่ป่าชายเลนในประเทศไทย

ประเทศไทยมีพื้นที่ป่าชายเลนมากเป็นอันดับ 9 ของประเทศในเขตร้อนแถบเอเชียตลอดชายฝั่ง 24 จังหวัด ประมาณ 2,614 กิโลเมตร เป็นพื้นที่ป่าชายเลนร้อยละ 36 ของความยาวชายฝั่งทั้งหมด โดยป่าชายเลนในประเทศไทยมีแหล่งแพร่กระจายในบริเวณชายฝั่งทะเลตะวันออก ภาคกลาง และภาคใต้ ซึ่งจากการสำรวจเมื่อปี 2543 (ตารางที่ 1) พบว่ามีพื้นที่ป่าชายเลนประมาณ 2441.61 ตารางกิโลเมตร การกระจายและปริมาณของพื้นที่ป่าชายเลนในจังหวัดต่างๆ ของประเทศไทย ส่วนมากจะมีมากทางภาคใต้ ประมาณ 1,525,997.67 ไร่ หรือ โดยพบทั้งชายฝั่งตะวันออกซึ่งติดกับอ่าวไทย และฝั่งตะวันตกด้านทะเลอันดามัน ส่วนภาคตะวันออกมีประมาณ 142,130 ไร่ และภาคกลางบริเวณอ่าวไทยตอนบนมีพื้นที่ป่าชายเลนน้อยมากประมาณ 75,335 ไร่ ของพื้นที่ป่าชายเลนทั้งหมดของประเทศ (รูปที่ 2)

ภาคใต้ซึ่งมีเนื้อที่ประมาณ 1,566,381.25 ไร่ โดยจะพบป่าชายเลนเป็นแนวยาวติดต่อกันทางชายฝั่งทะเลด้านตะวันตกหรือด้านทะเลอันดามันในเขตจังหวัดระนอง พังงา กระบี่ ตรัง และสตูล ส่วนชายฝั่งตะวันออกหรือด้านอ่าวไทย จะพบตาม

ปากแม่น้ำ และลำน้ำใหญ่ๆ ในจังหวัดชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช สงขลา และปัตตานี
(<http://www.forest.go.th/stat/stat44/TAB3.html>;

<http://www.kmitl.ac.th/agritech/nutthakorn/sproject/patcharapong/mangrove/index.html>;

<http://www.talaythai.com/Education/42620260e/42620260e.php3>)



รูปที่ 2 การแพร่กระจายของพื้นที่ป่าชายเลนในประเทศไทย

ที่มา: <http://www.dmcr.go.th/st03/forest2.html>

ตารางที่ 1 ข้อมูลพื้นที่ป่าชายเลนในประเทศไทย สํารวจเมื่อ ปี พ.ศ. 2543

จังหวัด	พื้นที่จังหวัด (ตารางกิโลเมตร)	พื้นที่ป่าชายเลน (ตารางกิโลเมตร)	%
กรุงเทพมหานคร	1,569.98	3.2	0.2
สมุทรสาคร	858.41	33.8	3.9
สมุทรสงคราม	409.01	24.6	6.0
เพชรบุรี	6,220.65	57.5	0.9
ประจวบคีรีขันธ์	6,366.92	1.5	0.0
ตราด	2,853.95	92.5	3.2
จันทบุรี	6,271.20	99.8	1.6
ระยอง	3,699.60	13.3	0.4
ชลบุรี	4,483.56	10.4	0.2
ฉะเชิงเทรา	5,176.60	11.4	0.2
ชุมพร	5,980.68	80.1	1.3
สุราษฎร์ธานี	13,138.54	35.3	0.3
นครศรีธรรมราช	9,970.80	98.8	1.0
พัทลุง	3,740.41	31.6	0.8
สงขลา	7,790.25	46.7	0.6
ปัตตานี	1,957.06	35.7	1.8
ระนอง	3,128.16	252.7	8.1
พังงา	3,950.25	454.6	11.5
ภูเก็ต	543.16	19.2	3.5
กระบี่	4,796.96	350.0	7.3
ตรัง	4,823.71	335.0	6.9
สตูล	2,610.35	353.4	13.5
นราธิวาส	4,487.51	0.7	0.0
รวมทั้งประเทศ	104,827.72	2,441.61	2.3

ที่มา: <http://www.forest.go.th/stat/stat44/TAB3.html>

1.1.2 พันธุ์ไม้ในป่าชายเลน (www.talaythai.com/Education/42620260e/42620260e.php3)

ในป่าชายเลนมีไม้ชนิดต่างๆ ทั้งไม้ยืนต้นและไม้พุ่ม จากการสำรวจพันธุ์ไม้ป่าชายเลนของประเทศไทย พบว่ามีจำนวน 35 วงศ์ 53 สกุล และ 74 ชนิด ไม้เหล่านี้อาจจำแนกได้เป็น 2 ประเภท ได้แก่ ไม้ที่เด่นและไม้อื่นๆ ไม้ที่เด่นและสำคัญเป็นองค์ประกอบหลักของป่าชายเลน เช่น วงศ์ Rhizophoraceae โดยเฉพาะในสกุล โกงกาง (*Rhizophora*) ซึ่งประกอบด้วย โกงกางใบเล็ก (*Rhizophora apiculata*) โกงกางใบใหญ่ (*Rhizophora mucronata*) สกุลไม้โปรง (*Ceriops*) ซึ่งได้แก่ โปรงขาว (*Ceriops decandra*) โปรงแดง (*Ceriops tagal*) สกุลไม้ถั่ว (*Bruguiera*) ซึ่งได้แก่ ถั่วขาว (*Bruguiera cylindrica*) ถั่วดำ (*Bruguiera parviflora*) พังกาหัวสุมดอกแดง (*Bruguiera gymnorrhiza*) และพังกาหัวสุมดอกขาว (*Bruguiera sexangula*) พันธุ์ไม้ในวงศ์ Meliaceae ได้แก่ ตะบูนขาว (*Xylocarpus granatum*) และตะบูนดำ (*Xylocarpus moluccensis*) วงศ์ Avicenniaceae ได้แก่ แสมขาว (*Avicennia alba*) และแสมดำ (*Avicennia officinalis*) และพันธุ์ไม้ในวงศ์ Sonneratiaceae ได้แก่ ลำพู (*Sonneratia caseolaris*) และลำแพน (*Sonneratia ovata*) ไม้อื่นๆ เช่น ตาตุ่ม (*Excoecaria agallocha*) หงอนไก่ทะเล (*Heritiera littoralis*) ฝาดดอกแดง (*Lumnitzera littorea*) ฝาดดอกขาว (*Lumnitzera racemosa*) หลุมพอทะเล (*Intsia bijuga*) และสี้ง่า (*Soyphiphora hydrophyllacea*) เป็นไม้ที่ขึ้นประกอบปะปนไปกับไม้ประเภทเด่นและสำคัญในบางพื้นที่ สำหรับไม้พื้นล่างหรือไม้ที่ขึ้นอยู่บริเวณพื้นป่าชายเลนมีอยู่หลายชนิดด้วยกัน เช่น จาก เบ้ง หวายลิง เหงือกปลาหมอ พวงเถาวัลย์ และพวกปรัง เป็นต้น

1.1.3 การปรับตัวของพืชป่าชายเลน

(www.talaythai.com/Education/42620260e/42620260e.php3)

พันธุ์พืชทุกชนิดในป่าชายเลน มีการปรับตัวเปลี่ยนแปลงลักษณะบางประการของส่วนต่างๆ ทั้งลำต้น ใบ ดอก ผล ตลอดจนระบบรากให้เหมาะสม เพื่อทนทานต่อสภาพแวดล้อมป่าชายเลน โดยสามารถอยู่รอด เจริญเติบโต และแพร่กระจายพันธุ์ต่อไปอย่างต่อเนื่อง ได้แก่

1. เซลล์ผิวใบมีผนังหนา เป็นแผ่นมัน และมีปากใบ (stoma) ที่ผิวใบด้านล่างลักษณะเช่นนี้พบในพืชทุกชนิดในป่าชายเลน ซึ่งมีหน้าที่สำหรับป้องกันการระเหยของน้ำจากส่วนของใบ

2. มีต่อมขับเกลือ (salt glands) พบอยู่ทั่วไปในส่วนของใบแสม ลำพู ลำแพน และเหงือกปลาหมอ เป็นต้น หน้าที่สำคัญของต่อมขับเกลือ คือ ควบคุมระดับความเข้มข้นของเกลือในพืชโดยขับออกจากส่วนใบ

3. ใบมีลักษณะอวบน้ำ (succulent leaves) โดยเฉพาะพืชพวกโกงกาง (*Rhizophora*) และลำพู-ลำแพน (*Sonneratia*) ซึ่งเป็นลักษณะที่ช่วยเก็บรักษาน้ำจืด

4. มีรากหายใจ (aerial roots) พบในพืชป่าชายเลนเกือบทุกชนิด ซึ่งแต่ละชนิดจะมีรากหายใจลักษณะต่างกันไป เช่น แสม มีรากหายใจโผล่จากดิน ส่วนโกงกาง รากหายใจแทงออกจากต้นลงดิน เพื่อช่วยค้ำยันลำต้นด้วย

5. มีผลงอกขณะติดอยู่บนลำต้น ที่เรียกว่า vivipary เช่น ในโกงกางซึ่งในดอก 1 ดอก มีรังไข่ (ovary) 1 อัน และมีโอวูล 4 อัน แต่มีเพียงโอวูลเดียวที่เจริญเติบโตเป็นเมล็ด และเมล็ดของพืชนี้ไม่มีการพักตัว จะเจริญเติบโตทันทีขณะผลยังติดบนต้นแม่ จัดเป็น viviparous seed เพราะส่วนของต้นอ่อน (embryo) ในเมล็ดจะงอกส่วนของรากอ่อน (radicle) แทะทะลุออกมาทางปลายผล ตามด้วยส่วนของ hypocotyl ซึ่งจะยื่นยาวออกกลายเป็นฝักยาว 1-2 ฟุต เมื่อฝักแก่เต็มที่จะหล่นปักเลนโคนต้น หรือลอยไปตามกระแสน้ำ ต่อมาจะงอกรากและเจริญเติบโตเป็นต้นใหม่ต่อไป นอกจากโกงกางแล้ว ยังมีไม้ถั่ว พังกาหัวสุม โปรง ต้นจาก เล็บมือนาง และแสม คือ พบผลหรือฝักหลุดจากต้นแม่แล้วสามารถเจริญเติบโตทางด้านความสูงอย่างรวดเร็ว และชูขึ้นเหนือน้ำในระยะสั้น

6. ต้นอ่อนหรือผลแก่ลอยน้ำได้ ทำให้สามารถแพร่กระจายพันธุ์โดยทางน้ำได้อย่างดี พบในพืชเกือบทุกชนิดในป่าชายเลน

7. มีระดับสาร tannin ในเนื้อเยื่อสูง และแตกต่างกันออกไปในแต่ละชนิด การปรับตัวนี้อาจจะเกิดขึ้นเพื่อการป้องกันอันตรายจากพวกเชื้อราต่างๆ

8. สามารถทนทานได้ในสภาวะที่ระดับความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ในใบสูง ทั้งนี้ เพื่อความอยู่รอดเมื่อขึ้นอยู่ในน้ำทะเลที่เค็มได้ พันธุ์พืชทุกชนิดในป่าชายเลนสามารถปรับตัวดังกล่าวนี้ได้

1.2 ความสำคัญของเชื้อรา

เชื้อราเป็นกลุ่มของจุลินทรีย์ที่มีมากมายหลายชนิด พบแพร่กระจายอยู่ทั่วไปในธรรมชาติ เช่น ในอากาศ ในน้ำ ในดิน บางชนิดอยู่กับส่วนประกอบต่างๆ ของพืช เช่น บนผิวของพืช (epiphytic fungi) ภายในเซลล์พืช (endophytic fungi) และอยู่กับรากพืช (mycorrhiza) เป็นต้น บางชนิดอาศัยอยู่กับแมลง และในสิ่งแวดล้อมอื่นๆ เช่น อยู่กับซากพืช ซากสัตว์ เป็นต้น (Rossman, 1994) โดยเชื้อราเป็นแหล่งของเอนไซม์ และสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ (natural products) สามารถนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรม และการประยุกต์ใช้ทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพต่างๆ (Lodge, 1997; Cheng *et al.*, 2008; Raghukumar, 2008) การนำเชื้อรามาใช้ประโยชน์ เช่น สร้างสารต้านจุลินทรีย์ (Wiyakrutta *et al.*, 2004; Mygind *et al.*, 2005) การผลิตเอนไซม์ (Lumyong *et al.*, 2002; Urairuj *et al.*, 2003) ใช้ในกระบวนการผลิตอาหาร การผลิตยาฆ่าโรค เป็นสารควบคุมทางชีวภาพ (Cheng *et al.*, 2008) เป็นต้น

ด้วยเหตุนี้จึงทำให้เชื้อราเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีความน่าสนใจในการศึกษา เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ ดังกล่าวมาแล้วข้างต้น (Ho *et al.*, 2003)

นอกจากนี้ บทบาทหน้าที่ที่สำคัญของเชื้อราในระบบนิเวศน์คือเป็นผู้ย่อยสลายเริ่มแรก ในธรรมชาติ (Georgieva *et al.*, 2005) เนื่องจากเชื้อราเป็นจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ได้หลายชนิดเพื่อย่อยสลายและเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของสับสเตรท (substrate) เพื่อให้สับสเตรทเน่าเปื่อยและกลายเป็นอาหารของจุลินทรีย์อื่นๆ ในระบบนิเวศน์ (Jordaan *et al.*, 2006) ซึ่งเชื้อราเพียงชนิดเดียวไม่สามารถสร้างเอนไซม์เหล่านี้ได้ทั้งหมด ดังนั้นจึงต้องอาศัยเชื้อราหลายชนิดที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ต่างๆ เพื่อการย่อยสับสเตรทที่สมบูรณ์ (Kaushik and Hynes, 1971) ซึ่งมีการคาดการณ์กันว่าราเอนโดไฟท์น่าจะเป็นแหล่งที่มีการสร้างเอนไซม์ที่สำคัญและเป็นผู้ย่อยสลายที่ดีหลังจากที่พืชเจ้าบ้านเสื่อมสภาพ (Muller *et al.*, 2001; Osono *et al.*, 2004)

1.3 เอนไซม์

เอนไซม์ คือ โปรตีนที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยา และมีบทบาทในการควบคุมกระบวนการทางชีวเคมีในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ ได้แก่ พืช สัตว์ และจุลินทรีย์ ในปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่งนั้น สารที่เข้าทำปฏิกิริยากันมีชื่อเรียกว่าสับสเตรท โดยส่วนใหญ่แล้วเอนไซม์ชนิดหนึ่งๆ จะสามารถเร่งปฏิกิริยาที่มีสับสเตรทชนิดใดชนิดหนึ่งโดยเฉพาะเท่านั้นนอกจากนี้ เอนไซม์ยังมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายสารอินทรีย์ การก่อโรคในเจ้าบ้าน และการเน่าเสียของอาหาร เป็นต้น ดังนั้นจึงสามารถแยกเอนไซม์ได้จากสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น พืช สัตว์ และจุลินทรีย์ การนำเอนไซม์ไปใช้ประโยชน์มีมาอย่างยาวนาน โดยนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมเครื่องนุ่งห่ม และสิ่งทอ (amylase, cellulase, oxidoreductase) อุตสาหกรรมสารซักล้างและสารทำความสะอาด (protease, lipase, cellulase, oxidoreductase) อุตสาหกรรมอาหาร (pectinase, protease, cellulase, oxidase) อุตสาหกรรมกระดาษ (xylanase, oxidoreductase, lipase) และ อุตสาหกรรมเครื่องหนัง (protease, lipase) เป็นต้น ซึ่งจุลินทรีย์ได้แก่ ยีสต์ รา และ แบคทีเรีย เป็นแหล่งของเอนไซม์ที่สำคัญต่างๆ หลายชนิด (ตารางที่ 2) เนื่องจากจุลินทรีย์สามารถสร้างเอนไซม์ได้หลากหลายชนิด พบได้บ่อย มีไม่จำกัด นอกจากนี้ยังสามารถเพิ่มผลผลิตได้โดยการปรับปรุงสายพันธุ์ ซึ่งไม่สามารถทำได้ในสัตว์และพืช ทำให้ในปัจจุบันมีเอนไซม์ทางการค้าหลายชนิดที่ผลิตจากจุลินทรีย์ ซึ่งมีคุณสมบัติแตกต่างกัน ขึ้นกับชนิดของจุลินทรีย์และการควบคุมสภาวะในการผลิต (จूरรัตน์, 2541; Alves *et al.*, 2002)

ตารางที่ 2 ตัวอย่างเอนไซม์ที่ผลิตโดยเชื้อรา

จุลินทรีย์	เอนไซม์ที่เชื้อสร้าง
<i>Humicola lanuginosa</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>A. flavus</i> , <i>Mucor miehei</i> , <i>Cunninghamella echinulata</i>	lipase, lipoprotein lipase
<i>Trichoderma</i> sp., <i>A. niger</i> , <i>Rhizopus</i> sp.	protease
<i>A. niger</i> subsp. <i>awamori</i> , <i>Trichoderma reesei</i>	cellulase, β - glucosidase
<i>A. niger</i>	xylanase
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> , <i>H. grisea</i>	lignin peroxidase, manganese peroxidase, laccase
<i>A. niger</i>	mannanase
<i>A. niger</i>	phytase
<i>Fusarium</i> sp.	chitinase

ที่มา: Ibrahim (2008)

เชื้อราจัดเป็นแหล่งสำคัญในการผลิตเอนไซม์ โดยส่วนใหญ่เชื้อราสามารถสร้างเอนไซม์ออกมาภายนอกเซลล์ (extracellular enzyme) เพื่อเร่งปฏิกิริยาในการย่อยสลายสารประกอบโมเลกุลใหญ่ๆ ที่มีลักษณะโครงสร้างทางเคมีที่สลับซับซ้อนและไม่ละลายน้ำ เช่น เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และ ลิกนิน เพื่อย่อยวัสดุเหล่านั้นให้เป็นโมเลกุลเล็กๆ ที่สามารถละลายน้ำได้ และนำเข้าสู่เซลล์ได้ (Kathiresan and Bingham, 2001) ดังนั้นเชื้อราจึงเป็นแหล่งของเอนไซม์ที่สำคัญหลายชนิด ได้แก่

1.3.1 เอนไซม์ lipase

กลุ่มของเอนไซม์ย่อยสลายไขมัน (lipolytic enzyme) ได้แก่ เอนไซม์ esterase (carboxylesterases EC 3.1.1.1) และ เอนไซม์ lipase (triacylglycerol acylhydrolases EC. 3.1.1.3) เรียกอีกชื่อหนึ่งว่า glycerol ester hydrolase หรือ acylglycerol hydrolase โดยเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้เป็นเอนไซม์ในกลุ่มไฮโดรเลส (hydrolase) ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ ตรงพันธะเอสเทอร์ของสับสเตรท โดยเอนไซม์ lipase เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสับสเตรทที่ไม่ละลายน้ำโดยทำปฏิกิริยาตรงผิวระหว่างน้ำกับสับสเตรท ระหว่างกรดไขมันโมเลกุลยาวกับกลีเซอรอลได้ผลิตภัณฑ์เป็นไดกลีเซอไรด์

โมโนกลีเซอไรด์ กรดไขมัน และ กลีเซอรอล ปฏิกริยาสามารถเกิดแบบย้อนกลับได้เมื่อสภาวะต่าง ๆ ในปฏิกริยาเหมาะสม (Torres *et al.*, 2003; Hiol *et al.*, 1999; Maia *et al.*, 1999; Gulati *et al.*, 2005) ในทางตรงข้ามถ้าสับสเตรทสามารถละลายน้ำได้เอนไซม์ lipase จะทำงานได้ช้ามาก ในขณะที่เอนไซม์ esterase มีความสามารถในการย่อยสลายสับสเตรทที่สามารถละลายน้ำได้ นอกจากนี้แล้วเอนไซม์ lipase มีความสามารถในการย่อยสลายสับสเตรทที่มีคาร์บอนอะตอมมากกว่าหรือเท่ากับ 10 ส่วน esterase มีความสามารถในการย่อยสลายสับสเตรทที่มีจำนวนคาร์บอนอะตอมน้อยกว่าหรือเท่ากับ 10 (Fucinos *et al.*, 2005) จำนวนอะตอมของกรดไขมันแต่ละชนิดแสดงดังตารางที่ 3

Lipase ถูกนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมและการสังเคราะห์สารต่าง ๆ มากมาย เช่น อุตสาหกรรมการผลิตโกล์กั๊ตเตอร์ และสารลดแรงตึงผิว ใช้ในกระบวนการผลิตอาหาร ใช้ในทางเภสัชกรรม อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง และอุตสาหกรรมสารซักล้าง เป็นต้น เชื้อราที่สามารถสร้างเอนไซม์ lipase มีหลายชนิด เช่น *M. hiemalis f. hiemalis*, *Rhizopus oryzae*, *A. sydowii*, *F. verticillioides* เป็นต้น (Hiol *et al.*, 1999)

ตารางที่ 3 จำนวนคาร์บอนอะตอมของกรดไขมันแต่ละชนิด

Systemic name	Trivial name	Carbon atom
butanoic acid	butyric acid	4
pentanoic acid	valeric acid	5
hexanoic acid	caproic acid	6
octanoic acid	caprylic acid	8
nonanoic acid	pelargonic acid	9
decanoic acid	capric acid	10
dodecanoic acid	lauric acid	12
tetradecanoic acid	myristic acid	14
hexadecanoic acid	palmitic acid	16
heptadecanoic acid	margaric (daturic) acid	17
octadecanoic acid	stearic acid	18
eicosanoic acid	arachidic acid	20
docosanoic acid	behenic acid	22
tetracosanoic acid	lignoceric acid	24
hexacosanoic acid	cerotic acid	26

ที่มา: <http://www.cyberlipid.org/fa/acid0001.html>

1.3.2 เอนไซม์ cellulase

เอนไซม์ cellulase (EC 3.2.1.4) เป็นกลุ่มของ hydrolytic enzyme ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ เช่น น้ำตาลกลูโคส cellulase มีบทบาทสำคัญในกระบวนการย่อยสลายส่วนประกอบของพืชซึ่งส่วนใหญ่ประกอบด้วยลิกโนเซลลูโลส โดยทั่วไปเชื่อว่าจะสร้างเอนไซม์ cellulase ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์ย่อยๆ 3 ชนิด ดังนี้ (Romeo *et al.*, 1999)

1 Endo-1,4- β -D-glucanase (CMCase (EC. 3.2.1.4)) ทำหน้าที่ย่อยโมเลกุลของเซลลูโลสทั้งในรูปที่เป็นระเบียบ และไม่เป็นระเบียบ (amorphous) รวมทั้งโมเลกุลของ cellooligomer ที่ตำแหน่ง β -1,4 แบบสุ่มทำให้ได้ oligomer และเซลโลไบโอส

2 Exo-1,4- β -D-glucanase (FPase (EC. 3.2.1.91)) หรือ 1,4- β -D-glucan cellobiohydrolase (CBH) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ร่วมกับเอนไซม์ endo- β -1,4-glucanase ในการย่อยสลายโมเลกุลของเซลลูโลสโดยย่อยจากปลายด้าน non-reducing ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายส่วนใหญ่ คือ น้ำตาลเซลโลไบโอส

3 β -D-Glucoside glucanohydrolase (cellobiase (EC. 3.2.21)) หรือ β -glucosidase ทำหน้าที่ย่อยโมเลกุลของเซลโลไบโอส และ cellooligosaccharide ให้เป็นกลูโคส

การทำงานของเอนไซม์ทั้ง 3 ตัวนี้ในการย่อยสลายเซลลูโลส เป็นการทำงานร่วมกันในรูปแบบที่เรียกว่า synergistic action โดย endoglucanase จะย่อยสลายแบบสุ่ม ทำให้ได้สายเซลลูโลสที่เหมาะสมที่ exoglucanase จะเข้าทำปฏิกิริยาต่อได้ รวมทั้งย่อยในส่วน crystalline cellulose ได้เซลโลไบโอส ซึ่ง β -glucosidase จะย่อยต่อได้กลูโคส 2 โมเลกุล (สมรักษ์, 2537)

ตัวอย่างเชื้อราที่สามารถสร้างเอนไซม์ cellulase ได้ เช่น *Acremonium cellulolyticus*, *A. fumigatus*, *Trichoderma reesei* และ *A. niger* เป็นต้น (Mahakhan, 2007) เอนไซม์ cellulase ได้นำมาใช้อุตสาหกรรมหลายๆ ประเภท เช่น อาหาร เครื่องดื่ม การเกษตร สิ่งทอ ผลิตภัณฑ์ซักล้าง อาหารสัตว์ กระดาษ เป็นต้น

1.3.3 เอนไซม์ protease

เอนไซม์ protease เป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่ย่อยสลายพันธะเปปไทด์ของโปรตีนหรือโพลีเปปไทด์ได้เป็นโมโนเปปไทด์ และกรดอะมิโน ซึ่งเป็นหน่วยย่อยของโปรตีน เอนไซม์มีความจำเพาะต่อสับสเตรทหลายชนิด และทำงานได้ดีในช่วง pH ที่แตกต่างกัน ทั้ง pH ที่เป็นกรด กลาง และเบส (ขจีนาฏ, 2541) เอนไซม์ protease จากจุลินทรีย์มีการจัดจำแนกได้หลายแบบ เช่น แบ่งตามช่วง pH ที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ ได้แก่

Acid protease พบได้ในรา pH ที่เหมาะสมในการทำงานคือ 2-5

Neutral protease พบได้ในราและแบคทีเรีย สามารถทำงานได้ดีที่ pH ในช่วง 7-8 neutral protease บางชนิดมีอนุมูลโลหะ เป็นส่วนประกอบที่สำคัญใน active site จึงเรียก เอนไซม์ในกลุ่มนี้ว่า metalloprotease

Alkaline protease พบได้ในรา และแบคทีเรีย สามารถทำงานได้ในช่วง pH ที่แตกต่าง คือ ในช่วง 9-11 เอนไซม์ในกลุ่มนี้จะมีกรดอะมิโน ได้แก่ trypsin และ serine อยู่ที่ศูนย์กลางของ active site (Borris, 1987)

นอกจากนี้สามารถแบ่งกลุ่มของ protease ได้ตามกลไกการทำงาน ได้แก่

Serine proteases, Sulfhydryl proteases, Metal- containing proteases และ Acid protease

เอนไซม์ protease มีการนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมด้านอาหาร และไม่เกี่ยวข้องกับอาหาร เช่น การฟอกหนัง และอาหารสัตว์ เป็นต้น (ปราณี, 2543)

1.3.4 เอนไซม์ amylase

เอนไซม์ amylase เป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล (ชจินาฏ, 2541) ซึ่งแป้งประกอบด้วย amylose และ amylopectin โครงสร้างของ amylose ประกอบด้วย โมเลกุลของกลูโคสที่ต่อกันเป็นสายยาวด้วย α -(1,4)-glycosidic linkage ส่วน amylopectin ประกอบด้วยโมเลกุลของกลูโคส ที่ต่อกันแบบสายตรงด้วย α -(1,4)-glycosidic linkage และมีการแตกกิ่งของกลูโคสโดยต่อกันด้วย α -(1,6)-glycosidic linkage

เอนไซม์ amylase สามารถจำแนกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ ได้แก่ exoamylase, endoamylase และ debranching enzymes

1. Exoamylase ประกอบด้วย

Glucoamylase เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยแป้งที่ตำแหน่ง α -(1,4)-glycosidic bond ที่ตำแหน่งจากปลาย non-reducing end ผลที่ได้คือกลูโคส นอกจากนี้เอนไซม์ glucoamylase ยังสามารถย่อยแป้งที่ตำแหน่ง α -(1,6)-glycosidic bond ได้แต่มีอัตราการย่อยช้า

β -amylase เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการย่อยแป้งจากปลาย non-reducing end เข้าไปที่ตำแหน่ง α -(1,4)-glycosidic bond ได้ผลผลิตเป็นน้ำตาลมอลโตส

2. Endoamylase ประกอบด้วย

α -amylase เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายแป้งแบบสุ่มที่ตำแหน่ง α -(1,4)-glycosidic bond สำหรับ α -amylase จากราคจะแตกต่างจากแบคทีเรียโดยที่ผลผลิตที่ได้ส่วนใหญ่เป็นกลูโคสและมอลโตส

3. Debranching enzymes ประกอบด้วย

Pullulanase เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการย่อยโมเลกุลของ amylopectin ที่ตำแหน่ง α -(1,4)-glycosidic bond และ α -(1,6)-glycosidic bond ได้หน่วยของมอลโตทริโอส

Isoamylase เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการย่อยโมเลกุลของ amylopectin ที่ตำแหน่ง α -(1,6)-glycosidic bond (Forgarth, 1983, Borriss, 1987)

เอนไซม์ amylase มีการนำไปประยุกต์ใช้อย่างกว้างขวางทางเทคโนโลยีชีวภาพ เช่น ในอุตสาหกรรมน้ำเชื่อมที่มีน้ำตาลหลายชนิดเข้ามาเกี่ยวข้อง เช่น โอลิโกแซคคาไรด์ มอลโตส และกลูโคส (Forgarth, 1983)

1.4 เชื้อรากับป่าชายเลน

ป่าชายเลนเป็นระบบนิเวศที่มีความอุดมสมบูรณ์ ประกอบไปด้วยสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ จำนวนมากที่สามารถปรับตัวอยู่ได้ ความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตในป่าชายเลนเป็นไปในแง่ของการถ่ายทอดพลังงานในห่วงโซ่อาหาร เริ่มต้นด้วยเศษอินทรีย์สาร (detritus) ซึ่งได้จากการสลายตัวของส่วนต่างๆ ของพืชในบริเวณป่าชายเลนโดยจุลินทรีย์ผู้ย่อยสลาย (Sarma *et al.*, 2001; Ananda and Sridhar, 2004) อินทรีย์วัตถุเหล่านี้จะเป็นอาหารของพวกกินเศษอินทรีย์วัตถุ เช่น แอมฟิพอด หอย กุ้ง ปู และ ตัวอ่อนของแมลงต่างๆ จากพื้นก็จะถูกกินต่อกันไปตามลำดับขั้นของห่วงโซ่อาหาร ด้วยเหตุนี้จึงเป็นปัจจัยที่ส่งเสริมให้มีความหลากหลายของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ เช่น แบคทีเรีย แอคติโนมัยซีท และเชื้อรา โดยเชื้อราถือเป็นกลุ่มของจุลินทรีย์ผู้ย่อยสลายที่สำคัญ ซึ่งมีบทบาทสำคัญในกระบวนการถ่ายทอดพลังงานและเป็นผู้ผลิตอินทรีย์สารในระบบนิเวศนี้ (Kathiresan and Bingham, 2001) ราทะเล หรือราที่สามารถอยู่ในสิ่งแวดล้อมทางทะเลสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม (กลุ่ม obligate และ facultative) คือ กลุ่มที่สามารถเจริญและสืบพันธุ์ในสิ่งแวดล้อมทางทะเล และกลุ่มที่สามารถเจริญและสืบพันธุ์บนบกและแหล่งน้ำจืดรวมทั้งสภาวะแวดล้อมทางทะเลได้ (Hyde *et al.*, 1998) ราที่อาศัยอยู่ในสิ่งแวดล้อมทางทะเลจำเป็นต้องมีการปรับตัวเพื่อให้สามารถอยู่ในสิ่งแวดล้อมนั้นๆ ได้ จึงเป็นแหล่งที่น่าสนใจในการประยุกต์ใช้ทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพ ซึ่งราที่อยู่ในระบบนิเวศทางทะเล เช่น ราเอนโดไฟท์ที่อาศัยอยู่กับสาหร่าย หญ้าทะเล และพืชป่าชายเลน หรือราที่มีความสามารถในการย่อยสลายพืช หรือซากพืช แสดงว่าราเหล่านั้นเป็นแหล่งสำคัญที่ผลิต wood-degrading enzyme ที่มีความสำคัญในการนำไปประยุกต์ใช้กับอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมการทำกระดาษ และการย่อยเนื้อไม้ เป็นต้น (Raghukumar, 2008) เนื่องจากราที่มีความสามารถเป็นผู้ย่อยสลายจึงสามารถสร้างเอนไซม์เพื่อย่อยสลายสับสเตรทชนิดต่างๆ ได้ โดยราสามารถสร้างเอนไซม์เพื่อจะแทรกซึมเข้าสู่พืชเพื่อการเจริญในพืชเหล่านั้นหรือเพื่อย่อย

สลายเมื่อพืชเหล่านั้นตายลง ซึ่งพืชจะประกอบด้วยสับสเตรทหลายชนิด เช่น ลิกโนเซลลูโลส เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ (cell wall) ประกอบด้วย เซลลูโลส 40-50 เปอร์เซ็นต์ เฮมิเซลลูโลส 25-40 เปอร์เซ็นต์ และ ลิกนิน 18-33 เปอร์เซ็นต์ เพคติน และแป้งที่สะสมอยู่ใน เซลล์พืช (Ananda and Sridhar, 2004) ใยของพืชป่าชายเลนจะมีองค์ประกอบที่แตกต่างกันไป เช่น ประกอบด้วย tannin, mucous, crystalliferous oil และ laticifers (Kathiresan and Bingham, 2001) นอกจากนี้ Mfilling และคณะ (2005) พบว่าใยของพืชป่าชายเลน เช่น พังกาหัวสุม (*Bruguiera gymnorrhiza*) ยังประกอบไปด้วยไขมัน และกรดไขมัน

รากจากพืชป่าชายเลนได้รับการรายงานครั้งแรกโดย Kohlmeier และ Kohlmeier (1979) พบรา 43 ชนิด ได้แก่ Ascomycetes 23 ชนิด Deuteromycetes 17 ชนิด และ Basidiomycetes 3 ชนิด เมื่อมีการศึกษาต่อมาพบราในกลุ่ม Ascomycota, Basidiomycota, Deuteromycota, thraustochytrids และ กลุ่มราชั้นต่ำ (lower fungi) (Hyde *et al.*, 1998; Shearer *et al.*, 2007) โดยแยกเชื้อได้จากสับสเตรทชนิดต่างๆ กัน ดังตารางที่ 5 นอกจากนี้ Mehdi และ Saifullah (1992) แยกจากรากตัวอย่างน้ำจืดจากป่าชายเลนพบเชื้อ *Alternaria maritima*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. sulfuris*, *Aureobasidium pullulans*, *Bispora* sp., *Botrytis* sp., *Cladosporium* sp., *Humicola* sp., *Mucor* sp., *Penicillium* sp., *Phoma* sp., *Pythium* sp. และ *Rhizopus* sp. ส่วนตัวอย่างใบไม้สด และเปลือกไม้ พบเชื้อ *A. maritima*, *Aureobasidium pullulans*, *Cladosporium* sp., *Humicola* sp., *Phoma* sp. และ *Pythium* sp. นอกจากนี้ Alias และ Jones (2000) ทำการศึกษาจากรากโกงกางใบเล็ก (*R. apiculata*) พบรา 53 ชนิด ได้แก่ ascomycetes 39 ชนิด deuteromycetes 13 ชนิด และ basidiomycete 1 ชนิด ส่วน Ananda และ Sridhar (2004) ศึกษาเชื้อราที่อยู่ที่ไม่ และใยของพืชป่าชายเลน พบรา 78 ชนิด แบ่งได้เป็น 2 กลุ่มคือ ascomycetes 32 ชนิด และ mitosporic fungi 46 ชนิด นอกจากนี้ยังมีรายงานพบว่าราที่แยกได้จากป่าชายเลนมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ที่น่าสนใจ Raghukumar และคณะ (1994) พบว่าราที่แยกจากดินทุกชนิดสามารถสร้าง lignocellulose-modifying exoenzymes และพบว่าราที่แยกจากใยของ *R. apiculata* ที่นำเปื่อยทุกชนิดสามารถสร้างเอนไซม์ cellulase ได้ บางชนิดสามารถสร้างเอนไซม์ amylase, xylanase, pectinase และ protease ได้

ตารางที่ 4 จำนวนชนิดของเชื้อราที่มีรายงานการศึกษาจากป่าชายเลน

Substrate	Species	Comment
ใบอ่อนของพืชป่าชายเลน	50	ส่วนใหญ่เป็นพวกราบก
ใบไม้ที่ร่วงทับถม	20	ยังมีข้อมูลไม่เพียงพอ
ส่วนกิ่งและลำต้นของพืช	57	มีข้อมูลเพียงเล็กน้อย
เอนโดไฟท์	20	-
บริเวณรอบๆ รากพืช	25	มีข้อมูลน้อย
ไม้ที่แช่น้ำ	174 (+95)	มีการศึกษามาก
ผลและรากอากาศ	5	มีการศึกษาน้อย
ตะกอนดิน	124	ส่วนใหญ่พบราบก
Total species	477 (+95)	-

ที่มา: Hyde และคณะ (1998)

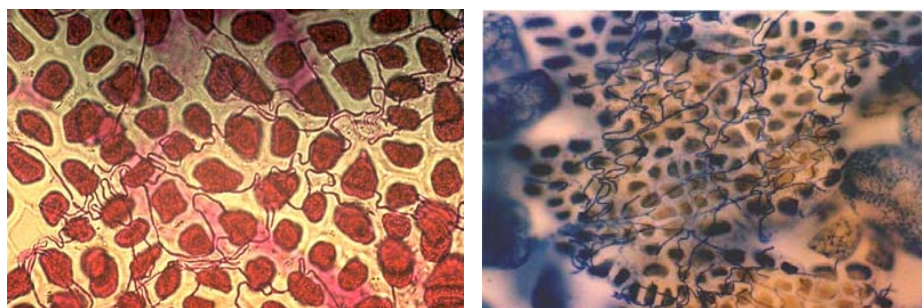
1.5 ราเอนโดไฟท์ (endophytic fungi)

เอนโดไฟท์ คือ สิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในช่องว่างระหว่างเซลล์ของพืชที่ยังมีชีวิตอยู่ อาจเป็นช่วงหนึ่งหรือตลอดวงจรชีวิตและไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อพืช โดยอยู่แบบพึ่งพาอาศัยกันภายในพืช (Tanaka *et al.*, 2002; Chareprasert *et al.*, 2006) ซึ่งกลุ่มของสิ่งมีชีวิตเหล่านี้ได้แก่ แบคทีเรีย แอคติโนมัยซีท และรา (Raghukumar, 2008) มีบางการศึกษาพบราเอนโดไฟท์เป็นชนิดเดียวกับราก่อโรคพืช ซึ่งอาจเนื่องมาจากราก่อโรคเข้าไปแอบแฝงอยู่ในเซลล์พืช และจะก่อโรคเมื่อพืชอ่อนแอ (Petrini, 1991)

1.5.1 การแพร่กระจายของราเอนโดไฟท์

ราเอนโดไฟท์สามารถพบได้ในพืชทุกชนิดโดยเฉพาะพืชในเขตร้อน เช่น กล้วย (Brown *et al.*, 1998; Phothita *et al.*, 2001; 2004), หญ้า (Saikkonen *et al.*, 2000), พืชป่าชายเลน (Suryanarayanan *et al.*, 1998; Kumaresan and Suryanarayanan, 2001; Kumaresan *et al.*, 2002) และปาล์ม (Fröhlich and Hyde 1999, Taylor *et al.*, 1999; Fröhlich *et al.*, 2000) เป็นต้น โดยราเอนโดไฟท์สามารถเจริญอยู่ภายในหรือช่องว่างระหว่างเซลล์ของพืชที่สมบูรณ์ แข็งแรง (รูปที่ 5) (Petrini, 1991; Ghimire and Hyde, 2004) พืชที่มีราเอนโดไฟท์อาศัยอยู่มีลักษณะเป็นปกติทุกประการและไม่สามารถเห็นเส้นใยของราเอนโดไฟท์ที่อยู่ภายในเซลล์พืชได้ด้วยตาเปล่า การศึกษาเกี่ยวกับราเอนโดไฟท์มักทำได้โดยการศึกษาในห้องปฏิบัติการ โดยทำ

การแยกรากจากพืชโดยวิธี plate method ซึ่งต้องมีการฆ่าเชื้อที่พื้นผิวของพืชที่ต้องการศึกษา รูปแบบการแพร่กระจายตัวของราเอนโดไฟท์จากพืชต้นหนึ่งไปสู่พืชอีกต้นหนึ่ง ขึ้นอยู่กับระยะการเจริญของราเอนโดไฟท์ ถ้าราเอนโดไฟท์อยู่ในช่วงที่เจริญเป็นเส้นใยจะสามารถถ่ายทอดผ่านทางเมล็ดซึ่งเส้นใยของราเอนโดไฟท์จะเจริญอยู่ภายในเมล็ดซึ่งเป็นผลผลิตจากต้นพืชที่มีราเอนโดไฟท์อาศัยอยู่ เมื่อเมล็ดงอกเป็นต้นอ่อน ราเอนโดไฟท์ก็จะเจริญอยู่ในพืชต้นนั้นๆ ต่อไปเรียกกระบวนการนี้ว่า vertical transmission แต่ถ้าราอยู่ในช่วงสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (sexual) โดยการสร้างสปอร์ ราเอนโดไฟท์จะแพร่กระจายจากต้นหนึ่งไปสู่อีกต้นหนึ่งโดยอาศัยสปอร์ เรียกกระบวนการดังกล่าวว่า horizontal transmission (Faeth, 2002)



ก

ข

รูปที่ 3 เส้นใยของราเอนโดไฟท์ที่เจริญภายในพืช (ก) และ เจริญภายในเมล็ดพืช (ข)

ที่มา: (ก) <http://www.aesop.rusger.edu/belangerlab/research.html>

(ข) http://www.aboutrtf.com/endophyte_seed.html

1.5.2 ความสัมพันธ์ของราเอนโดไฟท์ที่มีต่อพืชอาศัย

จากความหมายของคำว่า “ราเอนโดไฟท์” ซึ่งหมายถึง ราที่สามารถเจริญเติบโตและอาศัยภายในเซลล์หรือช่องว่างระหว่างเซลล์ของพืชที่มีชีวิต โดยไม่ก่อให้เกิดโรคหรือผลเสียต่อพืชอาศัย (Tanaka *et al.*, 2002) เข้าสู่เซลล์พืชทางปากใบ (stoma) ซึ่งต่างจากรากโรค (pathogenic fungi) ที่เข้าสู่เซลล์พืชได้ทางผนังเซลล์อย่างเฉยๆ เท่านั้น และต้องอาศัยอยู่ภายในเซลล์พืชเท่านั้น (Schulz *et al.*, 2002) ราเอนโดไฟท์มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ได้หลายชนิดที่จำเป็นในการเข้าไปอยู่ภายในเซลล์ของพืช เจริญเติบโต และอยู่รอดภายในเซลล์ของพืช ซึ่งความสัมพันธ์ระหว่างราและพืชอาศัยเป็นแบบพึ่งพาอาศัยกัน (symbionts) หรืออาจเป็นเชื้อแอบแฝง (latent pathogens) โดยราเอนโดไฟท์ได้สารอาหารจากพืชอาศัย และราจะสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ ที่มีประโยชน์ต่อพืช เช่น สารต้านเชื้อก่อโรคที่จะมาทำอันตรายพืช สารต้านแมลงต่างๆ ที่จะมารุกรานพืช เป็นต้น Schulz และคณะ (2002) ตั้งสมมติฐานเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างพืชเจ้าบ้านและราเอนโดไฟท์ว่า ความสัมพันธ์

ระหว่างสิ่งมีชีวิตทั้งสองอยู่ภายใต้กลไกการควบคุมของพืชเจ้าบ้าน ถ้าเมื่อใดที่กลไกนี้เสียไป ราเอนโดไฟท์อาจกลายเป็นราก่อโรคพืช และทำอันตรายต่อพืชได้ แต่อย่างไรก็ตามบทบาทและหน้าที่ของราเอนโดไฟท์ที่มีต่อพืชเจ้าบ้านแต่ละชนิดยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด (Chareprasert *et al.*, 2006) ดังนั้นการศึกษาและวิจัยเกี่ยวกับราเอนโดไฟท์ ส่วนใหญ่มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาถึงความสัมพันธ์ และหน้าที่ของราเอนโดไฟท์ที่มีต่อพืชอาศัย และประโยชน์ของราเอนโดไฟท์ในทางชีวภาพ ซึ่งมีการนำไปประยุกต์ใช้กันอย่างกว้างขวางทางด้าน การแพทย์ ด้านอุตสาหกรรมเกษตร และด้านอุตสาหกรรมต่างๆ เป็นต้น

1.5.2.1 ความสามารถของราเอนโดไฟท์ในการสร้างเอนไซม์

ในธรรมชาติราสามารถสร้างเอนไซม์เพื่อเป็นปัจจัยในการก่อโรค (pathogenicity) และย่อยสลายสับสเตรทต่างๆ ราเอนโดไฟท์เป็นจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ได้หลายชนิดเพื่อย่อยสลายสับสเตรทที่เป็นองค์ประกอบต่างๆ ของพืชซึ่งมีโมเลกุลใหญ่ เพื่อการเข้าไปเจริญเติบโตในเซลล์ของพืช กินอาหารภายในเซลล์ และเพื่อย่อยสลายพืชเมื่อพืชนั้นๆ เสื่อมสภาพหรือตายลง (Schulz *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2006; Champreda *et al.*, 2007) นอกจากนี้ราเอนโดไฟท์บางชนิดมีความสามารถในการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ได้ เช่น ราเอนโดไฟท์ *Piriformospora indica* สามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ nitrate reductase และ glucan-water dikinase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีหน้าที่ในการย่อยสลายแป้ง (Sherameti *et al.*, 2005) Schulz และคณะ (2002) พบว่าราเอนโดไฟท์สามารถสร้างเอนไซม์ protease, amylase, phenoloxidase, lipase, cellulase, xylanase และ pectinlyase ซึ่งเอนไซม์ protease และ phenoloxidase พบได้ในราเอนโดไฟท์บางชนิดเท่านั้น (Wang *et al.*, 2006) มีรายงานการวิจัยพบว่าราเอนโดไฟท์เป็นชนิดเดียวกับราก่อโรคพืช และพบว่าราเอนโดไฟท์บางชนิดสามารถสร้างเอนไซม์ได้ชนิดเดียวกับราก่อโรคพืช เช่น เอนไซม์ phosphatase, cellulase, cutinase, protease และ pectinase ซึ่งราก่อโรคพืชจะหลั่งเอนไซม์เหล่านี้เพื่อเข้าสู่เนื้อเยื่อพืชและแย่งอาหารจากพืช (Maccheroni and Azevedo, 1998) ถ้าราเอนโดไฟท์มีความสัมพันธ์แบบพึ่งพาอาศัยกับพืช พบว่าราสามารถสร้างเอนไซม์ cellulase, mannanase และ xylanase (Choi *et al.*, 2005) รูปแบบความสัมพันธ์ของการสร้างเอนไซม์ของราเอนโดไฟท์ในพืชเจ้าบ้านยังไม่แน่ชัด บางรายงานการวิจัยกล่าวว่าการสร้างเอนไซม์ต่างๆ ของราเอนโดไฟท์อาจถูกควบคุมโดยสถานะของสารอาหารภายในเซลล์พืช โดยพืชสามารถกด และชักนำให้ราสร้างเอนไซม์ได้ (Centis *et al.*, 1997) มีงานวิจัยหลายฉบับที่ศึกษาการสร้างเอนไซม์ชนิดต่างๆ จากราเอนโดไฟท์ เช่น

Maccheroni และ Azevedo (1998) ศึกษาการหลั่งและการสังเคราะห์เอนไซม์ phosphatase จากเชื้อ *Colletotrichum musae* ที่แยกได้จากใบกล้วยที่ปกติ ซึ่งถูกควบคุมด้วยปริมาณสารอาหารต่างๆ กัน ในขณะที่ Marlida และคณะ (2000) ได้ศึกษาการสร้างเอนไซม์

ย่อยแป้งดิบจากราเอนโดไฟท์ 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Acremonium* sp., *Synnematous* sp., *Gibberella pulicaris* และ *Nodulisporium* sp. พบว่าเชื้อราทั้ง 4 สายพันธุ์สามารถสร้างเอนไซม์ชนิดนี้ได้โดยเอนไซม์จาก *Acremonium* sp. สามารถย่อยแป้งดิบได้ทั้งที่มีขนาดเล็กและขนาดใหญ่ ส่วนเชื้ออีก 3 สายพันธุ์ สามารถย่อยแป้งดิบขนาดเล็กเท่านั้น นอกจากนี้ Tanaka และคณะ (2002) ศึกษาราเอนโดไฟท์ที่สามารถย่อยสลายโพลีแซคคาไรด์ ซึ่งได้ผลผลิตเป็น lepidimoide ซึ่งเป็นสารที่นำไปใช้ในการยับยั้งการเจริญของรากพืช โดยทั่วไป lepidimoide ได้จากการสังเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ Oses และคณะ (2006) ได้ทำการแยกราเอนโดไฟท์จากต้นไม้ในประเทศชิลี 2 species ได้แก่ *Drimys winteri* และ *Prumnopitys andina* พบราสายพันธุ์ *Bjerkandera* sp. และ *Mycelia sterilia* สามารถสร้างเอนไซม์ cellulase ได้ Jordaan และคณะ (2006) แยก ราเอนโดไฟท์จาก *Colophospermum mopane* ที่สามารถสร้างเอนไซม์ cellulase พบว่า *Alternaria* 6 สายพันธุ์, *Phoma* 2 สายพันธุ์ และ *Phomopsis* 3 สายพันธุ์ สามารถสร้างเอนไซม์ cellulase ได้ นอกจากนี้ Wang และคณะ (2006) ศึกษาการสร้างเอนไซม์ laccase จากราเอนโดไฟท์ *Monotospora* sp. ที่แยกได้จากหญ้าแพรง (*Cynodon dactylon*) ซึ่งเอนไซม์นี้มีความสำคัญในการย่อยสลายลิกนิน และมีการศึกษากันน้อยในราเอนโดไฟท์

สำหรับในประเทศไทย มีรายงานการศึกษาเอนไซม์จากราเอนโดไฟท์ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2545 โดย Lumyong และคณะ (2002) ได้ศึกษาการสร้างเอนไซม์ cellulase, mannanase, protease และ xylanase จากราเอนโดไฟท์ ที่แยกจากพืชพื้นเมืองบนดอยสุเทพ พบว่าราสามารถสร้างเอนไซม์ได้หลายชนิดโดยเฉพาะเอนไซม์ mannanase ต่อมา Urairuj และคณะ (2003) ศึกษาการสร้างเอนไซม์ย่อยลิกนิน (ligninolytic enzyme) จากเชื้อในกลุ่ม Xylariaceae ซึ่งเป็นราเอนโดไฟท์ที่แยกจากพืชพื้นเมืองทางภาคเหนือของประเทศไทยพบว่าสายพันธุ์ CMUX144 สามารถสร้างเอนไซม์ที่ย่อยสลายลิกนิน ชนิด manganese independent peroxidase ได้ดีที่สุด ในปี พ.ศ. 2550 Champreda และคณะ (2007) ศึกษาพบว่าราเอนโดไฟท์ *Fusicocum* sp. BCC4124 สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งได้ดีมากเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่ชักนำให้เกิดการสร้างเอนไซม์และในสับสเตรทหลายชนิด และแยกได้เอนไซม์ α -amylase ที่ทนความร้อน และทนกลูโคส มีศักยภาพสูงที่จะนำไปใช้ทางเทคโนโลยีชีวภาพ นอกจากนี้ Theantana และคณะ (2007) ได้ทำการคัดเลือกราเอนโดไฟท์ที่สร้างเอนไซม์ asparaginase ที่แยกได้จากพืชสมุนไพรไทย 5 ชนิด พบว่าราเอนโดไฟท์ 25 จาก 117 isolates สามารถสร้างเอนไซม์ชนิดนี้ได้ ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้เป็นเอนไซม์ที่สำคัญที่ใช้รักษามะเร็ง

1.5.2.2 ความสามารถของราเอนโดไฟท์ในการเป็นผู้ย่อยสลาย

ราเอนโดไฟท์ไม่เพียงแต่พบอยู่ในพืชที่มีชีวิตแต่ยังพบในพืชที่กำลังจะถูกย่อยสลายด้วย (Katz and Lieth, 1980; Fisher and Petrini, 1992) บทบาทหน้าที่ของราเอนโดไฟท์ในการเป็น

ผู้ย่อยสลายสามารถอธิบายได้ว่าเมื่อพืชเจ้าบ้านที่ราเอนโดไฟท์อาศัยอยู่เสื่อมสภาพหรือใกล้ตาย ราเอนโดไฟท์จะสร้างเอนไซม์ต่างๆ เช่น cellulase, xylanase, ligninase หรือ pectinase เพื่อเริ่มกระบวนการย่อยสลายเนื้อเยื่อพืชเหล่านั้นก่อนเชื้อรากลุ่ม saprophyte ที่มาจากสิ่งแวดล้อมภายนอก (Schulz *et al.*, 2002) เมื่อเกิดการย่อยสลายจะทำให้เกิดการหมุนเวียนของวัฏจักรอาหารและแร่ธาตุซึ่งมีความสำคัญต่อสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นต่อไป มีรายงานการศึกษาหลายฉบับพบว่าราเอนโดไฟท์สามารถสร้าง wood-degrading enzyme เช่น ligninase เพื่อย่อยสลายลิกโนเซลลูโลสซึ่งเป็นองค์ประกอบของเซลล์พืช (Raghukumar, 2008) ราเอนโดไฟท์กลุ่ม xylariaceous และ rhytismataceous สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินได้ ซึ่งถือว่ามีความสามารถในการเป็นผู้ย่อยสลายที่ดี (Uriraj *et al.*, 2003)

Muller และคณะ (2001) ศึกษาความหลากหลายของราเอนโดไฟท์ใน Norway spruce needles และความสามารถในการย่อยสลายเมื่อพืชได้ตายลง ซึ่งพบว่า เชื้อรา *Tiaraspora parka* ทำให้น้ำหนักของ Norway spruce ลดลง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อราชนิดนี้มีความสามารถในการย่อยสลาย

1.5.3 ราเอนโดไฟท์จากพืชป่าชายเลน

พืชป่าชายเลนเป็นแหล่งของราเอนโดไฟท์มากมายหลายชนิดโดยสามารถอาศัยอยู่ในภายในเซลล์หรือระหว่างเซลล์ของพืชที่มีชีวิต (รูปที่ 4) ซึ่งราชนิดเดียวกันสามารถอาศัยอยู่ในพืชเจ้าบ้านได้หลายชนิด และต้นพืชชนิดเดียวกันอาจมีราเอนโดไฟท์อาศัยได้หลายชนิดเช่นกัน (Kumaresan and Suryanarayanan, 2001) แต่มีราบางชนิดที่พบในพืชที่จำเพาะไม่เจอในพืชชนิดอื่น (Shearer *et al.*, 2007) ราเอนโดไฟท์ที่พบในส่วนของพืชที่แตกต่างกันหรือช่วงอายุที่แตกต่างกัน และฤดูกาลที่แตกต่างกัน จะมีความแตกต่างกันด้วย ตามที่ Yang และคณะ (2006) ศึกษาราเอนโดไฟท์ที่ได้จากพืชป่าชายเลนจากจังหวัดฟูเจียนในประเทศจีนพบว่าเชื้อราบางชนิด เช่น *Penicillium*, *Alternaria*, *Dothiorella* และ เชื้อราที่ไม่สร้างสปอร์บางชนิดสามารถพบได้บ่อยในต้นรังกะแท้ (*Kandelia candel*) ในขณะที่เชื้อรา ได้แก่ *Cephalosporium*, *Alternaria* และ *Penicillium* พบบ่อยในต้นถั่วขาว (*Bruguiera gymnorrhiza*) นอกจากนี้แล้ว Sridhar (2004) พบว่าราเอนโดไฟท์ที่พบจากพืชป่าชายเลนส่วนใหญ่เป็นราที่พบบนบกมากกว่าราทะเล และ Cheng และคณะ (2008) พบว่าราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากพืชป่าชายเลนโดยส่วนมากเป็นกลุ่ม anamorphic fungi ซึ่งไม่พบระยะสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ

มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับราเอนโดไฟท์จากพืชป่าชายเลน เช่น Kumaresan และ Suryanarayanan (2001) ทำการแยกราเอนโดไฟท์ จากพืชป่าชายเลน 7 ชนิด *Aegiceras corniculatum* (Myrsinaceae), *Avicennia marina*, *A. officinalis* (Avicenniaceae), *Bruguiera cylindrica*, *Ceriops decandra* (Rhizophoraceae), *Excoecaria agallocha* (Euphorbiaceae) และ *Lumnitzera racemosa* (Combretaceae) พบรา 3 กลุ่ม คือ anamorphic fungi,

ascomycetes และ กลุ่ม mycelia sterilia ส่วน Liu และคณะ (2007) สามารถแยกรา *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis*, *Phoma*, *Phomopsis*, *Phyllosticta* และ *Trichoderma* ได้จากพืชป่าชายเลนหลายชนิด

ราเอนโดไฟท์ที่แยกจากพืชป่าชายเลนเป็นแหล่งที่น่าสนใจในการนำไปประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ ได้เช่น เป็นสารควบคุมทางชีวภาพ เป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ใหม่ๆ และนำไปใช้ในด้านอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมด้านยา และอุตสาหกรรมที่เกี่ยวกับทางด้านการเกษตร เป็นต้น (Wu *et al.*, 2005; Yuan *et al.*, 2005; Cheng *et al.*, 2008) โดย Wu (1993) ได้ทำการศึกษาความสามารถของรา 25 ชนิด (42 สายพันธุ์) ที่แยกได้จากพืชป่าชายเลนในได้หวั่นพบว่าราจำพวก Ascomycetes สามารถสร้างเอนไซม์ได้หลายชนิด เช่น agarase, α -amylase, gelatinase, lipase, pectinase และ cellulase ส่วน Raghukumar และคณะ (1994) ได้ทำการทดสอบการสร้างเอนไซม์โดยราที่แยกจากใบโกงกาง (*Rhizophora apiculata*) พบว่าราที่แยกได้ทั้งหมดสามารถสร้างเอนไซม์ cellulase ได้ มีเพียงบางชนิดที่สามารถสร้างเอนไซม์ xylanase, amylase และ protease ในขณะที่ Torres และคณะ (2003) ได้ทำการคัดแยกราเอนโดไฟท์จากพืชที่ได้จากทะเลเมดิเตอร์เรเนียน ที่สามารถสร้างเอนไซม์ lipase พบว่า *R. oryzae* สามารถสร้างเอนไซม์ lipase ได้ นอกจากนี้ Maria และคณะ (2005) ได้ศึกษาการสร้างเอนไซม์จากราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากพืชป่าชายเลน 2 ชนิด *Acanthus ilicifolius* และ *Acrostichum aureum* พบว่า *Acremonium* sp. สามารถสร้างเอนไซม์ cellulase, amylase และ lipase ได้ *Alternaria chlamydosporus* สร้างเอนไซม์ cellulase, lipase และ protease ได้ *Alternaria* sp. สามารถสร้างเอนไซม์ cellulase, amylase, lipase และ protease ได้ *Aspergillus* sp. สามารถสร้างเอนไซม์ cellulase และ lipase ได้ *Fusarium* sp. สามารถสร้างเอนไซม์ cellulase และ lipase ได้ และ *Pestalotiopsis* sp. สามารถสร้างเอนไซม์ cellulase, amylase, lipase และ protease ได้



รูปที่ 4 เส้นใยของราเอนโดไฟท์เข้าสู่ผนังเซลล์ของพืชชายเลน (Raghukumar, 2008)

1.6 การจัดจำแนกชนิดของเชื้อรา

การจัดจำแนกและบ่งชี้ลักษณะเชื้อราแบบดั้งเดิม คือ อาศัยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นหลัก โดยศึกษาลักษณะของโคโลนี สีของเส้นใย ลักษณะขอบโคโลนี และอัตราการเจริญเติบโต (Bills, 1996; Umali *et al.*, 1999) ซึ่งวิธีดังกล่าวมีประสิทธิภาพในระดับหนึ่ง แต่เนื่องจากเชื้อราหลายชนิดมีลักษณะสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกันแต่อาจไม่มีบรรพบุรุษร่วมกัน (Guo *et al.*, 1998; Taylor *et al.*, 1999) และลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราส่วนใหญ่จะเปลี่ยนแปลงไปตามปัจจัยแวดล้อม ส่งผลให้การจำแนกเชื้อราเกิดการผิดพลาดได้ และการจำแนกด้วยวิธีการทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวต้องอาศัยผู้มีประสบการณ์ นอกจากนี้ปัญหาที่สำคัญอีกประการหนึ่งของวิธีการข้างต้นคือมีเชื้อราบางกลุ่มโดยเฉพาะราเอนโดไฟท์ที่ไม่สามารถสร้างโครงสร้างสืบพันธุ์และไม่สร้างสปอร์ (Mycelia sterilia) ซึ่งพบบ่อยในการศึกษาเกี่ยวกับราเอนโดไฟท์ จึงเป็นการยากในการจัดจำแนกด้วยวิธีการทางสัณฐานวิทยา จึงมีการนำวิธีการด้านชีวโมเลกุลเข้ามาช่วยแก้ไขปัญหาต่างๆ เหล่านี้เพื่อให้ได้ข้อมูลที่มีความจำเพาะมากยิ่งขึ้น การศึกษาทางชีวโมเลกุลส่วนใหญ่จะวิเคราะห์ถึงโครโมโซม ยีน และผลิตภัณฑ์ของยีน เช่น โปรตีนต่างๆ โดยวิธีการวิเคราะห์ด้วยการใช้ข้อมูลของลำดับเบส DNA (DNA sequencing method) ซึ่งเป็นที่นิยมและมีความถูกต้องมากกว่าวิธีการศึกษาสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียว และสามารถใช้ในการแยกความแตกต่างของเชื้อราแต่ละชนิดได้ โดยการศึกษาเกี่ยวกับเชื้อรามีการศึกษายีนต่างๆ มากมาย เช่น EF-1 α , ITS, partial nuclear 18S rDNA และ 28S rDNA และใช้ข้อมูลดังกล่าวนี้ควบคู่ไปกับข้อมูลทางสัณฐานวิทยา (Cheng *et al.*, 2008)

1.6.1 การจัดจำแนกโดยใช้ข้อมูลทางพันธุกรรม

การใช้ข้อมูลทางพันธุกรรมในการจัดจำแนกเชื้อรามีหลายวิธี เช่น การศึกษาปริมาณของเบส guanine กับ cytosine (GC content) ซึ่งปริมาณดังกล่าวจะเกี่ยวข้องกับอุณหภูมิที่ทำให้สาย DNA แยกออกจากกันได้ ดังนั้นสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกัน ก็จะมีปริมาณของเบส ดังกล่าวในสัดส่วนที่แตกต่างกัน สำหรับปริมาณของ GC content ของเชื้อราอยู่ในช่วง 38-63% ซึ่งจะมีความแตกต่างกันไปในเชื้อราแต่ละกลุ่ม โดยสามารถบอกได้ถึงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการได้อีกทางหนึ่ง (Storck, 1996) วิธีการต่อมาที่ทำการศึกษาได้แก่ DNA-DNA hybridization ซึ่งใช้ศึกษาถึงความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตที่มีความคล้ายคลึงกัน โดยวัดอุณหภูมิที่สามารถทำให้ DNA ลูกผสม (DNA hybrid) ระหว่างสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกันออกจากกันได้ วิธีการอื่นๆ เช่น restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) ใช้ประเมินความแตกต่างของ DNA sequences บนบริเวณจำเพาะที่ต้องการศึกษา ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ซึ่งเป็นวิธีการที่สามารถบอกถึงความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตจากแหล่งต่างๆ ได้ วิธี random amplified polymorphic DNA (RAPD) วิธีนี้ใช้ประเมินความแตกต่างของ DNA sequence โดยการทำให้ PCR ด้วย random primer ทำให้ได้ PCR product ที่มีขนาดแตกต่างกัน และจะถูกแยกออกจากกันด้วยวิธี gel electrophoresis วิธีการนี้ใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับสิ่งมีชีวิตพวก eukaryote ต่างๆ เช่น มนุษย์ เชื้อรา และพืช เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีวิธี amplified fragment length polymorphism (AFLP) เป็นเทคนิคการสร้างลายพิมพ์ DNA (DNA fingerprints) โดยตัด genomic DNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แล้วใช้ PCR เพิ่มปริมาณ DNA บางชุดเท่านั้น วิธีต่างๆ ดังกล่าวเหล่านี้แสดงผลในรูปของแถบชั้นส่วน DNA ที่มีขนาดแตกต่างกัน สามารถใช้แสดงถึงความแตกต่างของลำดับเบส DNA ซึ่งใช้ในการแยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตได้ในระดับ genus, species, subspecies, races, strain ไปจนกระทั่งถึงระดับ clone (Bridge, 2002) วิธีการทางชีวโมเลกุลดังกล่าวมีข้อดีคือสามารถหาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการและความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) ของสิ่งมีชีวิต โดยไม่จำเป็นต้องรู้ลำดับเบสของ DNA อย่างไรก็ตามในปัจจุบัน วิธีการวิเคราะห์ด้วยการใช้ข้อมูลทางลำดับเบส DNA (DNA sequencing method) เป็นที่นิยมและมีความถูกต้องมากกว่าเนื่องจากมีข้อมูลของลำดับเบส DNA ในฐานะข้อมูลต่างๆ มากมายเพื่อใช้ในการเปรียบเทียบ และสามารถบอกความสัมพันธ์และความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตแต่ละระดับชั้นอนุกรมวิธานได้มากกว่า มีลักษณะ (character) ที่ใช้ในการจัดจำแนกมากทำให้มีข้อมูลในการวิเคราะห์ที่ได้มากกว่า และยังสามารถแสดงถึงเชื้อราที่เป็น teleomorph และ anamorph ได้ด้วย

1.6.1.2 การจัดจำแนกทางพันธุกรรมโดยอาศัยข้อมูลของยีนต่างๆ

การวิเคราะห์ลำดับเบสในส่วนของ ribosomal DNA มักนิยมใช้กันโดยทั่วไปเนื่องจากเป็นบริเวณที่ถูกอนุรักษ์ไว้ในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดทั้ง eukaryotes และ prokaryote และมีความ

ผันแปรทางพันธุกรรมสูง ทำให้สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์หรือภายในสายพันธุ์เดียวกันได้ โดยสามารถบอกความสัมพันธ์ในระดับต่างๆ ของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด และเป็นเครื่องมือในการจัดจำแนกทางพันธุกรรม นอกจากนี้ยังมีข้อมูลลำดับเบส DNA ในฐานะข้อมูลต่างๆ มากมาย ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการเปรียบเทียบ บอกความสัมพันธ์และความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตของแต่ละระดับชั้นอนุกรมวิธานได้ (Liu *et al.*, 1995; Mazzola *et al.*, 1996)

ยีนส่วน ribosomal RNA เป็นยีนที่นิยมศึกษากันอย่างกว้างขวาง ในการศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ เนื่องจากยีนดังกล่าวทำหน้าที่สร้าง ribosomal RNA ซึ่งพบได้ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด (Hillis and Dixon, 1991; Hibbett, 1992; Landvik *et al.*, 1996) ยีน rDNA ของเชื้อราประกอบด้วย small subunit (SSU หรือ 18S) ซึ่งสามารถใช้ในการจัดจำแนกในระดับอนุกรมวิธานสูงๆ ได้แก่ phylum, class, order และ family (Spatafora and Blackwell, 1993; Landvik *et al.*, 1996; Jansen *et al.*, 1998) large subunit (LSU หรือ 28S) ใช้สำหรับการจัดจำแนกในระดับอนุกรมวิธานต่ำๆ ได้แก่ family, genus และ species (Ellis *et al.*, 1998; Hopple Jr. and Vilgalys, 1999; Artjariyasripong *et al.*, 2001) และส่วน internal transcribed spacers (ITS) ซึ่งเป็นบริเวณที่สำคัญในการศึกษาระดับ species หรือ ระหว่าง species ของเชื้อรา เนื่องจากบริเวณนี้เป็นบริเวณที่มีความแปรผันมากที่สุด บริเวณของ ITS ประกอบด้วย ITS1, 5.8S และ ITS2 ซึ่ง 5.8S เป็นที่มีความผันแปรต่ำ จึงเหมาะในการจำแนกอนุกรมวิธานในระดับสูงๆ นอกจากนี้ยังมีการศึกษายีนส่วน EF-1 α (Cheng *et al.*, 2008) และ beta tubulin (Guo *et al.*, 2000) ด้วย ในการศึกษาครั้งนี้ได้เลือกศึกษาส่วน ITS และ 28S rDNA ของราเอนโดไฟท์เพื่อนำข้อมูลทางพันธุกรรมที่ได้ไปใช้ในการจัดจำแนกราเอนโดไฟท์ในระดับ genus และ/หรือ species ต่อไป

1.7 วิธีการวิเคราะห์และสร้าง phylogenetic tree (เฉษฎา, 2545; ฦัฎฐฎฒิ, 2549)

1.7.1 การวิเคราะห์แบบ Maximum Parsimony (MP)

การวิเคราะห์แบบ maximum parsimony ถูกคิดค้นขึ้นเพื่อสร้าง phylogenetic tree โดยอาศัยหลักการสร้าง tree จากจำนวนการแทนที่ (substitution) หรือการเปลี่ยนแปลงของลักษณะ (character state change) ที่น้อยที่สุด เพื่ออธิบายความสัมพันธ์และอธิบายความแตกต่างของกลุ่มสิ่งมีชีวิต phylogenetic tree ที่ได้จากการวิเคราะห์ดังกล่าวจึงเรียกว่า most parsimonious tree (MPT) โดยใช้วิธีทางสถิติที่เรียกว่า K-H test ในการคัดเลือก MPT ที่เหมาะสมที่สุด ซึ่งการแทนที่หรือการเปลี่ยนแปลง อาจเป็นลักษณะของลำดับเบสของสาย DNA หรือลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนก็ได้

การวิเคราะห์แบบ maximum parsimony มีข้อดี คือ เป็นวิธีการวิเคราะห์จากลักษณะที่พัฒนามาร่วมกัน (shared and derived character) สามารถให้ข้อมูลเกี่ยวกับบรรพบุรุษ (ancestral sequence) และ ไม่ลดทอนข้อมูลในการวิเคราะห์ อย่างไรก็ตามวิธีการดังกล่าวมีข้อเสีย คือ ใช้เวลาในการวิเคราะห์นานเมื่อเทียบกับวิธีอื่นๆ เช่น แบบ Distance ใช้ข้อมูลจาก informative character เท่านั้น และถ้าพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงสูงมากอาจมีการวิเคราะห์ไม่ถูกต้อง

1.7.2 การวิเคราะห์แบบ Maximum Likelihood (ML)

เป็นการวิเคราะห์ที่ได้รับการพัฒนาจาก Felsenstein (1985) วิธีการนี้มีหลักการคล้ายกับวิธี maximum parsimony ที่วิเคราะห์ข้อมูลแต่ละหน่วย (discrete character data) แต่ maximum likelihood จะคำนวณถึงความเป็นไปได้มากที่สุด เท่าที่จะเกิดขึ้นได้ในทุกทาง เช่น คำนวณหาค่าความน่าจะเป็นสูงสุดของข้อมูลลำดับเบส DNA ที่เป็นไปได้ ของบรรพบุรุษและระหว่าง ingroup หลังจากนั้นจึงทำการรวมความเป็นไปได้ทั้งหมด แล้วสร้างออกมาเป็น phylogenetic tree ที่เรียกว่า Most Likely Tree (MLT)

1.7.3 การวิเคราะห์แบบ Distance (Neighbour Joining)

หลักการของวิธีนี้ คือการวิเคราะห์โดยใช้ค่าความต่าง และความเหมือนทางพันธุกรรม (genetic distance or similarity) ของสิ่งมีชีวิต วิธีวิเคราะห์แบบนี้มักไม่นิยมใช้ในการวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการมากนัก เมื่อเทียบกับวิธี maximum parsimony และ maximum likelihood เนื่องจากมีข้อจำกัดคือ การเปลี่ยนแปลงข้อมูลไปเป็นค่าความเหมือนหรือความต่าง ทำให้รายละเอียดของข้อมูลหายไป ข้อมูลในการวิเคราะห์ ซึ่งเป็นค่าความเหมือนหรือความต่างนี้ไม่อาจนำไปวิเคราะห์ร่วมกับวิธีแบบอื่นๆ ได้ และไม่สามารถเลือกศึกษาเฉพาะส่วนได้ ต้องศึกษาลักษณะทั้งหมด แต่อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้เป็นเพียงวิธีเดียวที่ใช้ในการวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของข้อมูลบางประเภทเช่น DNA-DNA hybridization, RFLP, AFLP, RAPD และ DNA fingerprints

วัตถุประสงค์

- 1) เพื่อคัดเลือกเชื้อราเอนโดไฟท์จากพืชป่าชายเลนที่สร้างเอนไซม์ lipase, cellulase, amylase และ protease
- 2) ศึกษาประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ของราเอนโดไฟท์ที่คัดเลือกได้
- 3) ศึกษาความสามารถของราเอนโดไฟท์ในการสร้างเอนไซม์ชนิดต่างๆ โดยใช้ชุดทดสอบ API ZYM test kit
- 4) เพื่อจำแนกชนิดของเชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์โดยใช้วิธีทางชีวโมเลกุล

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

2.1 วัสดุ และ อุปกรณ์

2.1.1 ราเอนโดไฟท์สำหรับการทดสอบ

- แยกโดย น.ส. จิรายุ บัวทอง จำนวน 224 ไอโซเลท (ตารางที่ 1 ค ภาคผนวก
- แยกโดย น.ส. ประไพพิศ เซาวลิต จำนวน 76 ไอโซเลท (ตารางที่ 2 ค ภาคผนวก ค)

2.1.2 รา *Aspergillus sp.*

แยกได้จากกองปุ๋ยหมัก จากห้องปฏิบัติการ ผศ.ดร.เยาวลักษณ์ ดิสระ

2.1.3 วัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อที่สภาวะ **solid state fermentation**

- ฟางข้าว
- ใบพืชป่าชายเลน ได้แก่ โกงกางใบเล็ก แสมดำ และ ตะบูนขาว

2.1.4 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

2.1.4.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- Corn meal agar (CMA) (Fluka)
- Potato dextrose agar (PDA) (ภาคผนวก ก)
- Potato dextrose broth (PDB) (ภาคผนวก ก)

2.1.4.2 สารเคมีทั่วไป

- 1 M NaCl
- Lactophenol cotton blue
- 5% Sodium hypochlorite (Clorox) (Haiter)
- 15% Glycerol (Merck)
- Nelson-Somogyi (ภาคผนวก ก)
- NH_4NO_3 (Univar)
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Univar)
- Peptone (Difco)

- Yeast extract	(Difco)
- KH_2PO_4	(Merck)
- KCl	(Merck)
- CaCl_2	(Merck)
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	(Merck)
- K_2HPO_4	(Merck)
- 0.1 M Acetate buffer pH 5.0	(ภาคผนวก ก)
- Congo red	(Fluka)
- Carboxymethylcellulose (CMC)	(Fluka)
- Soluble starch	(Univar)
- Sodium caseinate	(Sigma)
- Tributyrin	(Fluka)
- Rhodamine B	(Fluka)
- Olive oil	(Sabroso)
- สารละลาย iodine	(ภาคผนวก ก)
- 5% (w/v) cupric acetate	(ภาคผนวก ก)

2.1.5 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล

- Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB) lysis buffer (O' Donnell <i>et al.</i> , 1997)	(ภาคผนวก ก)
- Tris-hydrochloric acid (pH 8.0)	
- TAE buffer (Tris Acetate EDTA buffer, pH 8.0)	(ภาคผนวก ก)
- 6X Loading dye	(ภาคผนวก ก)
- Ammonium acetate	(Bio Basic Inc.)
- Phenol	(Carlo Erba reagenti)
- Chloroform	(Lab-Scan Analytical Sciences)
- Isoamyl alcohol	(Bio Basic Inc.)
- Isopropanol	(Bio Basic Inc.)
- Absolute ethanol	(Carlo Erba reagenti)
- Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	(Bio Basic Inc.)
- 1% Agarose gel	(Research Organics)
- Ethidium bromide	(Fluka)

- 25mM MgCl₂ (Fermentas)
- 10X PCR buffer (Fermentas)
- 10mM dNTPs mix (Fermentas)
- Taq DNA polymerase (Fermentas)

2.1.6 Universal fungal primers (White *et al.*, 1990; Bunyard *et al.*, 1994; Landvik, 1996)

- NS4 (5' CTT CCG TCA ATT CCT TTA AG 3')
- ITS1 (5' TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3')
- ITS4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3')
- ITS5 (5' GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G 3')
- JS1 (5' GCT GGT GCT GGC AGT GCT-3')
- LR7 (5' TAC TAC CAC CAA GAT CT 3')

2.1.7 โปรแกรมวิเคราะห์การจัดเรียงลำดับเบส DNA และสร้าง phylogenetic tree

- BioEdit version 7.0.9 (Hall, 2005)
- PAUP* Version 4.0b10 (Swofford, 2002)

2.1.8 เครื่องมือวิทยาศาสตร์

- กล้องจุลทรรศน์ (Olympus)
- กล้อง stereo zoom (Olympus)
- Spectrophotometer (Optima)
- Automatic pipette (Gilson)
- Tip (Axegen)
- Incubator (Systemfrom)
- Vortex mixer (Genie)
- pH meter (Beckman)
- Autoclave (Tomy)
- Water bath 50 °C (Memmert)
- Hot air oven (Binder)
- Gel electrophoresis machine (Amersham Bioscience)
- Electronical balance (Sartorius)

- Freeze dryer (Labconco)
- PCR machine (Biorad)
- UV-light transilluminator (Gel Documentation, Syngene Gene Genius SYDR 2/179)

2.1.9 ชุดทดสอบต่าง ๆ

- NucleoSpin® Plant II kit (Macherey-Nagel)
- NucleoSpin® Extract DNA purification kit (Macherey-Nagel)
- APIZYM test kit (Biomerieux)

2.2 วิธีการทดลอง

2.2.1 การแยกราเอนโดไฟท์

2.2.1.1 การเก็บตัวอย่างพืชป่าชายเลน

ทำการเก็บตัวอย่างพืชป่าชายเลนชนิดต่างๆ เช่น โกงกางใบเล็ก โกงกางใบใหญ่ ฝาดดอกแดง ตะบูนขาว ลำพู แสมขาว และเล็บมือนาง จาก 2 แหล่งคือ เกาะยอ จังหวัดสงขลา และ เกาะตะรุเตา จังหวัดสตูล โดยเก็บตัวอย่างใบพืช และกิ่งที่มีลักษณะสมบูรณ์ไม่มีลักษณะอาการของโรค นำตัวอย่างพืชมาล้างด้วย detergent และน้ำประปา ฝึ่งให้แห้งภายใต้ laminar flow เมื่อตัวอย่างพืชแห้งแล้ว ใช้ใบมีดผ่าตัดปราศจากเชื้อตัดตัวอย่างพืชออกเป็นส่วนต่างๆ ดังนี้ vein, midrib, lamina, petiole และ branch ออกเป็นชิ้นเล็กๆ ให้มีขนาด 1×1 ตารางเซนติเมตร จำนวน 4, 3, 3, 4 และ 6 ชิ้น ตามลำดับ

ราเอนโดไฟท์อีกส่วนหนึ่ง จำนวน 224 isolates ได้รับความอนุเคราะห์จาก นางสาวจิรายุ บัวทอง (ติดต่อส่วนตัว) ดังตารางที่ 1ค (ภาคผนวก ค)

2.2.1.2 การแยกเชื้อรา

นำตัวอย่างพืชที่ตัดเป็นชิ้นๆ มากำจัดเชื้อบริเวณพื้นผิว โดยแช่ใน 95% ethanol นาน 30 วินาที หลังจากนั้นนำไปแช่ใน 5% sodium hypochlorite นาน 5 นาที แล้วนำไปแช่ใน 95% ethanol อีกครั้งนาน 30 วินาที นำตัวอย่างมาล้างด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ นาน 3-5 วินาที (Phongpaichit *et al.*, 2006) แล้วจึงนำตัวอย่างพืชไปวางบนอาหาร corn meal agar (CMA) ที่เติมยาปฏิชีวนะ penosep (penicillin+streptomycin) ความเข้มข้น 50 µg/ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิ $28 \pm 3^{\circ}\text{C}$ สังเกตผลทุกวัน เมื่อพบว่าการเจริญของเส้นใยราออกมาจากชิ้นตัวอย่างพืช ทำการตัดส่วน hyphal tip ของร่าภายใต้กล้อง stereo zoom นำไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) ที่ไม่เติมยาปฏิชีวนะ ทำการแยกจนได้เชื้อราบริสุทธิ์ ราเอนโดไฟท์ที่แยกได้ทั้งหมดเก็บตัวอย่างไว้ใน 15-20% glycerol ที่ -70°C

คำนวณอัตราการแยกราเอนโดไฟท์ (isolation rate) ซึ่งเป็นค่าที่บอกถึงจำนวนของราเอนโดไฟท์ที่แยกได้ต่อหนึ่งหน่วยของตัวอย่างพืช โดยคำนวณจากสูตร (Jordaan *et al.*, 2006)

$$\text{อัตราการแยกราเอนโดไฟท์} = \frac{\text{จำนวนราเอนโดไฟท์ที่แยกได้}}{\text{จำนวนชิ้นของตัวอย่างพืชที่นำมาแยก}}$$

2.2.2 การทดสอบเบื้องต้นของราเอนโดไฟท์ในการสร้างเอนไซม์ lipase, cellulase, amylase และ protease โดยวิธี plate method

การทดสอบเบื้องต้นของราเอนโดไฟท์ในการสร้างเอนไซม์ โดยนำราเอนโดไฟท์ที่ต้องการศึกษาไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 5-7 วัน หรือจนกว่าจะมีการเจริญที่เหมาะสม จากนั้นใช้ปลายพาสเจอร์ปีเปตที่ปราศจากเชื้อ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะที่ขอบโคโลนีของราที่นำมาทดสอบ แล้วนำไปวางบนจุดกึ่งกลางของอาหารที่ใช้ทดสอบการสร้างเอนไซม์แต่ละชนิดดังนี้

2.2.2.1 เอนไซม์ lipase

เลี้ยงราบนอาหารพื้นฐาน (ภาคผนวก ก) ที่เติม tributyrin ความเข้มข้น 1.0% (v/v) บ่มที่อุณหภูมิ $28 \pm 3^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 5-7 วัน สังเกต clear zone รอบโคโลนีของรา บันทึกผลเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone เป็นมิลลิเมตร (Torres *et al.*, 2003) สำหรับราที่ให้ผลบวกบนอาหาร tributyrin agar นำมาทดสอบต่อบนอาหาร rhodamine B agar (ภาคผนวก ก) โดยเลี้ยงราบนอาหาร rhodamine B agar บ่มที่อุณหภูมิ $28 \pm 3^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 5-7 วัน จากนั้นนำไปส่องดูภายใต้แสงยูวี ความยาวคลื่น 350 นาโนเมตร ถ้าเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ lipase ได้จะเห็นการเรืองแสงสีชมพูอมส้มภายใต้แสงยูวี บันทึกผลโดยดูจากความเข้มของการเรืองแสงให้ระดับคะแนนเป็น +++++, +++++, +++, ++ และ + ตามลำดับความเข้มของการเรืองแสง

2.2.2.2 เอนไซม์ cellulase

เลี้ยงราบนอาหารพื้นฐาน (ภาคผนวก ก) ที่เติม carboxymethylcellulose (CMC) ความเข้มข้น 0.5% (w/v) บ่มที่อุณหภูมิ $28 \pm 3^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 5-7 วัน จากนั้นรดด้วย congo red ความเข้มข้น 2% (w/v) แล้วล้างด้วย NaCl ความเข้มข้น 1.0 M ทิ้งไว้ 15 นาที สังเกต clear zone รอบโคโลนีของรา บันทึกผลเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone เป็นมิลลิเมตร (Maria *et al.*, 2005)

2.2.2.3 เอนไซม์ amylase

เลี้ยงราบนอาหารพื้นฐาน (ภาคผนวก ก) ที่เติม soluble starch ความเข้มข้น 2% (w/v) บ่มที่อุณหภูมิ $28 \pm 3^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 5-7 วัน จากนั้นรดด้วยสารละลาย iodine (ภาคผนวก ก) สังเกต clear zone รอบโคโลนีของรา บันทึกผลเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone เป็นมิลลิเมตร (Maria *et al.*, 2005)

2.2.2.4 เอนไซม์ protease

ทดสอบเอนไซม์ protease โดยเลี้ยงราบนอาหารพื้นฐาน (ภาคผนวก ก) ที่เติม sodium caseinate ความเข้มข้น 2% (w/v) ปมที่อุณหภูมิ $28 \pm 3^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 5-7 วัน สังเกต clear zone รอบโคโลนีของรา บันทึกผลเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone เป็นมิลลิเมตร (บุญศรี, 2533)

2.2.2.5 การรายงานประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์

ประสิทธิภาพของเชื้อราในการสร้างเอนไซม์แต่ละชนิด รายงานผลเป็นค่า extracellular enzyme production ratios (EPR) คือ อัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone ต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีรา โดยกำหนดปฏิกิริยาการสร้างเอนไซม์ตามค่า EPR เป็น 4 ระดับดังนี้ (Choi *et al.*, 2005)

Strong reaction: > 2

Medium reaction: $>1 - < 2$,

Weak reaction: < 1

No reaction: ไม่เกิดการสร้าง clear zone

2.2.3 การทดสอบเอนไซม์อื่น ๆ โดยใช้ API ZYM test kit

ทำการทดสอบโดยเลี้ยงราเอนโดไฟท์ที่ต้องการศึกษาการสร้างเอนไซม์อื่น ๆ ในอาหารเหลวที่มี tributyrin ความเข้มข้น 1% (v/v) (ภาคผนวก ก) สำหรับเชื้อที่ให้ผลบวกกับ tributyrin และเลี้ยงเชื้อในอาหาร CMC ความเข้มข้น 1% (w/v) (ภาคผนวก ก) สำหรับเชื้อราที่ให้ผลบวกกับอาหาร CMC เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5-7 วัน จากนั้นนำไปกรองผ่านกระดาษกรอง ส่วนของเหลวที่กรองได้เรียกว่า crude enzyme ซึ่งจะนำไปทดสอบกับชุดทดสอบ API ZYM test kit ซึ่งสามารถตรวจหาเอนไซม์ได้ 19 ชนิดโดยหยอด crude enzyme หลุมละ 75 μl จากนั้นนำไปปมที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาหยอดด้วย ZYM A หลุมละ 1 หยด และ ZYM B หลุมละ 1 หยด ทิ้งไว้ 10 นาที สังเกตการเปลี่ยนสีของแต่ละหลุมเทียบกับแผ่นเทียบสีมาตรฐานของบริษัทผู้ผลิตชุดทดสอบ (ภาคผนวก ข)

2.2.4 การทดสอบความสามารถของราเอนโดไฟท์ในการสร้างเอนไซม์

จากการทดสอบความสามารถของราเอนโดไฟท์ในการสร้างเอนไซม์ lipase, cellulase, amylase และ protease เบื้องต้น ด้วยวิธี plate method ทำการคัดเลือกราเอนโดไฟท์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ lipase และ cellulase ที่ให้ค่า EPR สูงสุด 3 อันดับ มาศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์ lipase ในอาหารเหลว (submerged fermentation) สำหรับ

ความสามารถในการผลิตเอนไซม์ cellulase จะทดสอบทั้งในอาหารเหลว (submerged fermentation) และอาหารแข็ง (solid substrate fermentation)

2.2.4.1 การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว

เลี้ยงราเอนโดไฟท์ที่ต้องการทดสอบบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ $28 \pm 3^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 5-7 วัน หรือจนกว่ามีขนาดโคโลนีที่เหมาะสม จากนั้นใช้พาสเจอร์ปีเปิดที่ปราศจากเชื้อซึ่งมีปลายขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะที่ขอบโคโลนีของรา นำชิ้นรุ้นที่ได้ 5 ชิ้นไปเลี้ยงในอาหารเหลวสำหรับการทดสอบเอนไซม์ lipase ที่มี tributyrin ความเข้มข้น 1% (v/v) เป็นสับสเตรท (ภาคผนวก ก) และ cellulase ที่มี CMC ความเข้มข้น 1% เป็นสับสเตรท (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง ไม่เขย่า เป็นเวลา 14 วัน โดยเก็บตัวอย่างในวันที่ 4, 6, 8, 10, 12 และ 14 โดยการนำตัวอย่างมากรองผ่านกระดาษกรอง whatman no. 1 ของเหลวที่กรองได้คือ crude enzyme นำไปวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ lipase และ cellulase ต่อไป และเส้นใยบนกระดาษกรองนำไปหาน้ำหนักแห้งเพื่อวัดการเจริญของรา (ภาคผนวก ข)

2.2.4.2 การเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง

2.2.4.2.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้ฟางข้าว

ซึ่งฟางข้าวขนาดประมาณ 0.5 เซนติเมตร จำนวน 5 กรัม ใส่ลงในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายที่ประกอบด้วย NH_4NO_3 0.2 กรัม yeast extract 0.001 กรัม ปริมาตร 16 มิลลิลิตร เขย่าให้ทั่ว วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง เพื่อให้ฟางข้าวดูดซับน้ำ และมีเปอร์เซ็นต์ความชื้นเริ่มต้นเท่ากับ 75% จากนั้นปิดด้วยจุกสำลี หนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง (ประไพพิศ, 2549)

2.2.4.2.2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมฟางข้าวและใบของพืชป่าชายเลน

ซึ่งฟางข้าวขนาดประมาณ 0.5 เซนติเมตร จำนวน 3 กรัม และ ใบของพืชป่าชายเลนขนาด 0.5 เซนติเมตร จำนวน 2 กรัม ใส่ลงในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายที่ประกอบด้วย NH_4NO_3 0.27 กรัม yeast extract 0.0013 กรัม ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เขย่าให้ทั่ววางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง เพื่อให้ฟางข้าวและใบพืชป่าชายเลนดูดซับน้ำ และมีเปอร์เซ็นต์ความชื้นเริ่มต้นเท่ากับ 70% ปิดด้วยจุกสำลี หนึ่งฆ่าเชื้อ ที่ 121°C 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง (ดัดแปลงจากประไพพิศ, 2537)

2.2.4.2.3 การเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง

ทำการเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟท์ที่ใช้ในการศึกษาการสร้างเอนไซม์ cellulase บนอาหาร PDA เป็นเวลา 5-7 วัน หรือจนกว่าจะมีขนาดที่เหมาะสมในการทดสอบ จากนั้นใช้ พาสเจอร์ปีเปตที่ปราศจากเชื้อซึ่งมีปลายขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะที่ขอบ โคลนนี้ของรา นำชิ้นวันที่ได้จำนวน 5 ชิ้น เติมลงในอาหารที่เตรียมไว้ (ข้อ 2.2.4.2.1 และ 2.2.4.2.2) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 14 วัน โดยเก็บตัวอย่างในวันที่ 4, 6, 8, 10, 12 และ 14 เพื่อนำไปวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ cellulase ทำการสกัดเอนไซม์โดยเติม acetate buffer ความเข้มข้น 0.1 M pH 5 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์ที่เลี้ยงเชื้อ จากนั้นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง กรองด้วยผ้าก๊อซ ของเหลวที่ได้เป็น crude enzyme ซึ่งจะนำไปวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ cellulase ต่อไป

สำหรับเชื้อ control ใช้เชื้อ *Aspergillus* sp. ทำการเพาะเลี้ยงในลักษณะเดียวกันแต่เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 9 วัน และเก็บตัวอย่างในวันที่ 4, 5, 6, 7, 8 และ 9

2.2.5 การวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ cellulase

สับสเตรทที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา คือ สารละลาย CMC ความเข้มข้น 1% ในสารละลาย acetate buffer ความเข้มข้น 0.1 M pH 5.0 และเตรียมสารละลายเอนไซม์ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม โดยเจือจางด้วยสารละลาย acetate buffer ความเข้มข้น 0.1 M pH 5.0 จากนั้นนำ สารละลายเอนไซม์ที่บรรจุในหลอดทดสอบปริมาตร 1 มิลลิลิตร และภาชนะที่บรรจุสับสเตรท ไปป้อนใน water bath 50 °C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสับสเตรท 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดที่มีสารละลายเอนไซม์ 1 มิลลิลิตร บ่มต่อที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 30 นาที ครบกำหนดเวลา นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที แล้วทำให้เย็นทันทีโดยแช่ในน้ำเย็นจัด เพื่อหยุดปฏิกิริยา จากนั้นหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นด้วยวิธีการ Nelson-Somogyi (ภาคผนวก ข) โดยกำหนดให้ 1 หน่วย (unit) ของเอนไซม์ cellulase เท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลส (CMC) แล้วให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กลูโคส) เกิดขึ้นใน 1 μmol ภายในเวลา 1 นาที (สมรักษ์, 2537)

Control คือ crude enzyme ที่นำไปต้มเดือดเป็นเวลา 10 นาที ก่อนนำมาวิเคราะห์หา กิจกรรม และ blank ใช้น้ำกลั่นทำปฏิกิริยาแทนสารละลายเอนไซม์

$$\text{Unit enzyme} = \frac{\text{ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส} \times 2 \times \text{Dilution factor}}{\text{MW ของน้ำตาลกลูโคส} \times 30}$$

$$\text{MW ของน้ำตาลกลูโคส} = 180$$

2.2.6 การวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ lipase

ทำการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ lipase โดยใช้วิธี cupric acetate assay (ดัดแปลงจาก Lee and Rhee, 1993) ซึ่งมีวิธีการคือ ในขั้นแรกเตรียมสารละลาย cupric acetate ความเข้มข้น 5% (w/v) (ภาคผนวก ก) จากนั้นเตรียมหลอดปฏิกิริยาซึ่งประกอบด้วย tributyrin 10% (v/v) ใน iso-octane ปริมาตร 1 มิลลิลิตร Tris-HCl buffer pH 7.5 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และสารละลายเอนไซม์ ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 °C 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม 6 N HCl 0.3 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา รอให้ตัวอย่างแยกชั้น และเลือกชั้นที่อยู่ด้านบนไปทำการศึกษา โดยดูส่วนที่อยู่ด้านบน (ชั้นของน้ำมัน) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย cupric acetate ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร ให้ตัวอย่างผสมกันอย่างรวดเร็วโดยใช้ vortex นาน 30 วินาที จากนั้นทิ้งไว้ให้ทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 15 นาที เลือกชั้นที่อยู่ด้านบนไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 715 นาโนเมตร โดยกำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ lipase คือกิจกรรมของเอนไซม์ในการย่อยสลาย tributyrin ไปเป็น tributyrin acid 1 μ mol ในเวลา 1 นาที

2.2.7 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา

2.2.7.1 Macroscopic morphology

เลือกศึกษาเฉพาะราเอนโดไฟท์ที่สร้างเอนไซม์ lipase และ cellulase ได้สูง 10 อันดับแรก และราเอนโดไฟท์ที่ให้ผลบวกกับอาหาร rhodamine B โดยเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟท์บนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ $28 \pm 3^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 7- 14 วัน แล้วศึกษาลักษณะโคโลนีของเชื้อรา โดยสังเกตลักษณะของโคโลนี สีของโคโลนี และศึกษาอัตราการเจริญเติบโต

2.2.7.2 Microscopic morphology

ราเอนโดไฟท์ชนิดใดที่สร้างโครงสร้างการสืบพันธุ์ (reproductive structure) จะทำการศึกษาแบบ wet-mount ด้วยสี lactophenol cotton blue แล้วศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เปรียบเทียบลักษณะของโครงสร้างการสืบพันธุ์ทั้งหมด และเทียบเคียงกับ keys ต่างๆ (Samson *et al.*, 1995; Barnett and Hunter, 1998)

2.2.8 การจัดจำแนกเชื้อราด้วยข้อมูลทางพันธุกรรม

2.2.8.1 การเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟท์เพื่อสกัด DNA

เพาะเลี้ยงราเอนโดไฟท์ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ในอาหาร PDB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ $28 \pm 3^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลาประมาณ 1 สัปดาห์ หรือจนกว่าจะพบว่าราเอนโดไฟท์มีการเจริญเติบโตเต็มที่ หลังจากนั้นนำเชื้อราที่ได้ไปกรองผ่านกรวยแก้วที่รองด้วย

ผ้าก๊อซที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ล้างเส้นใยราด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ (อุณหภูมิประมาณ 50-60 °C) อย่างน้อย 2 ครั้ง หรือจนกว่าเส้นใยของเชื้อราจะสะอาด ชับน้ำออกจากเส้นใยราให้มากที่สุดด้วยกระดาษทิชชูที่ปราศจากเชื้อ แล้วถ่ายเส้นใยลงในโถรงบดยาที่ปราศจากเชื้อ นำไปแช่ในตู้แช่แข็ง ที่อุณหภูมิ -20 °C ขำมคืน อีกวิธี คือ การนำเส้นใยราที่กรองได้ไปทำ freeze dried แล้วนำเส้นใยราที่ได้จากทั้ง 2 วิธีไปบดให้ละเอียด เพื่อจะนำไปสกัด DNA ต่อไป

2.2.8.2 การสกัด DNA ด้วยวิธี CTAB method (ดัดแปลงจาก O' Donnell *et al.*, 1997)

บดเส้นใยของเชื้อราที่ต้องการสกัด DNA ให้ละเอียดมากที่สุด จากนั้นนำไปใส่ในหลอด microtube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติม CTAB lysis buffer ปริมาตร 500 μ l ปั่นด้วย vortex mixer ผสมให้เข้ากันดี นำไปแช่ใน water bath ที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 10 นาที ถ่ายส่วนใส (supernatant) ใส่หลอดใหม่ เติมนสารผสม phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25: 24: 1) ปริมาตรเท่ากับส่วนใส เอียงหลอดไปมาเบาๆ เพื่อให้สารผสมเข้ากัน นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 10 นาที ถ่ายส่วนใสใส่หลอดใหม่ เติมนสารผสม chloroform: isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตรเท่ากับส่วนใส เอียงหลอดไปมาเบาๆ 5-10 ครั้ง แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 10 นาที ทำซ้ำขั้นตอนนี้อีกครั้ง หรือจนกว่าจะใส เก็บส่วนใสใส่หลอดใหม่ เติม 7.5 M ammonium acetate ครึ่งปริมาตรของส่วนใส และเติม absolute ethanol ที่แช่เย็นปริมาตร 2.5 เท่าของส่วนใส นำไปแช่ที่อุณหภูมิ -20°C เป็นเวลา 30 นาที หรือจนกว่าจะพบตะกอนของ DNA หลังจากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง จะพบตะกอน DNA สีขาวติดอยู่ที่ก้นหลอด ล้าง DNA ที่ได้ 2 ครั้ง ด้วย 75% ethanol ที่แช่เย็น ปริมาตร 500 μ l ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ละลาย DNA ที่ได้ด้วยน้ำกลั่น nanopure ไร้เชื้อ 50 μ l เก็บ DNA ที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

2.2.8.3 การสกัด DNA ด้วย ชุด kit

ทำการสกัด DNA ด้วยชุด NucleoSpin® Plant II kit ตามวิธีการในคู่มือ โดยบดเส้นใยของราที่ต้องการสกัด DNA ให้ละเอียดมากที่สุด จากนั้นนำไปใส่ในหลอด microtube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติม PL1 400 μ l และ RNase A 10 μ l นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ถ่ายส่วนใสใส่ในหลอด microtube อันใหม่ จากนั้นเติม binding buffer PC 450 μ l ดูดขึ้นดูดลง

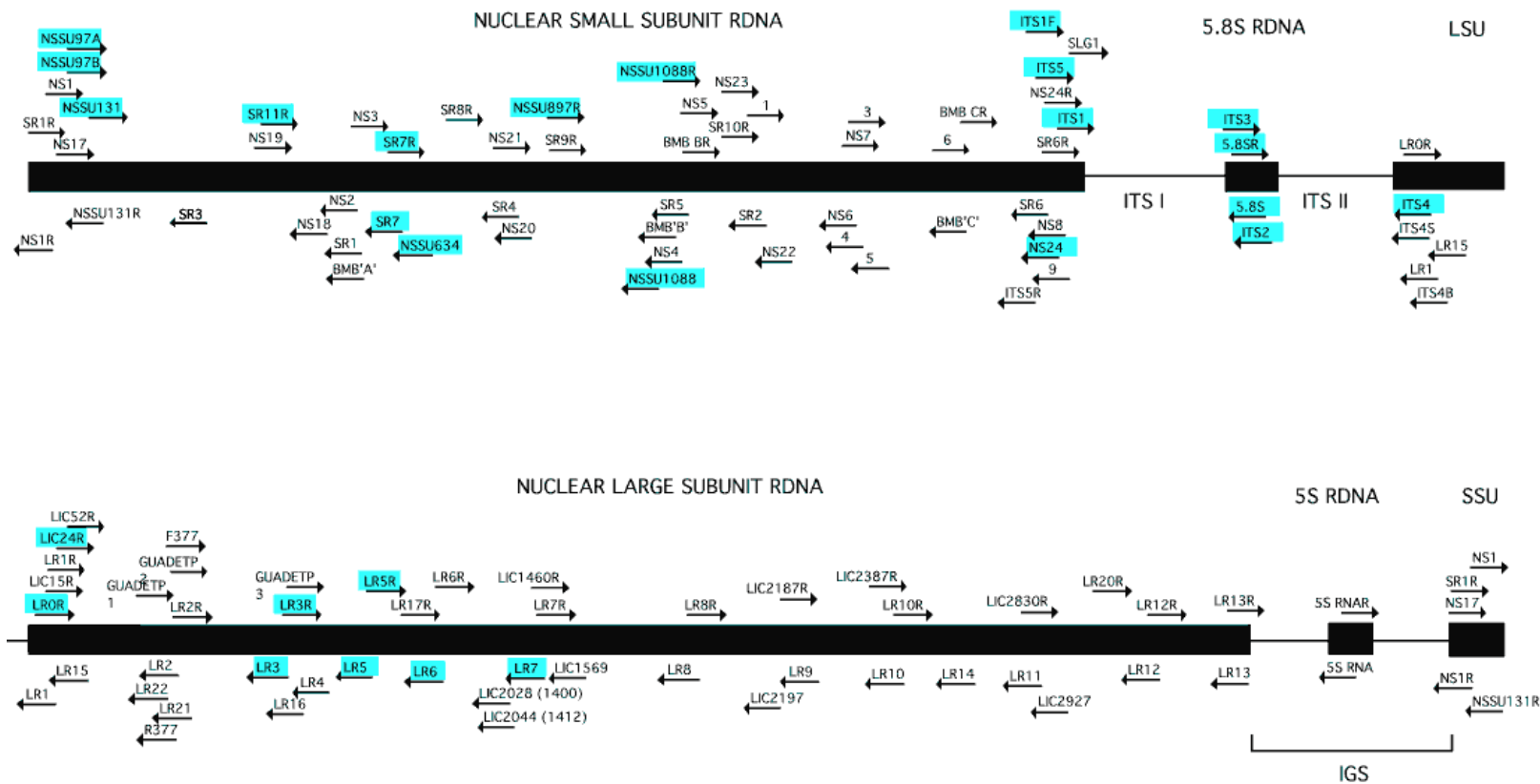
นำส่วนผสมที่ได้ไปใส่ใน คอลัมน์สีเขียวที่รองรับด้วย collecting tube นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่มีส่วนที่อยู่ใน collecting tube จากนั้นเติม wash buffer PW1 ปริมาตร 400 μ l นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่มีส่วนที่อยู่ใน collecting tube เติม buffer PW2 700 μ l นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่มีส่วนที่อยู่ใน collecting tube นำคอลัมน์สีเขียวที่ได้ไปใส่ในหลอด Eppendorf อันใหม่ เติม buffer PE 50 μ l ซึ่งผ่านการอุ่นที่อุณหภูมิ 70°C นาน 5 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที นำมาเติม buffer PE 50 μ l อีกครั้ง สุดท้ายจะได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

2.2.9 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของ DNA ที่สกัดได้

ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของ DNA ที่สกัดได้ด้วย 1% agarose gel electrophoresis ใน TAE buffer

2.2.10 การเพิ่มปริมาณส่วน ITS1-5.8S-ITS2 (ITS) และ LSU ของยีน rDNA โดยปฏิกิริยา PCR

เพิ่มปริมาณส่วน ITS1-5.8S-ITS2 โดยใช้ universal fungal primers ได้แก่ ITS5/ITS4, ITS1/ITS4 และ NS5/ITS4 เพิ่มปริมาณส่วน 28S โดยใช้ universal fungal primers คือ ITS5/LR7 และ JS1/LR7 ดังแสดงตำแหน่งในรูปที่ 5



<http://www.lutzonilab.net/primers/image247>.

รูปที่ 5 ตำแหน่งของยีนส่วน ITS และ LSU ที่ใช้ในการศึกษา

2.2.10.1 การเตรียมส่วนผสมของ PCR (PCR mixture)

รายละเอียดของส่วนผสมในการทำ PCR แสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR (PCR mixture)

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

2.2.10.2 การทำปฏิกิริยา PCR (ลิตา, 2551)

เมื่อทำการผสมส่วนผสมต่างๆ ดังตารางที่ 5 จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยาภายในเครื่อง PCR สำหรับ ITS ใช้ PCR profile ดังนี้

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

สำหรับ LSU ใช้ PCR profile ดังนี้

ขั้นที่ 1	94 °C 3 นาที
ขั้นที่ 2	94 °C 1 นาที
ขั้นที่ 3	55 °C 1.5 นาที
ขั้นที่ 4	72 °C 2.5 นาที
ขั้นที่ 5	ทำซ้ำขั้นที่ 2-4 ทั้งหมด 34 รอบ
ขั้นที่ 6	72 °C 10 นาที

2.2.10.3 การตรวจสอบปริมาณของ PCR product ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis

ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของ PCR product ที่ได้ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis โดยผสม PCR product ปริมาตร 3 µl กับ 6x loading dye ปริมาตร 3 µl แล้ว load ลงใน 1% agarose gel ที่แช่อยู่ใน TAE buffer กระแสไฟฟ้า 100 volts 30-40 นาที ย้อมเจลด้วย ethidium bromide เป็นเวลา 10 นาที แล้วตรวจสอบ PCR product ภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง UV transilluminator และบันทึกภาพโดยใช้ Gel Documentation (Syngene Gene Genius)

2.2.10.4 การกำจัดสิ่งปนเปื้อนใน PCR product (PCR product purification)

ทำการกำจัดสิ่งปนเปื้อนใน PCR product ที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ด้วยชุด Nucleospin[®] extract DNA purification kit ตามวิธีการในคู่มือของบริษัท โดยนำ PCR product ผสมกับ binding buffer แล้วหยอดลงใน nucleospin column ที่รองรับด้วย collecting tube ขนาด 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำ 2 ครั้ง เทของเหลวที่อยู่ด้านล่างทิ้งไป เติม elution buffer ซึ่งผ่านการอุ่นที่อุณหภูมิ 70 °C 15 นาที ลงใน nucleospin column ที่รองรับด้วย microtube ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้ DNA ตกกลงมาในหลอด microtube ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของ DNA ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis อีกครั้ง จากนั้นส่ง PCR product ที่ได้ไปอ่านลำดับเบสของ DNA ที่ Macrogen Inc ประเทศเกาหลี

2.2.11 การจัดเรียงลำดับเบส DNA (multiple sequence alignment)

เมื่อได้ DNA sequence ทำการตรวจสอบลักษณะและคุณภาพของลำดับเบส DNA ส่วน ITS และ ส่วน LSU ของราเอนโดไฟท์โดยใช้โปรแกรม BioEdit V.7.0.9 (Hall, 2005) จากนั้นนำลำดับเบสของ DNA ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ GenBank ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) เพื่อหาเชื้อราที่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกันมาก

ที่สุด แล้วนำลำดับเบส DNA ของราเอนโดไฟท์ มาจัดเรียงเปรียบเทียบกับลำดับเบส DNA ของราอื่นๆ ที่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกัน โดยใช้โปรแกรม BioEdit V.7.0.9

2.2.12 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis)

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของราเอนโดไฟท์ กับเชื้อราที่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกัน โดยใช้โปรแกรม PAUP* 4.0b10 โดยใช้วิธีการวิเคราะห์แบบ maximum parsimony (100 replicates stepwise addition of sequence) คำนวณค่าสถิติซึ่งประกอบด้วย tree length, consistency index (CI), retention index (RI) และค่าความเชื่อมั่น bootstrap ตามลำดับ

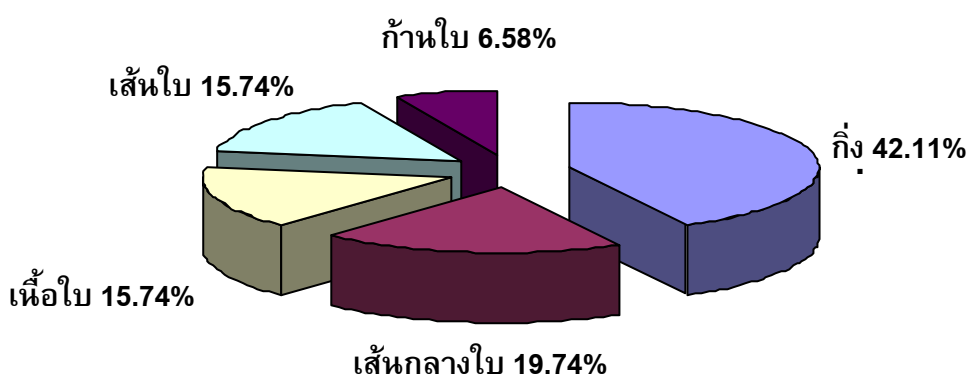
บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 การแยกราเอ็นโดไฟท์จากพืชป่าชายเลน

จากการเก็บตัวอย่างพืชป่าชายเลน 7 ชนิด จากเกาะตะรุเตา จังหวัดสตูล และเกาะยอ จังหวัดสงขลา ได้แก่ โกงกางใบเล็ก (*Rhizophora apiculata*) ตะบูนขาว (*Xylocarpus granatum*) ถั่วขาว (*Bruguiera cylindrica*) ฝาดดอกแดง (*Lumnitzera littorea*) เล็บมือนาง (*Aegiceras corniculatum*) ลำพู (*Sonneratia caseolaris*) และ แสมขาว (*Avicennia alba*) จำนวน 9 ต้น สามารถแยกราเอ็นโดไฟท์ได้ทั้งหมด 76 isolates พบว่ามีอัตราการแยกราเอ็นโดไฟท์เฉลี่ย 8.4 isolates/ต้น หรือ 0.42 isolates/ชิ้นตัวอย่าง โดยพบว่าราที่แยกได้จากต้นฝาดดอกแดง (*L. littorea*) มีอัตราการแยกเชื้อราเอ็นโดไฟท์สูงสุด (20 isolates/ต้น หรือ 1.0 isolates/ชิ้นตัวอย่าง) และ ต้นถั่วขาว (*B. cylindrica*) มีอัตราการแยกราเอ็นโดไฟท์ได้น้อยที่สุด (2 isolates/ต้น หรือ 0.1 isolate/ชิ้นตัวอย่าง) (ตารางที่ 6)

เมื่อพิจารณาจากส่วนต่างๆ ของชิ้นตัวอย่างที่นำมาแยกราเอ็นโดไฟท์ พบว่าแยกราเอ็นโดไฟท์ได้จากกิ่งมากที่สุด (42.11%) รองลงมาเป็นส่วนเส้นกลางใบ (19.74%) สำหรับส่วนเส้นใบ และเนื้อใบมีเปอร์เซ็นต์การแยกราเอ็นโดไฟท์ได้เท่ากันคือ 15.74% ในขณะที่แยกราเอ็นโดไฟท์จากก้านใบได้จำนวนน้อยที่สุดคือ 6.58% (รูปที่ 6)



รูปที่ 6 เปอร์เซนต์ของเชื้อราเอ็นโดไฟท์ที่แยกได้จากส่วนต่างๆ ของพืชป่าชายเลน

ตารางที่ 6 จำนวนราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากพืชป่าชายเลน

ลำดับ	พืช	ชื่อวิทยาศาสตร์	จำนวนพืช (ต้น)	จำนวนเชื้อที่แยกได้ (isolates)	อัตราการแยกเชื้อ	
					Isolates /ต้น	Isolates/ ต้น ต.ย.
1	เล็บมือนาง	<i>Aegiceras corniculatum</i> (L.) Blanco	1	2	2	0.10
2	แสมขาว	<i>Avicennia alba</i> Bl.	2	14	7	0.14
3	ถั่วขาว	<i>Bruguiera cylindrica</i> Bl.	1	2	2	0.10
4	ฝาดดอกแดง	<i>Lumnitzera littorea</i> Voigt	2	40	20	1.00
5	โกงกางใบเล็ก	<i>Rhizophora apiculata</i> Bl.	1	4	4	0.20
6	ลำพู	<i>Sonneratia caseolaris</i> (L.) Engl.	1	5	5	0.25
7	ตะบูนขาว	<i>Xylocarpus granatum</i> Koen.	1	9	9	0.36
รวม			9	76	8.4	0.42

3.2 การทดสอบเบื้องต้นของราเอนโดไฟท์ในการสร้างเอนไซม์ lipase, cellulase, amylase และ protease โดยวิธี plate method

คัดเลือกราเอนโดไฟท์ที่แยกจากพืชป่าชายเลนชนิดต่างๆ รวม 14 ชนิด ที่แยกได้จากข้อ 3.1 และที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก จิรายุ บัวทอง (ภาคผนวก ค) จำนวน 300 isolates เป็นราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากโกงกางใบเล็กจำนวนมากที่สุด 82 isolates รองลงมาแยกได้จากฝาดดอกแดง แสมขาว โกงกางใบใหญ่ ถั่วดำ และ ตะบูนขาว จำนวน 54, 27, 26, 18 และ 18 isolates ตามลำดับ ส่วนพืชอื่นๆ ที่เหลือ คัดเลือก ราเอนโดไฟท์ได้ 1-12 isolates (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 จำนวนราเอนโดไฟท์จากพืชป่าชายเลนทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษา

ลำดับ	แยกได้จากพืช		จำนวนเชื้อราที่ใช้ ในการศึกษา (isolates)
	ชื่อภาษาไทย	ชื่อวิทยาศาสตร์	
1	เล็บมือนาง	<i>Aegiceras corniculatum</i> (L.) Blanco	5
2	แสมขาว	<i>Avicennia alba</i> Bl.	27
3	แสมดำ	<i>Avicennia officinalis</i> L.	10
4	ถั่วขาว	<i>Bruguiera cylindrical</i> (L.) Bume	12
5	ถั่วดำ	<i>Bruguiera parviflora</i> Wight & Arn.ex Griff.	18
6	พังกาหัวส้ม	<i>Bruguiera gymnorhiza</i> (L.) Savigny.	1
7	ฝาดดอกแดง	<i>Lumnitzera littorea</i> (Jack) Voigt.	54
8	โกงกางใบเล็ก	<i>Rhizophora apiculata</i> Poir.	82
9	โกงกางใบใหญ่	<i>Rhizophora mucronata</i> Poir.	26
10	สี้ง่า	<i>Scyphiphora hydrophyllacea</i> Gaertn. f.	8
11	ลำพู	<i>Sonneratia caseolaris</i> Gaerth.	10
12	ลำแพน	<i>Sonneratia ovata</i> Back.	11
13	ตะบูนขาว	<i>Xylocarpus granatum</i> Koen.	18
14	ตะบูนดำ	<i>Xylocarpus moluccensis</i> Roem.	8
รวม			300

นาราดเอนโดไฟท์ที่คัดเลือก มาศึกษาการสร้างเอนไซม์ lipase, cellulase, amylase และ protease โดยใช้วิธี plate method ดังตัวอย่างที่แสดงในรูปที่ 7



ก



ข

รูปที่ 7 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ของราเอนโดไฟท์โดยวิธี plate method (ก) ราเอนโดไฟท์ MA1 บนอาหาร tributyrin ทดสอบเอนไซม์ lipase (ข) ราเอนโดไฟท์ MA145 บนอาหาร CMC ทดสอบเอนไซม์ cellulase

จากการใช้ราเอนโดไฟท์จำนวน 300 isolates สำหรับทดสอบเอนไซม์ lipase และ cellulase และ 180 isolates สำหรับทดสอบเอนไซม์ amylase และ protease พบว่าราเอนโดไฟท์ 31.7%, 24.0% และ 1.1% มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ lipase, cellulase และ amylase ได้ ตามลำดับ และไม่พบราเอนโดไฟท์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ protease (ตารางที่ 8) โดยจำนวนราเอนโดไฟท์ที่มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ที่แยกได้จากพืชป่าชายเลนชนิดต่างๆ ตามตารางที่ 9 เมื่อพิจารณาประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ของเชื้อราแต่ละชนิดจากค่า EPR (อัตราส่วนของเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone ต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อรา) พบว่าราเอนโดไฟท์ที่สร้างเอนไซม์ส่วนใหญ่ สามารถสร้าง lipase (73/95; 76.8%) และ cellulase (71/72; 98.6%) ได้ในระดับปานกลาง (EPR >1-<2) และมีจำนวน 20 จาก 95 isolates (21.0%) ที่สร้าง lipase ระดับสูง (EPR > 2) ส่วนราเอนโดไฟท์ที่สร้าง cellulase พบว่ามีเพียง 1 จาก 72 isolates (1.4%) ที่สร้าง cellulase ในระดับสูง สำหรับราเอนโดไฟท์ที่สร้าง amylase ซึ่งมีเพียง 2 isolates สร้างเอนไซม์ในระดับปานกลางได้แก่ MA82 (EPR 1.25) และ MA46 (EPR 1.1) ค่า EPR ของราเอนโดไฟท์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ lipase และ cellulase 10 อันดับแรก แสดงดังตารางที่ 10 และ ตารางที่ 11 ตามลำดับ โดยราเอนโดไฟท์ทั้ง 10 isolates มีศักยภาพสูงในการสร้าง lipase (EPR 3.1-4.9) โดยแยกได้จากแสมขาว 3 isolates แสมดำ และตะบูนขาวอย่างละ 2 isolates และ จากลำแพน โกงกางใบใหญ่ และ โกงกางใบเล็ก อย่างละ 1 isolate ส่วนราเอนโดไฟท์ที่สร้างเอนไซม์ cellulase มีค่า EPR

1.53-2.63 โดยแยกได้จากโงก่างใบใหญ่ และฝาดดอกแดง อย่างละ 2 isolates จากตะบูนขาว ตะบูนดำ เล็บมีอนาง ลำแพน สี่ง่า และโงก่างใบเล็ก อย่างละ 1 isolate

ราเอนโดไฟท์ที่ให้ผลบวกบนอาหาร tributyrin ทั้งหมด 95 isolates เมื่อนำไปทดสอบ เพื่อยืนยันผลการสร้างเอนไซม์ lipase บนอาหาร rhodamine B agar พบว่า มีเพียง 3 isolates (3.2%) ที่ให้ผลบวกบนอาหาร rhodamine B โดยราเอนโดไฟท์ MA132 มีการเรืองแสงมากที่สุด และมีค่า EPR บน tributyrin agar 3.18 (ตารางที่ 12)

ตารางที่ 8 ราเอนโดไฟท์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ lipase, cellulase, amylase และ protease ทดสอบโดยวิธี plate method

Reaction	EPR	จำนวนราเอนโดไฟท์			
		Lipase (n=300)	Cellulase (n=300)	Amylase (n=180)	Protease (n=180)
Strong	>2	20	1	0	0
Medium	>1-<2	73	71	2	0
Weak	≤1	2	0	0	0
รวมเชื้อราที่สร้างเอนไซม์ (%)		95 (31.7)	72 (24)	2 (1.1)	0 (0)
No reaction (%)	ไม่เกิด clear zone	205 (68.3)	228 (76)	178 (98.9)	180 (100)

EPR (extracellular enzyme production ratios) = อัตราส่วนของเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone ต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อรา (Choi *et al.*, 2005)

ตารางที่ 9 จำนวนราเอนโดไฟท์ที่มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์โดยแยกได้จากพืชป่าชายเลนแต่ละชนิด

พืชเจ้าบ้าน	จำนวนเชื้อราที่สร้างเอนไซม์		
	Lipase	Cellulase	Amylase
โกกงางใบเล็ก	22	19	1
โกกงางใบใหญ่	9	11	-
ตะบูนขาว	14	8	-
ตะบูนดำ	1	4	-
ถั่วขาว	-	1	-
ถั่วดำ	5	5	-
ฝาดดอกแดง	21	11	-
พังกาหัวสุ่มดอกแดง	-	2	-
เล็บมือนาง	-	2	-
ลำพู	3	-	-
ลำแพน	1	1	-
สีจ้ำ	2	-	-
แสมขาว	12	4	1
แสมดำ	-	2	-
รวม (isolates)	95	72	2

ตารางที่ 10 ราเอนโดไฟท์ที่มีศักยภาพในการสร้าง lipase 10 อันดับแรก

ลำดับ	ราเอนโดไฟท์	EPR	พืช	ส่วนของพืช
1	MA1	4.95	แสมดำ	Branch
2	MA2	4.75	แสมดำ	Branch
3	PMA1	4.35	แสมขาว	Midrib
4	MA140	3.55	ตะบูนขาว	Vein
5	MA148	3.42	แสมขาว	Midrib
6	MA56	3.25	ลำแพน	Midrib
7	MA81	3.18	แสมขาว	Midrib
8	MA132	3.18	โกกทางใบใหญ่	Branch
9	MA127	3.16	ตะบูนขาว	Midrib
10	MA111	3.04	โกกทางใบเล็ก	Petiole

EPR (extracellular enzyme production ratios) = อัตราส่วนของเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone ต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อรา (Choi *et al.*, 2005)

ตารางที่ 11 ราเอนโดไฟท์ที่มีศักยภาพในการสร้าง cellulase 10 อันดับแรก

ลำดับ	ราเอนโดไฟท์	EPR	พืช	ส่วนของพืช
1	MA145	2.63	โกกทางใบใหญ่	Midrib
2	MA130	1.96	ตะบูนขาว	Midrib
3	MA150	1.92	ฝาดดอกแดง	Vein
4	MA161	1.82	ตะบูนดำ	Midrib
5	MA154	1.75	เล็บมือนาง	Branch
6	MA56	1.67	ลำแพน	Midrib
7	MA158	1.66	ฝาดดอกแดง	Petiole
8	MA164	1.55	สีง่า	Branch
9	MA122	1.54	โกกทางใบใหญ่	Midrib
10	MA169	1.53	โกกทางใบเล็ก	Branch

EPR (extracellular enzyme production ratios) = อัตราส่วนของเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone ต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อรา (Choi *et al.*, 2005)

ตารางที่ 12 ราเอนโดไฟท์ที่มีศักยภาพในการสร้างเอนไซม์ lipase บนอาหาร tributyrin และ rhodamine B

ลำดับ	ราเอนโดไฟท์	EPR บน tributyrin agar	Lipase activity บน rhodamine B agar	พืช	ส่วนของพืช
1	MA132	3.18	+++	โก่งกางใบใหญ่	Branch
2	MA105	2.25	++	ถั่วดำ	Branch
3	MA129	1.13	+	ถั่วดำ	Petiole

+++ มีการเรืองแสงมากที่สุด ++ มีการเรืองแสงปานกลาง + มีการเรืองแสงน้อยที่สุด

3.3 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ โดยใช้ชุดทดสอบ (API ZYM test kit)

เมื่อทำการคัดเลือกได้ราเอนโดไฟท์ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์โดยใช้วิธี plate method จากนั้นทำการคัดเลือกเชื้อราจำนวน 47 isolates เป็นราเอนโดไฟท์ที่สร้างเอนไซม์ lipase 24 isolates สร้างเอนไซม์ cellulase 16 isolates และสร้างเอนไซม์ทั้งสองชนิด 7 isolates เพื่อศึกษาความสามารถในการสร้างเอนไซม์ชนิดอื่นๆ นอกเหนือจากเอนไซม์ lipase และ cellulase และเพื่อเป็นการยืนยันผลที่ได้จากวิธี plate method โดยใช้ชุดทดสอบ API ZYM test kit (รูปที่ 8) ผลการทดสอบดังตารางที่ 13



รูปที่ 8 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ด้วยชุดทดสอบ (API ZYM test kit)

ตารางที่ 13 เอนไซม์ที่สร้างโดยราเอนโดไฟท์เมื่อทดสอบด้วย API ZYM test kit

sample Activities	PMA1	PMA59	MA105	MA111	MA145	MA154	MA159
Activities on agar plate	L	L	L, C	L	C,L	C	C
Alkaline phosphatase	-	-	-	-	-	-	-
Esterase (C4)	+++	++	-	++	-	-	-
Esterase Lipase (C8)	-	-	-	-	-	-	-
Lipase (C14)	-	-	+++	-	-	-	-
Leucine arylamidase	-	-	-	-	++	-	-
Valine arylamidase	-	-	-	-	-	-	-
Crystine arylamidase	-	-	-	-	-	-	-
Trypsin	-	-	-	-	-	-	-
α -Chymotrypsin	-	-	-	-	-	-	-
Acid phosphatase	+++	+++	++++	+++	++	++++	++++
Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase	-	++	+++++	-	-	+++++	++++
α -galactosidase	-	-	-	-	-	-	-
β -galactosidase	-	-	-	-	-	-	-
β -glucuronidase	-	-	-	-	-	-	-
α -glucosidase	-	-	-	-	-	-	-
β -glucosidase	++	-	-	+	+++++	++++	+++
N-acetyl- β -glucosaminidase	-	-	-	-	-	-	-
α -manosidase	-	-	-	-	-	-	-
α -fucosidase	-	-	-	-	-	-	-
Total activities	3	3	3	3	3	3	3

หมายเหตุ: (-) = 0 nanomoles, (+) = 5 nanomoles, (++) = 10 nanomoles, (+++) = 20 nanomoles,

(+++++) = 30 nanomoles, (+++++) = 50 nanomoles, L = lipase, C = cellulase

ตารางที่ 13 (ต่อ) เอนไซม์ที่สร้างโดยราเอนโดไฟท์เมื่อทดสอบด้วย API ZYM test kit

sample Activities	MA1	MA2	PMA11	PMA20	MA44	MA104	PMA4
Activities on agar plate	L	L	L	L	C	L	L
Alkaline phosphatase	+++	-	-	+++	++	-	+
Esterase (C4)	++++	+++++	+	+++	-	++	+++
Esterase Lipase (C8)	-	-	+++	-	-	-	++
Lipase (C14)	-	-	-	-	-	-	-
Leucine arylamidase	-	-	-	-	-	-	-
Valine arylamidase	-	-	-	-	-	-	-
Crystine arylamidase	-	-	-	-	-	-	-
Trypsin	-	-	-	-	-	-	-
α -Chymotrypsin	-	-	-	-	-	-	-
Acid phosphatase	++++	+++++	+++	++++	++++	+++++	+++
Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase	-	+	++	++++	+++	+	++++
α -galactosidase	-	-	-	-	-	-	-
β -galactosidase	++++	+++++	-	-	-	++++	-
β -glucuronidase	-	-	-	-	-	-	-
α -glucosidase	-	-	-	-	-	-	-
β -glucosidase	-	-	-	-	+++	-	-
N-acetyl- β -glucosaminidase	-	-	-	-	-	-	-
α -manosidase	-	-	-	-	-	-	-
α -fucosidase	-	-	-	-	-	-	-
Total activities	4	4	4	4	4	4	5

หมายเหตุ: (-) = 0 nanomoles, (+) = 5 nanomoles, (++) = 10 nanomoles, (+++) = 20 nanomoles, (++++) = 30 nanomoles, (+++++) = 50 nanomoles, L = lipase, C = cellulase

ตารางที่ 13 (ต่อ) เอนไซม์ที่สร้างโดยราเอนโดไฟท์เมื่อทดสอบด้วย API ZYM test kit

sample Activities	PMA43	MA45	MA47	PMA51	PMA52	PMA53	MA81
Activities on agar plate	L	L	L	L	L	L	L
Alkaline phosphatase	++++	++	++	-	++++	-	++
Esterase (C4)	+	++	++	++	-	++	+++
Esterase Lipase (C8)	++	+	++	++	-	++	-
Lipase (C14)	-	-	-	-	-	-	-
Leucine arylamidase	-	-	-	-	-	-	-
Valine arylamidase	-	-	-	-	-	-	-
Crystine arylamidase	-	-	-	-	-	-	-
Trypsin	-	-	-	-	-	-	-
α -Chymotrypsin	-	-	-	-	-	-	-
Acid phosphatase	++++	+++	+++++	++++	++++	+++++	++
Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase	+++++	++++	+++++	++++	+	++++	+
α -galactosidase	-	-	-	-	++	-	-
β -galactosidase	-	-	-	-	-	-	-
β -glucuronidase	-	-	-	-	-	-	-
α -glucosidase	-	-	-	-	-	-	+
β -glucosidase	-	-	-	-	-	-	-
N-acetyl- β -glucosaminidase	-	-	-	+	+	+	-
α -mannosidase	-	-	-	-	-	-	-
α -fucosidase	-	-	-	-	-	-	-
Total activities	5	5	5	5	5	5	5

หมายเหตุ: (-) = 0 nanomoles, (+) = 5 nanomoles, (++) = 10 nanomoles, (+++) = 20 nanomoles,

(+++++) = 50 nanomoles, L = lipase, C = cellulase

ตารางที่ 13 (ต่อ) เอนไซม์ที่สร้างโดยราเอนโดไฟท์เมื่อทดสอบด้วย API ZYM test kit

sample Activities	MA127	MA129	MA164	MA29	PMA60	MA130	MA140
Activities on agar plate	L	L,C	C	C	L	C,L	L
Alkaline phosphatase	+	++	++	-	+++++	-	++
Esterase (C4)	+++	-	-	+++	++	+	++++
Esterase Lipase (C8)	-	-	-	++	-	+	++
Lipase (C14)	-	++	-	-	-	-	-
Leucine arylamidase	+	++++	++++	+++	-	+	-
Valine arylamidase	-	-	-	-	-	-	-
Crystine arylamidase	-	-	-	-	-	-	-
Trypsin	-	-	-	-	-	-	-
α -Chymotrypsin	-	-	-	-	-	-	-
Acid phosphatase	+++++	++	++	++++	++++	+++++	+++++
Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase	++++	++++	++++	+++++	+++	++++	+++++
α -galactosidase	-	-	-	-	++	-	-
β -galactosidase	-	-	-	-	-	-	++
β -glucuronidase	-	-	-	-	-	-	-
α -glucosidase	-	-	-	-	-	-	-
β -glucosidase	-	-	+++	++++	-	+++++	-
N-acetyl- β -glucosaminidase	-	-	-	-	+	-	-
α -manosidase	-	-	-	-	-	-	-
α -fucosidase	-	-	-	-	-	-	-
Total activities	5	5	5	6	6	6	6

หมายเหตุ: (-) = 0 nanomoles, (+) = 5 nanomoles, (++) = 10 nanomoles, (+++) = 20 nanomoles, (+++++) = 30 nanomoles, (+++++) = 50 nanomoles, L = lipase, C = cellulase

ตารางที่ 13 (ต่อ) เอนไซม์ที่สร้างโดยราเอนโดไฟท์เมื่อทดสอบด้วย API ZYM test kit

sample Activities	PMA7	MA37	PMA43	PMA67	MA75	MA132	MA161
Activities on agar plate	C	C	L	L	C	L	L
Alkaline phosphatase	+	-	++	++++	-	+++	+
Esterase (C4)	++	++	++	+	-	++	+
Esterase Lipase (C8)	++	+	+	-	-	+++	++
Lipase (C14)	-	-	-	-	-	-	-
Leucine arylamidase	-	-	-	-	-	++	-
Valine arylamidase	-	-	-	-	-	-	-
Crystine arylamidase	-	-	-	+	-	-	-
Trypsin	-	-	-	-	-	-	-
α -Chymotrypsin	-	-	-	+	-	-	-
Acid phosphatase	+++++	++	++++	++++	+++	+++	++++
Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase	+++++	+	++	+++	+++	++	++++
α -galactosidase	-	+++	-	-	++	-	-
β -galactosidase	-	-	++	-	++++	-	+
β -glucuronidase	-	-	-	-	-	-	-
α -glucosidase	-	+	-	-	-	-	-
β -glucosidase	+++++	+++++	-	-	++++	+	++++
N-acetyl- β -glucosaminidase	++++	-	+	++++	+++	-	-
α -mannosidase	-	-	-	-	-	-	-
α -fucosidase	-	-	-	-	++	-	-
Total activities	7	7	7	7	7	7	7

หมายเหตุ: (-) = 0 nanomoles, (+) = 5 nanomoles, (++) = 10 nanomoles, (+++) = 20 nanomoles, (++++) = 30 nanomoles, (+++++) = 50 nanomoles, L = lipase, C = cellulase

ตารางที่ 13 (ต่อ) เอนไซม์ที่สร้างโดยราเอนโดไฟท์เมื่อทดสอบด้วย API ZYM test kit

sample Activities	MA169	PMA11	MA142	MA148	PMA18	MA116	MA122
Activities on agar plate	C	C	C	L,C	L	C	C,L
Alkaline phosphatase	-	-	-	++	++++	-	+++
Esterase (C4)	-	++++	+	+++	+++	++	++
Esterase Lipase (C8)	+++	-	++	-	++	++++	++
Lipase (C14)	-	-	-	-	-	-	-
Leucine arylamidase	+	-	+	-	+	++	-
Valine arylamidase	-	-	-	-	-	-	+
Crystine arylamidase	-	-	-	-	+	-	-
Trypsin	-	-	-	-	-	-	-
α -Chymotrypsin	-	-	-	-	-	-	-
Acid phosphatase	+++++	+++++	++++	+++++	++++	+++++	+++++
Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase	++++	+++++	++++	++	+++	+++++	+++
α -galactosidase	+	++++	-	-	-	+	-
β -galactosidase	++	++++	-	+++	++++	++++	+
β -glucuronidase	-	-	+	-	-	-	-
α -glucosidase	-	++++	-	++++	-	-	+++
β -glucosidase	+++	+++++	+++	+	-	+++++	+++++
N-acetyl- β -glucosaminidase	-	+++++	++++	+++++	++++	+++	+++++
α -manosidase	-	-	-	-	-	-	-
α -fucosidase	-	-	-	-	-	-	-
Total activities	7	8	8	8	9	9	10

หมายเหตุ: (-) = 0 nanomoles, (+) = 5 nanomoles, (++) = 10 nanomoles, (+++) = 20 nanomoles, (+++++) = 30 nanomoles, (+++++) = 50 nanomoles, L = lipase, C = cellulase

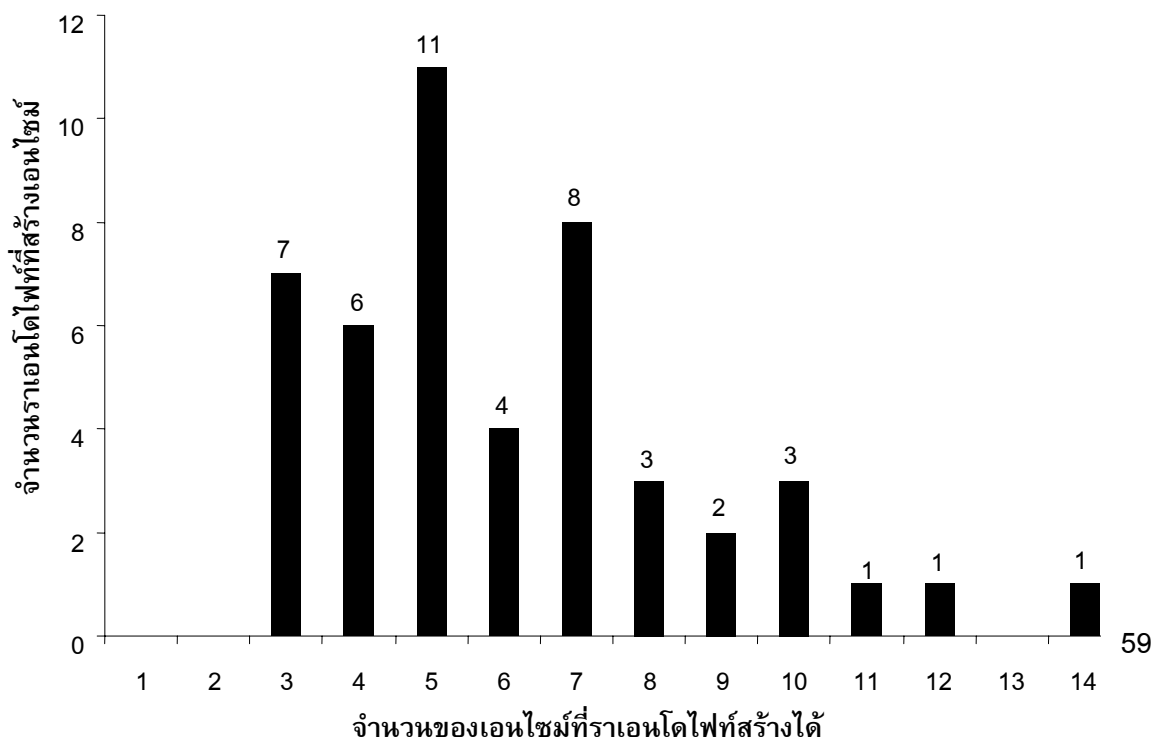
ตารางที่ 13 (ต่อ) เอนไซม์ที่สร้างโดยราเอนโดไฟท์เมื่อทดสอบด้วย API ZYM test kit

sample Activities	MA150	MA158	PMA13	MA86	MA56	Total (%)
Activities on agar plate	C	C	C	C	C, L	-
Alkaline phosphatase	++++	++++	++++	++	++++	27 (57.4)
Esterase (C4)	+	+	++	++	+	37 (78.7)
Esterase Lipase (C8)	+	+	+++	++	++++	25 (53.2)
Lipase (C14)	-	-	-	-	++	3 (6.4)
Leucine arylamidase	+	+	++	+++	++++	16 (34.0)
Valine arylamidase	-	-	-	++	++	3 (6.4)
Crystine arylamidase	-	-	-	+	+	4(8.5)
Trypsin	-	-	-	-	-	0 (0)
α -Chymotrypsin	-	-	-	-	-	1 (2.1)
Acid phosphatase	+++++	+++++	+++++	+++++	++++	47 (100)
Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase	+++++	+++++	+++++	+++++	++	43 (91.5)
α -galactosidase	-	-	++++	-	+++	9 (19.1)
β -galactosidase	+	+	+++++	+++	+++	18 (38.3)
β -glucuronidase	-	-	-	-	-	1 (2.1)
α -glucosidase	+++	+++	++	+++	++++	9 (19.1)
β -glucosidase	+++++	+++	+++++	+++++	+++++	26 (55.3)
N-acetyl- β -glucosaminidase	+++++	+++++	++++	++	+++++	19 (40.4)
α -manosidase	-	-	-	-	-	0 (0)
α -fucosidase	-	-	-	-	-	1 (2.1)
Total activities	10	10	11	12	14	

หมายเหตุ: (-) = 0 nanomoles, (+) = 5 nanomoles, (++) = 10 nanomoles, (+++) = 20 nanomoles, (+++++) = 30 nanomoles, (+++++) = 50 nanomoles, L = lipase, C = cellulase

จากการทดสอบความสามารถของราเอนโดไฟท์ในการสร้างเอนไซม์ชนิดต่างๆ จำนวน 19 ชนิด พบว่าราเอนโดไฟท์ที่ทดสอบสามารถสร้างเอนไซม์ได้ทั้งหมด 17 ชนิด โดยไม่พบการสร้างเอนไซม์ trypsin และ α -mannosidase และพบว่าราเอนโดไฟท์มากกว่า 50% สามารถสร้างเอนไซม์ esterase lipase (C8) (53.2%), β -glucosidase (55.3%), alkaline phosphatase (57.4%), esterase (C4) (78.7%), naphthol-AS-BI-phosphohydrolase (91.5%) และ acid phosphatase (100%) ส่วนเอนไซม์ α -galactosidase, α -glucosidase, leucine arylamidase, β -galactosidase, N-acetyl- β -glucosaminidase มีราเอนโดไฟท์ 19-40% ที่สร้างได้ สำหรับเอนไซม์ lipase (C14), valine arylamidase, cystine arylamidase, α -chymotrypsin, β -glucuronidase และ α -fucosidase มีเชื้อราน้อยกว่า 10% ที่สร้างได้ (ตารางที่ 13)

เมื่อพิจารณาถึงจำนวนเอนไซม์ที่เชื้อราแต่ละ isolates สร้างได้ พบว่าสามารถสร้างได้ตั้งแต่ 3 ถึง 14 ชนิด (รูปที่ 9) โดยจำนวนเอนไซม์ที่ราเอนโดไฟท์สามารถสร้างได้มากที่สุด 3 อันดับแรก คือ 5 ชนิด 7 ชนิด และ 3 ชนิด สร้างโดยราเอนโดไฟท์จำนวน 11 (23.4%), 8 (17.0%) และ 7 (14.9%) isolates ตามลำดับ (รูปที่ 9)



รูปที่ 9 จำนวนของเอนไซม์ที่ราเอนโดไฟท์สร้างได้ ทดสอบด้วยชุดทดสอบ (API ZYM test kit)

เมื่อเปรียบเทียบผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์ lipase ด้วยวิธี plate method และการใช้ชุดทดสอบ API ZYM test kit (ตารางที่ 14) พบว่าชุดทดสอบ API ZYM ให้ผลบวก (85.1%) มากกว่า tributyrin agar (66.0%) โดยที่มีราเอนโดไฟท์ 2 isolates ที่ให้ผลบวกวิธี plate method แต่ให้ผลลบกับ API ZYM test kit และ ราเอนโดไฟท์ 11 isolates ที่ให้ผลลบด้วยวิธี plate method แต่ให้ผลบวกกับ API ZYM test kit

ตารางที่ 14 เปรียบเทียบผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์ lipase ด้วยวิธี plate method และ API ZYM test kit

Plate method		API ZYM test kit (%)			
		ให้ผลบวก	Esterase (C4)	Esterase lipase (C8)	Lipase (C4)
Tributyrin +	31 (66.0)	29 (93.5)	27 (87.1)	15 (48.4)	3 (9.7)
Tributyrin -	16 (34.0)	11 (68.8)	10 (62.5)	10 (62.5)	0
รวม	47	40 (85.1)	37 (78.7)	25 (53.2)	3 (6.4)

ชุดทดสอบ API ZYM test kit สามารถทดสอบเอนไซม์กลุ่ม lipase ได้ 3 ชนิด คือ esterase (C4), esterase lipase (C8) และ lipase (C14) ซึ่งพบว่าราเอนโดไฟท์ส่วนใหญ่ที่นำมาทดสอบสร้างเอนไซม์ esterase (C4) และ esterase lipase (C8) 78.7 และ 53.2% ตามลำดับ และมีเพียง 3 isolates (6.4) ที่สร้าง lipase (C14) (ตารางที่ 14) ซึ่งในจำนวนนี้เป็นเชื้อราที่ให้ผลบวกเมื่อทดสอบด้วย rhodamine B 2 isolates ราเอนโดไฟท์ส่วนใหญ่ (57.5%) สร้างทั้ง esterase (C4) และ esterase lipase (C8) และมีราเอนโดไฟท์เพียง 1 isolate (2.5%) คือ MA 56 ที่สร้างเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด (ตารางที่ 15)

ตารางที่ 15 ราเอนโดไฟท์ที่สร้าง lipase ชนิดต่างๆ ทดสอบโดย API ZYM test kit

ชนิดของเอนไซม์ lipase (n=40)	จำนวนราเชื้อเอนโดไฟท์ (%)
Esterase (C4) ชนิดเดียว	13 (32.5)
Esterase lipase (C8) ชนิดเดียว	1 (2.5)
Lipase (C14) ชนิดเดียว	2 (5.0)
Esterase (C4) + Esterase lipase (C8)	23 (57.5)
Esterase (C4) + Esterase lipase (C8) + Lipase (C14)	1 (2.5)

สำหรับการทดสอบการสร้างเอนไซม์ cellulase พบว่า การทดสอบทั้ง 2 วิธีให้ผลสอดคล้องกัน จากเชื้อราที่ให้ผลบวกบนอาหาร CMC 23 isolates มีจำนวน 21 isolates (91.3%) ที่ให้ผลบวกกับชุดทดสอบ API ZYM test kit และราเอนโดไฟท์ที่ให้ผลลบบนอาหาร CMC 5 isolates (20.8%) ให้ผลบวกกับชุดทดสอบ API ZYM test kit ด้วย (ตารางที่ 16)

ตารางที่ 16 เปรียบเทียบผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์ cellulase ด้วยวิธี plate method และ API ZYM test kit

จำนวนราเอนโดไฟท์ (%)		
Plate method		API ZYM test kit (β -glucosidase)
CMC+	23	21 (91.3)
CMC-	24	5 (20.8)

3.4 การศึกษาความสามารถของราเอนโดไฟท์ในการสร้างเอนไซม์

จากการทดสอบความสามารถของราเอนโดไฟท์ในการสร้างเอนไซม์ lipase, cellulase, amylase และ protease ด้วยวิธี plate method ทำการคัดเลือกราเอนโดไฟท์ที่มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ lipase และ cellulase สูงสุด 3 อันดับ มาศึกษาความสามารถในการสร้างเอนไซม์ lipase และ cellulase ในอาหารเหลว และ ศึกษาความสามารถในการสร้างเอนไซม์ cellulase ในอาหารแข็ง สำหรับเอนไซม์ amylase พบว่ามีเพียง 2 isolates ที่ให้ผลบวกและมีค่า EPR ต่ำ จึงไม่นำมาศึกษาต่อ และไม่พบราเอนโดไฟท์ที่สร้างเอนไซม์ protease

3.4.1 การศึกษาการสร้างเอนไซม์ lipase ในอาหารเหลว

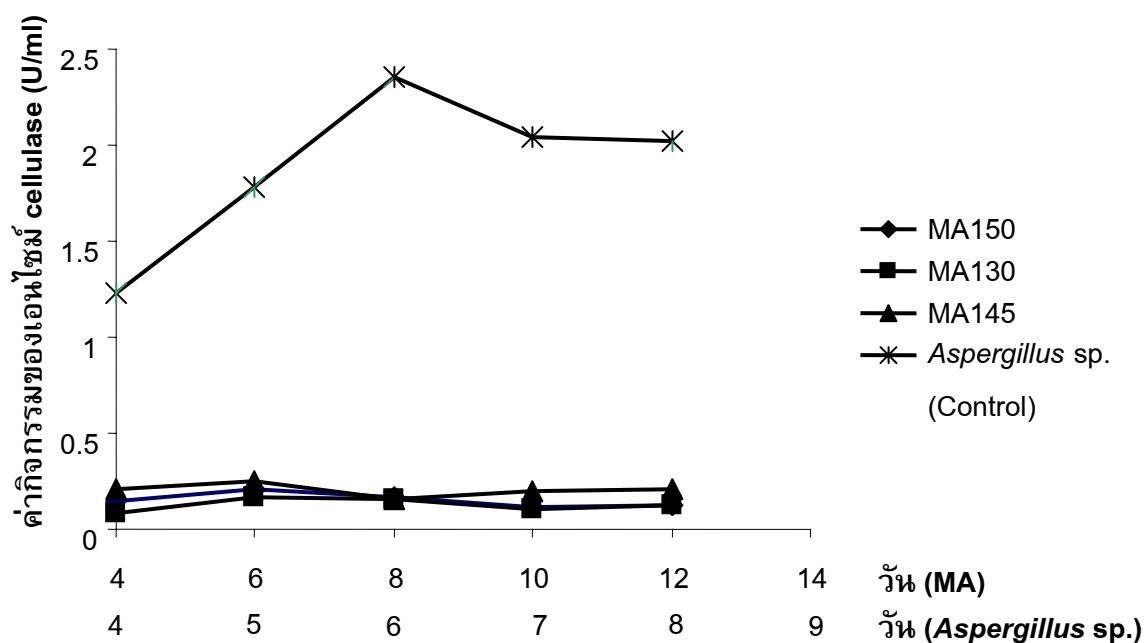
จากการศึกษาประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ lipase เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว ของราเอนโดไฟท์ 3 isolates ที่มีค่า EPR บน tributyrin agar สูงสุด 3 อันดับ คือ MA1, MA2 และ PMA1 ซึ่งแยกได้จากต้นแสมดำ (*Avicennia officinalis*) ซึ่งให้ค่า EPR เท่ากับ 4.95, 4.75 และ 4.35 ตามลำดับ (ตารางที่ 10) เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ที่มี tributyrin เป็นสับสเตรท บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 14 วัน พบว่าเชื้อราทั้ง 3 isolates ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ lipase ได้ที่สภาวะดังกล่าว

3.4.2 การศึกษาการสร้างเอนไซม์ cellulase

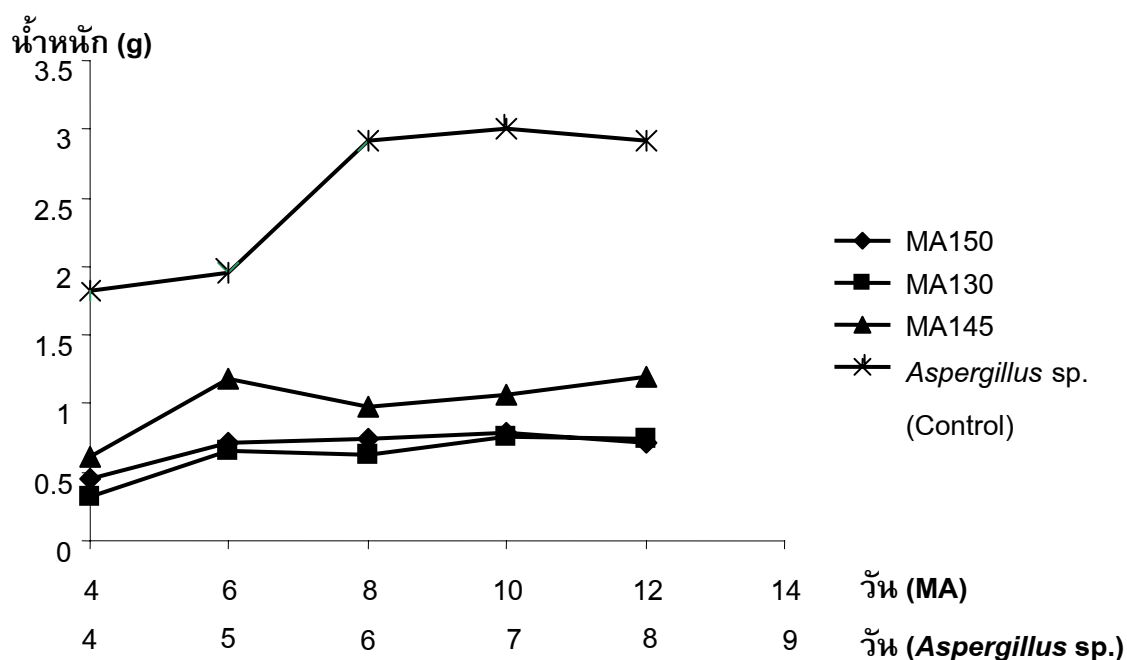
จากการคัดเลือกราเอนโดไฟท์ ที่มีค่า EPR บนอาหาร CMC สูงสุด 3 อันดับ คือ MA145, MA130 และ MA150 ที่แยกได้จากต้นโกงกางใบใหญ่ (*Rhizophora mucronata*) ต้นตะบูน (*Xylocarpus granatum*) และต้นฝาดดอกแดง (*Lumnitzera littorea*) ซึ่งให้ค่า EPR เท่ากับ 2.63, 1.96 และ 1.92 ตามลำดับ (ตารางที่ 11) นำมาทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ในอาหารเหลวและอาหารแข็ง ได้ผลดังนี้

3.4.2.1 การสร้างเอนไซม์ cellulase ในอาหารเหลว

จากการทดสอบความสามารถของราเอนโดไฟท์ทั้ง 3 isolates ในการสร้างเอนไซม์ cellulase ในอาหารเหลวที่มี CMC เป็นสับสเตรท บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 14 วัน โดยเก็บผลในวันที่ 4, 6, 8, 10 และ 12 ของการทดลอง สำหรับเชื้อ control (*Aspergillus* sp.) เก็บผลในวันที่ 4, 5, 6, 7, 8 และ 9 ของการทดลอง พบว่าราเอนโดไฟท์ ทั้ง 3 isolates ให้ค่ากิจกรรมต่ำมากโดยมีค่ากิจกรรมสูงสุดเท่ากับ 0.17-0.25 U/ml เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 6 วัน ในขณะที่เชื้อ control ให้ค่ากิจกรรมสูงสุดเท่ากับ 2.44 U/ml ในวันที่ 3 ของการศึกษา (ตารางที่ 3ค และ รูปที่ 10) และเมื่อศึกษาการเจริญเติบโตของราเอนโดไฟท์ทั้ง 3 ชนิด โดยการหาน้ำหนักแห้ง พบว่าราเอนโดไฟท์ทั้ง 3 ชนิดมีการเจริญเติบโตน้อยมาก โดยแนวโน้มของการเจริญของราเอนโดไฟท์ทุกชนิดที่ทดสอบเป็นไปในทางเดียวกันคือค่อยๆ เพิ่มขึ้นทีละน้อยใน 6 วันแรกของการทดสอบ และหลังจากนั้นการเจริญเติบโตจะค่อยๆ คงที่ ซึ่งค่าน้ำหนักแห้งอยู่ในช่วง 0.7-1.2 กรัม เมื่อเทียบกับ *Aspergillus* sp. ซึ่งให้ค่าน้ำหนักแห้งถึง 2.9 กรัม (รูปที่ 11 และ ตารางที่ 3ค)



รูปที่ 10 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ cellulase ที่ราเอนโดไฟท์ MA130, MA145, MA150 และ *Aspergillus* sp. (control) สร้างเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่มี carboxymethylcellulose ความเข้มข้น 1% (w/v) เป็นสับสเตรท



รูปที่ 11 การเจริญของราเอนโดไฟท์ MA130, MA145, MA150 และ *Aspergillus* sp. (control) ในอาหารเหลว ปริมาตร 20 มิลลิลิตรที่มี carboxymethylcellulose ความเข้มข้น 1% (v/v) เป็นสับสเตรท

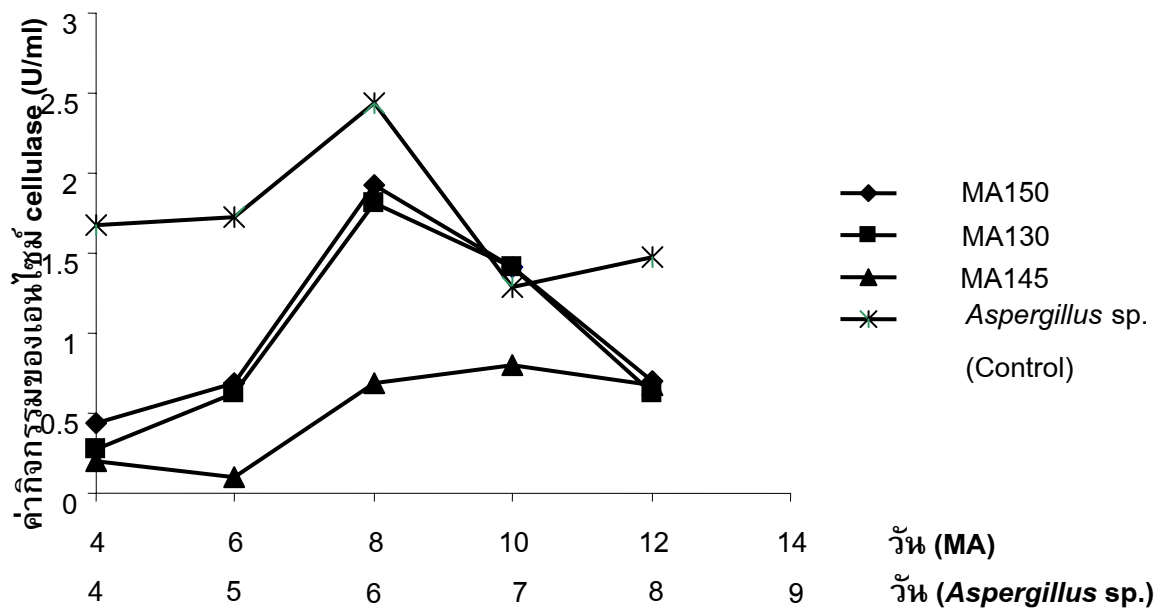
3.4.2.2 การสร้างเอนไซม์ cellulase ในอาหารแข็ง

จากการศึกษาความสามารถในการสร้างเอนไซม์ cellulase ของราเอนโดไฟท์ทั้ง 3 isolates (MA130, MA145 และ MA150) ในอาหารแข็งที่มีฟางข้าว และฟางข้าวผสมใบพีชป่าชายเลนอัตราส่วน 3:2 เป็นสับสเตรท (รูปที่ 12) พบว่าในอาหารที่มีฟางข้าวเป็นสับสเตรทและมีความชื้นเริ่มต้น 75% ราเอนโดไฟท์ MA150 และ MA130 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ cellulase ใกล้เคียงกัน คือ เท่ากับ 1.93 และ 1.81 U/ml ตามลำดับ ในวันที่ 8 ของการศึกษา โดยเชื้อ control ให้ค่ากิจกรรมเท่ากับ 2.44 U/ml เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 6 วัน ซึ่งเชื้อ MA150 และ MA130 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ cellulase น้อยกว่าเชื้อ control คิดเป็น 79.1 และ 74.2% ของเชื้อ control ตามลำดับ ส่วนราเอนโดไฟท์ MA145 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์น้อยที่สุดเพียง 0.8 U/ml (รูปที่ 13) เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน

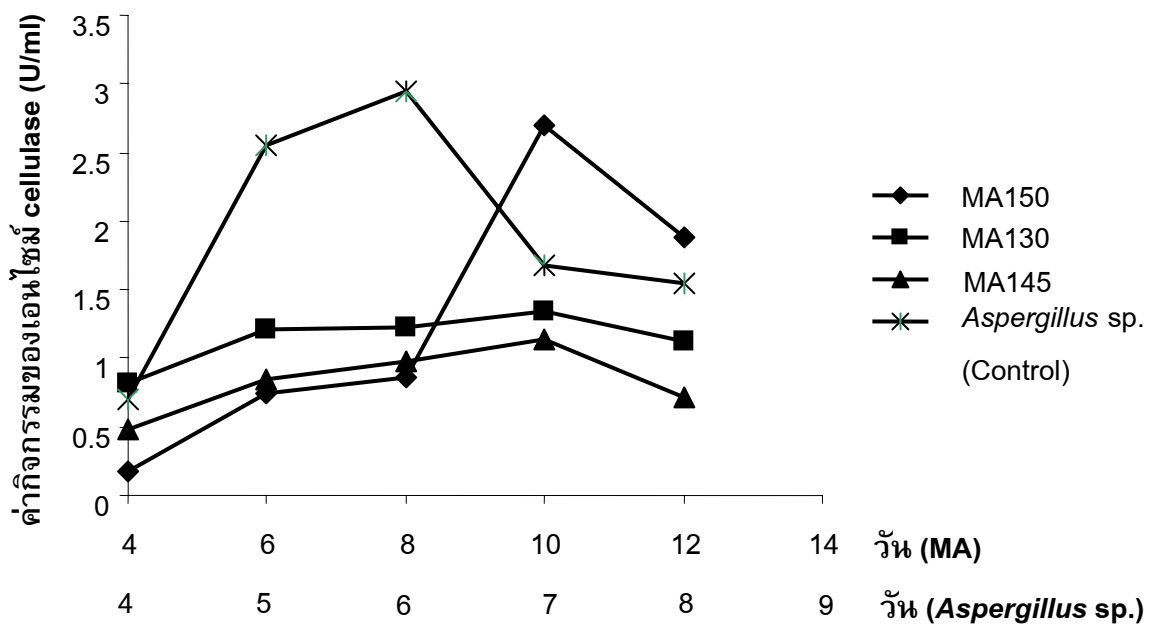
เมื่อนำราเอนโดไฟท์ทั้ง 3 isolates (MA130, MA145 และ MA150) มาศึกษาความสามารถในการสร้างเอนไซม์ cellulase ในอาหารที่มีฟางข้าวและใบพีชป่าชายเลนผสมในอัตราส่วน 3:2 ที่มีความชื้นเริ่มต้น 70% พบว่า เชื้อ control ให้ค่ากิจกรรมสูงที่สุดเท่ากับ 2.95 U/ml ในวันที่ 6 ของการศึกษา โดยราเอนโดไฟท์ MA150 ให้ค่ากิจกรรมสูงที่สุดเท่ากับ 2.7 U/ml เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน ซึ่งคิดเป็น 91.5% ของเชื้อ control ส่วน MA130 และ MA145 ให้ค่ากิจกรรม 1.34 และ 1.14 U/ml ตามลำดับ ในวันที่ 10 (รูปที่ 14)



รูปที่ 12 การเจริญของราเอนโดไฟท์ (ก) MA150 (ข) MA145 (ค) MA130 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีฟางข้าวและใบพีชป่าชายเลนอัตราส่วน 3:2 เป็นสับสเตรท



รูปที่ 13 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ cellulase ที่ราเอนโดไฟท์ MA130, MA145, MA150 และ *Aspergillus sp.* (control) สร้างในอาหารแข็งที่มีฟางข้าวเป็นสับสเตรท



รูปที่ 14 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ cellulase ที่ราเอนโดไฟท์ MA130, MA145, MA150 และ *Aspergillus sp.* (control) สร้างในอาหารที่มีฟางข้าวผสมกับไบฟีชปาชายเลน อัตราส่วน 3:2 เป็นสับสเตรท

3.5 การจัดจำแนกชนิดของราเอนโดไฟท์ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์

จากการคัดเลือกราเอนโดไฟท์ที่มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ lipase และ cellulase 10 อันดับแรก และราเอนโดไฟท์ที่ให้ผลบวกเมื่อทดสอบบนอาหาร rhodamine B agar จำนวน 3 isolates (ตารางที่ 10, 11 และ 12) รวม 21 isolates เพื่อนำมาจัดจำแนกชนิด โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และวิธีการทางชีวโมเลกุล ผลการศึกษาเป็นดังนี้

3.5.1 การจัดจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ลักษณะโคโลนีของราเอนโดไฟท์ทั้ง 21 isolates มีความแตกต่างกันตามตารางที่ 17 รูปที่ 15 และ 16 ซึ่งราเอนโดไฟท์ที่นำมาศึกษาส่วนใหญ่ (18/21; 85.7%) มี melanin pigment โคโลนีสีน้ำตาลแกมเขียว และเส้นใยสีน้ำตาล จัดเป็นรากลุ่ม dematiaceous fungi โดยราเอนโดไฟท์ทั้งหมดมีเส้นใยแบบมีผนังกัน (septate) และมีเพียง 3 isolates ที่สร้างโคโคนิเดีย คือ MA111, MA129 และ PMA1 โดย MA111 และ PMA1 มีโคโคนิเดียเซลล์เดี่ยว สีน้ำตาล รูปร่างรี ปลายตัดทั้ง 2 ด้าน และต่อกันเป็นสาย แตกแขนงคล้ายต้นไม้ จัดอยู่ใน Genus *Cladosporium* ส่วน MA129 สร้างโคโคนิเดียรูปกระสวยหัวท้ายแหลม สีน้ำตาลมีหลายเซลล์ และมีรยางค์ที่ปลายแหลมด้านหนึ่งอย่างน้อย 2 เส้น จัดอยู่ใน Genus *Pestalotiopsis* (รูปที่ 16)

ตารางที่ 17 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราเอนโดไฟท์ 21 isolates ที่มีความสามารถ
ในการผลิตเอนไซม์

รหัส	การเจริญ	ลักษณะโคโลนี	สีเส้นใย	การสร้าง conidia	เอนไซม์
MA1	F	สีขาวเรียบติดอาหาร เลี้ยงเชื้อ บริเวณที่แก่จะ มีสีเหลือง สร้างสารสีม่วง ปล่อยลงสู่อาหารเลี้ยง เชื้อ	สีน้ำตาล	N	L
MA2	F	สีขาวคล้ายๆ MA1 ขอบๆ โคลนีสีม่วง	สีน้ำตาล	N	L
MA56	F	สีขาว เส้นใยฟู	ไม่มีสี	N	C, L
MA81	F	สีขาวครีม กำมะหยี่	สีน้ำตาล	N	L
MA105	F	สีขาว เมื่อเลี้ยงไว้นานๆ บริเวณตรงกลางโคโลนี จะมีสีคล้ำๆ มีส่วนของ stroma ชูขึ้นมา	สีน้ำตาล	N	C, L
MA111	F	สีเขียวยูรีน้ากำมะหยี่นุ่มๆ ขอบโคโลนีสีขาว	สีน้ำตาล	<i>Cladosporium</i> sp.	L
MA122	S	สีครีม ขอบๆ โคลนีสี ลักษณะเมือก เมื่อเลี้ยง ไว้นานๆ เมือกเหล่านี้จะ หายไป	สีน้ำตาล	N	C, L
MA127	S	สีเขียวยูรีน้า ขรุขระ แข็ง	สีน้ำตาล	N	L
MA129	F	สีขาว ฟู มีหยดน้ำสีดำ บนโคโลนี	สีน้ำตาล	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	C, L
MA130	S	สีครีม ขอบโคโลนีเป็น เมือก เลี้ยงไปนานๆ สี ของเส้นใยเป็นสีน้ำตาล เข้ม	สีน้ำตาล	N	C, L

F: เจริญเต็ม plate ในเวลา 5-7 วัน, S: เจริญเต็ม plate มากกว่า 7 วัน, N: ไม่สร้างโคโคนิเดีย, L: lipase,
C: cellulase

ตารางที่ 17 (ต่อ) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราเอนโดไฟท์ 21 isolates ที่มี
ความสามารถในการผลิตเอนไซม์

รหัส	การเจริญ	ลักษณะโคโลนี	สีเส้นใย	การสร้าง conidia	เอนไซม์
MA132	F	สีขาว พู เมื่อเลี้ยงนานๆ จะมีสีน้ำตาล และมี stroma ชูขึ้นมา	สีน้ำตาล	N	L
MA140	S	สีเขียวยูรีน้า ขรุขระ แข็ง	สีน้ำตาล	N	L
MA145	S	สีขาวครีม แบนราบ จะมี เม็ดสีดำอยู่บนโคโลนี	สีน้ำตาล	N	C, L
MA148	S	สีขาวครีม แบนราบ	ไม่มีสี	N	C, L
MA150	S	สีขาวครีม ขอบๆ โคโลนีมี ลักษณะเมือก เมื่อเลี้ยงไว้ นานๆ เมือก 66 หายไป	สีน้ำตาล	N	C
MA154	S	สีขาว ลักษณะคล้ายสำลี	สีน้ำตาล	N	C
MA158	S	สีครีม ขอบๆ โคโลนีมี ลักษณะเมือก เมื่อเลี้ยงไว้ นานๆ เมือกเหล่านี้จะ หายไป	สีน้ำตาล	N	C
MA161	S	สีเขียวยูรีน้า ขรุขระ แข็ง	สีน้ำตาล	N	L
MA164	F	สีครีม กำมะหยี่	สีน้ำตาล	N	C
MA169	S	สีเขียวยูรีน้า ขรุขระ แข็ง	สีน้ำตาล	N	C
PMA1	F	สีเขียวยูรีน้ากำมะหยี่ย่นๆ ขอบโคโลนีสีขาว	สีน้ำตาล	<i>Cladosporium</i> sp.	L

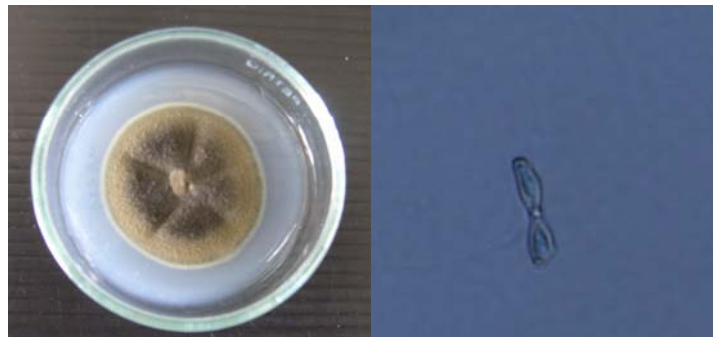
F: เจริญเต็ม plate ในเวลา 5-7 วัน, S: เจริญเต็ม plate มากกว่า 7 วัน, N: ไม่สร้างโคนิเดีย, L: lipase,
C: cellulase



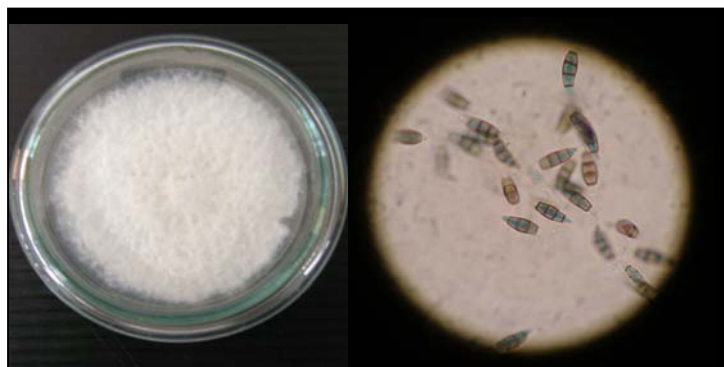
รูปที่ 15 ลักษณะโคโลนีราเอนโดไฟท์จำนวน 18 isolates ที่สร้างเอนไซม์ที่นำมาจัดจำแนกชนิด



PMA1

Cladosporium sp.

MA111

Cladosporium sp.

MA129

Pestalotiopsis sp.

รูปที่ 16 ลักษณะโคโลนีและโคนินเดียของราเอนโดไฟท์จำนวน 3 isolates ที่สร้างเอนไซม์ที่นำมา
จัดจำแนกชนิด

3.5.2 การจัดจำแนกราเอนโดไฟท์โดยใช้ลักษณะทางชีวโมเลกุล

ราเอนโดไฟท์ที่สร้างเอนไซม์ที่นำมาจัดจำแนกโดยวิธีทางชีวโมเลกุลทั้งหมด 21 isolates พบว่ามีราเอนโดไฟท์ 2 isolates (MA132 และ MA148) ที่ไม่สามารถเพิ่มจำนวน ส่วน LSU และ ITS rDNA ได้ จึงไม่สามารถจำแนกชนิดได้ในส่วนของราเอนโดไฟท์อีก 19 isolates จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน LSU และ ITS rDNA พบว่ามีกระจายตัวอยู่ใน phylum Basidiomycota และ Ascomycota รวม 6 orders โดยมีราเอนโดไฟท์เพียง 1 isolate คือ MA56 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ Order Agaricales, Phylum Basidiomycota ส่วนที่เหลือจัดอยู่ใน Phylum Ascomycota โดยกระจายตัวอยู่ใน order ต่างๆ 5 orders ได้แก่ Capnodiales (MA111 และ PMA1), Pleosporales (MA122, MA130, MA150, MA158 และ MA164), Bostryosphaeriales (MA127, MA140, MA145, MA161 และ MA169), Diaporthales (MA1, MA2, MA81 และ MA154) และ Xylariales (MA105 และ MA129) ซึ่งจะเสนอผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของราเอนโดไฟท์จากพืชป่าชายเลนกับเชื้อราอื่นๆ ใน order ต่าง ๆ ดังกล่าว อย่างละเอียดดังต่อไปนี้

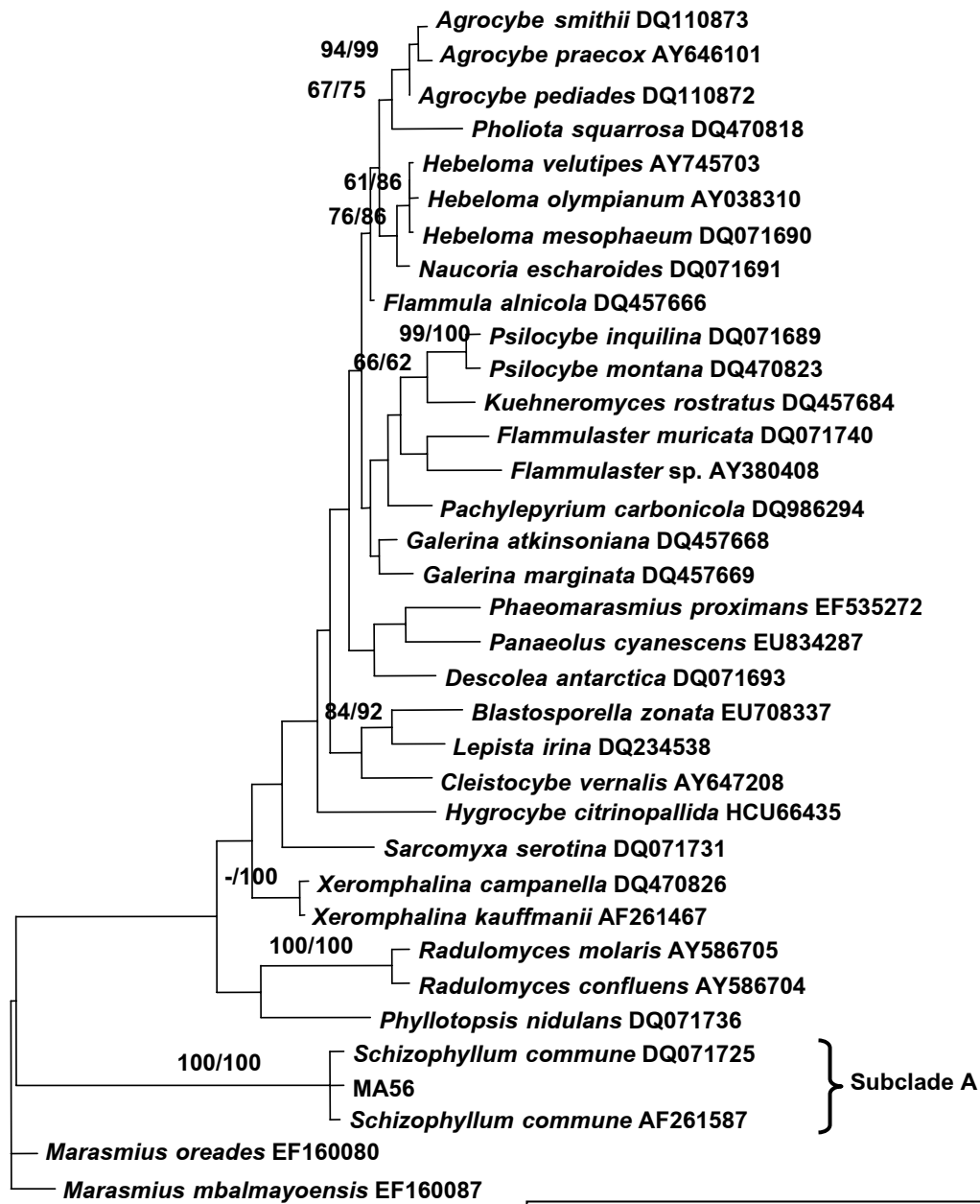
Order Agaricales, Phylum Basidiomycota

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน LSU rDNA ของราเอนโดไฟท์ MA56 พบว่า จัดอยู่ใน order Agariales, phylum Basidiomycota ซึ่งเป็นราเอนโดไฟท์ isolate เดียวที่อยู่ใน phylum Basidiomycota ในชุดข้อมูลประกอบด้วยราชชนิดอื่นๆ ใน order นี้ และ order ใกล้เคียง รวม 44 taxa จากฐานข้อมูล GenBank โดยมี *Marasmius oreades* (EF160080) และ *Marasmius mbalmayoensis* (EF160087) เป็น outgroup มี total character 1313 characters, parsimony informative 187 characters และ parsimony uninformative 84 characters เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี MP ทำให้ได้ MPT 84 trees โดยมีค่า tree length, CI และ RI เท่ากับ 733 steps, 0.4079 และ 0.6015 ตามลำดับ ดังแสดง tree ที่เหมาะสม (best tree) ในรูปที่ 17 ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย K-H test หลังจากวิเคราะห์ด้วยวิธี MP และ วิธี NJ พบว่าทั้ง 2 วิธีมี topology ที่ใกล้เคียงกัน จึงแสดงผลเฉพาะ tree จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี MP

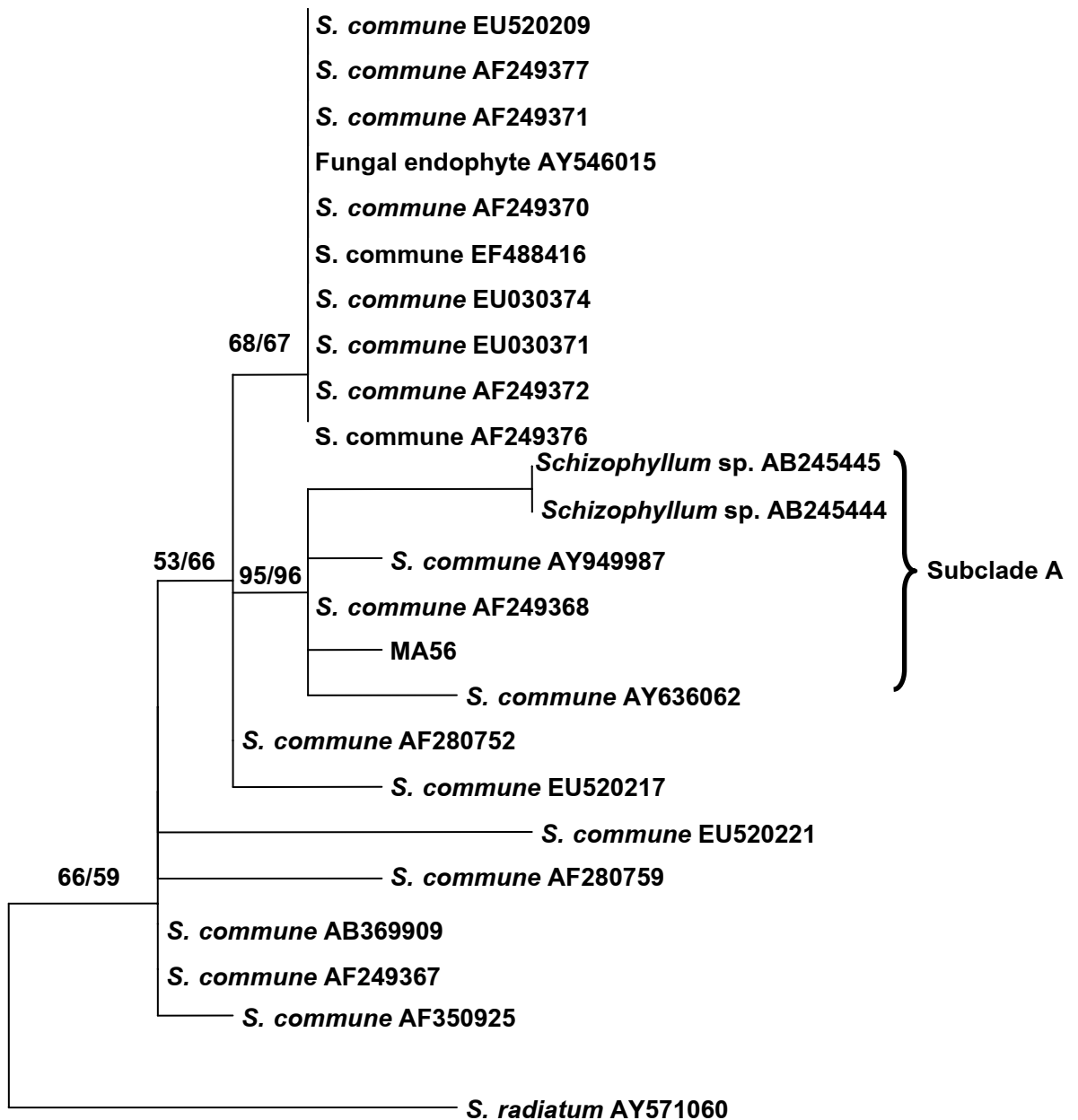
เชื้อรา MA56 มีตำแหน่งอยู่ใน subclade A ดังรูปที่ 17 ซึ่งมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ family Schizophyllaceae โดย subclade นี้ประกอบด้วย *Schizophyllum commune* (DQ071725 และ AF261587) ด้วยค่าความเชื่อมั่น bootstrap ที่สูง 100 และ 100% จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี MP และ NJ ตามลำดับ

ผลจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน LSU rDNA นั้นสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน ITS rDNA ที่ใช้วิธีการวิเคราะห์เดียวกัน โดยในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน ITS rDNA ชุดข้อมูลประกอบด้วยรา MA56 และราชชนิดอื่นใน Genus *Schizophyllum* และ Fungal endophyte 1 taxa รวมเป็น 23 taxa โดยใช้ *Schizophyllum radiatum* (AY571060) เป็น outgroup มี total character 618 characters, parsimony informative 42 characters, parsimony uninformative 14 characters และได้ MPT 1000 trees โดยมีค่า tree length, CI และ RI เท่ากับ 30, 1.0 และ 1.0 ตามลำดับ (รูปที่ 18)

ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน ITS rDNA ของเชื้อรา MA56 พบว่า มีตำแหน่งอยู่ใน subclade A ดังรูปที่ 18 ซึ่งมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับสมาชิกใน family Schizophyllaceae โดย subclade นี้ ประกอบด้วย *Schizophyllum* sp. (AB245444 และ AB245445) และ *Schizophyllum commune* (AF249368, AY636062 และ AY949987) ด้วยค่าความเชื่อมั่น bootstrap สูง 95 และ 96% จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี MP และ NJ ตามลำดับ และจากการเปรียบเทียบ % sequence similarity ของ ITS rDNA ระหว่าง MA56 กับ taxa ที่ใกล้เคียงกันใน subclade ดังกล่าว พบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 98.8-100% และมีความใกล้เคียงกับ *Schizophyllum commune* (AF249368) มากที่สุด 99.2% โดย MA56 มี base insertion ยาว 1 bp แทรกอยู่บริเวณตำแหน่งที่ 24 ดังนั้นผลจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน LSU และ ITS rDNA ควรจัดจำแนกรา MA56 เป็น *Schizophyllum commune*



รูปที่ 17 MPT ที่เหมาะสมที่สุดจากการวิเคราะห์ส่วน LSU rDNA sequence โดยหลักการ MP ของ ราเอนโดไฟท์ MA56 ที่มีค่าความเชื่อมั่น bootstrap จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี MP (ซ้าย) และ วิธี NJ (ขวา) มากกว่า 50%



Total 618 characters included

Tree length = 30 steps

CI = 1.0

RI = 1.0

รูปที่ 18 MPT ที่เหมาะสมที่สุดจากการวิเคราะห์ส่วน ITS rDNA sequence โดยหลักการ MP ของราเอนโดไฟท์ MA56 ที่มีค่าความเชื่อมั่น bootstrap จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี MP (ซ่าย) และ วิธี NJ (ขวา) มากกว่า 50%

Order Capnodiales

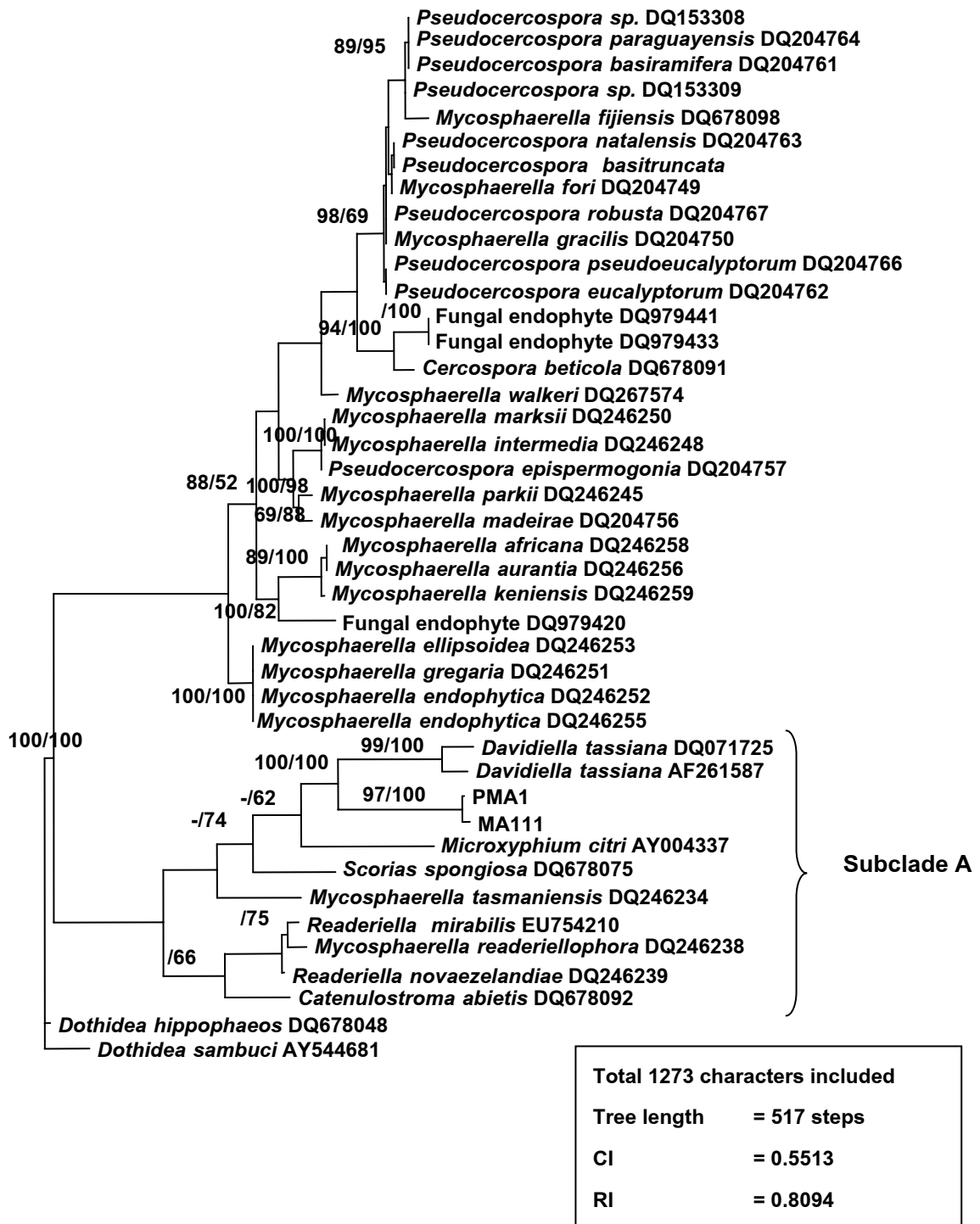
จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน LSU rDNA ของราเอนโดไฟท์ MA111 และ PMA1 พบว่าจัดอยู่ใน Order Capnodiales ในชุดข้อมูลประกอบด้วยราชชนิดต่างๆ ใน order นี้ จำนวน 38 taxa โดยมี *Dothidea sambuci* (AY544681) และ *Dothidea hippophaeos* (DQ678048) เป็น outgroup มี total character 1273 characters, parsimony informative 169 characters และ parsimony uninformative 46 characters เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี MP ทำให้ได้ MPT 134 trees โดยมีค่า tree length, CI และ RI เท่ากับ 517 steps, 0.5513 และ 0.8094 ตามลำดับ ดังแสดง tree ที่เหมาะสม (best tree) ในรูปที่ 19 ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย K-H test หลังจากวิเคราะห์ด้วยวิธี MP และ วิธี NJ พบว่าทั้ง 2 วิธีมี topology ที่ใกล้เคียงกัน จึงแสดงผลเฉพาะ tree จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี MP

เชื้อรา MA111 และ PMA1 มีตำแหน่งอยู่ใน subclade A ดังรูปที่ 19 ซึ่งมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ Family Davidiellaceae ซึ่งประกอบด้วย *Davidiella tassiana* (DQ071725 และ AF261587) ด้วยค่าความเชื่อมั่น bootstrap ที่สูง 97 และ 100% จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี MP และ NJ ตามลำดับ โดย MA111 และ PMA1 มีความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกันมากเนื่องจากมี branch length ที่ค่อนข้างสั้น แต่เชื้อราทั้ง 2 isolates มี branch length ที่ห่างกับเชื้อ *Davidiella tassiana* (DQ071725 และ AF261587) แต่เมื่อพิจารณาจากค่า bootstrap พบว่าให้ค่า bootstrap ที่ค่อนข้างสูง ในการศึกษาครั้งนี้ เชื้อรา PMA1 สามารถวิเคราะห์ได้เฉพาะตำแหน่งของ LSU เท่านั้น

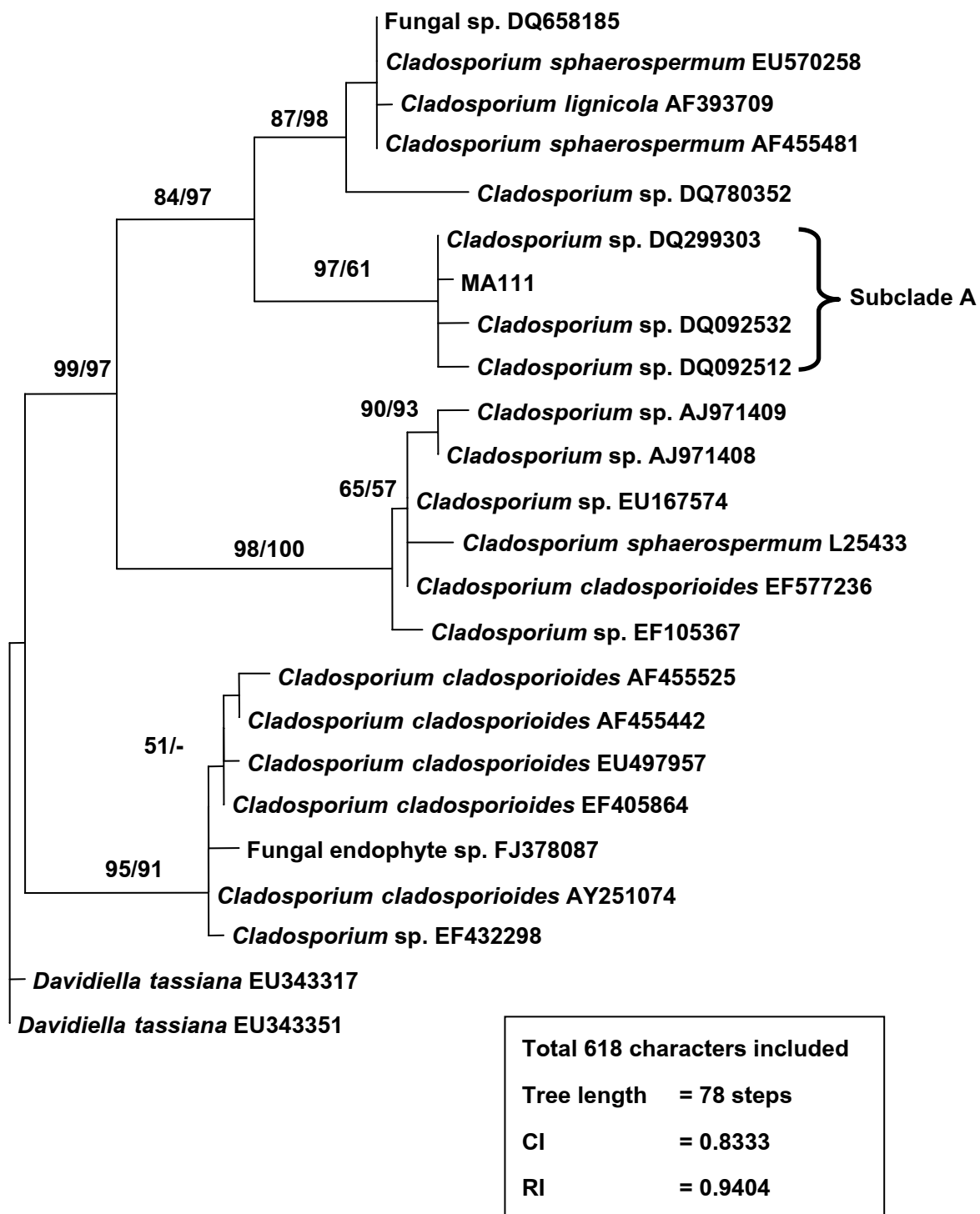
สำหรับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน LSU ของเชื้อรา MA111 พบว่าให้ผลสอดคล้องกับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน ITS rDNA ที่ใช้วิธีการวิเคราะห์เดียวกัน โดยชุดข้อมูลประกอบด้วยรา MA111 และราชชนิดอื่นใน Genus *Cladosporium* และ Fungal endophyte และ Fungal sp. อย่างละ 1 taxon รวมเป็น 21 taxa โดยใช้ *Davidiella tassiana* (EU343317 และ EU343351) เป็น outgroup มี total character 618 characters, parsimony informative 42 characters, parsimony uninformative 14 characters และได้ MPT 268 trees โดยมีค่า tree length, CI และ RI เท่ากับ 78, 0.8333 และ 0.9404 ตามลำดับ (รูปที่ 20)

ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน ITS rDNA ของเชื้อรา MA111 พบว่า มีตำแหน่งอยู่ใน subclade A ดังรูปที่ 20 ซึ่งมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับสมาชิกใน Family Davidiellaceae โดย subclade นี้ ประกอบด้วย *Cladosporium* sp. (DQ092512, DQ092532 และ DQ299303) ด้วยค่าความเชื่อมั่น bootstrap เท่ากับ 97 และ 61% จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี MP และ NJ ตามลำดับ และจากการเปรียบเทียบ % sequence similarity ระหว่าง MA111 กับ taxa ที่ใกล้เคียงกันใน subclade ดังกล่าว พบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 98.9-99.5% และมีความใกล้เคียงกับ *Cladosporium* sp. (DQ299303) มากที่สุด 99.5% โดย MA111 มี base insertion

ยาว 1 bp แทรกอยู่บริเวณตำแหน่งที่ 78 ดังนั้นผลจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน LSU และ ITS rDNA ควรจัดจำแนกรา MA111 เป็น *Cladosporium* sp. และ สำหรับ PMA1 เมื่อใช้ข้อมูลลักษณะของการสร้างสปอร์พบว่าการสร้างสปอร์ที่คล้ายคลึงกับ MA111 ดังนั้นจึงจัด PMA1 เป็น *Cladosporium* sp. ด้วยเช่นกัน



รูปที่ 19 MPTที่เหมาะสมที่สุดจากการวิเคราะห์ส่วน LSU rDNA sequence โดยหลักการ MP ของราเอนโดไฟท์ order Capnodiales (MA111 และ PMA1) ที่มีค่าความเชื่อมั่น bootstrap จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี MP (ซ้าย) และ วิธี NJ (ขวา) มากกว่า 50%



รูปที่ 20 MPTที่เหมาะสมที่สุดจากการวิเคราะห์ส่วน ITS rDNA sequence โดยหลักการ MP ของ ราเอนโดไฟท์ MA111 ที่มีค่าความเชื่อมั่น bootstrap จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี MP (ซ้าย) และ วิธี NJ (ขวา) มากกว่า 50%

Order Pleosporales

ประกอบด้วยราเอนโดไฟท์ 5 taxa ได้แก่ MA122, MA130, MA150, MA158 และ MA164 จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน LSU rDNA ของราเอนโดไฟท์ MA 150, MA158 และ MA164 พบว่าจัดอยู่ใน order Pleosporales ซึ่งในชุดข้อมูลประกอบด้วยราชนิดอื่นๆ ใน order นี้ 36 taxa และ Fungal endophyte จำนวน 3 taxa จากฐานข้อมูล GenBank โดยกำหนดให้ *Delitschia didyma* (DQ384090) และ *Lepidosphaeria nicotiae* (DQ678067) เป็น outgroup มี total character 1302 characters, parsimony informative 185 characters และ parsimony uninformative 67 characters เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี MP ทำให้ได้ MPT 12 trees โดยมีค่า tree length, CI และ RI เท่ากับ 585 steps, 0.5470 และ 0.7530 ตามลำดับ ดังแสดง tree ที่เหมาะสม ในรูปที่ 21 ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย K-H test หลังจากวิเคราะห์ด้วยวิธี MP และ วิธี NJ พบว่าทั้ง 2 วิธีมี topology ที่ใกล้เคียงกัน จึงแสดงผลเฉพาะ tree จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี MP

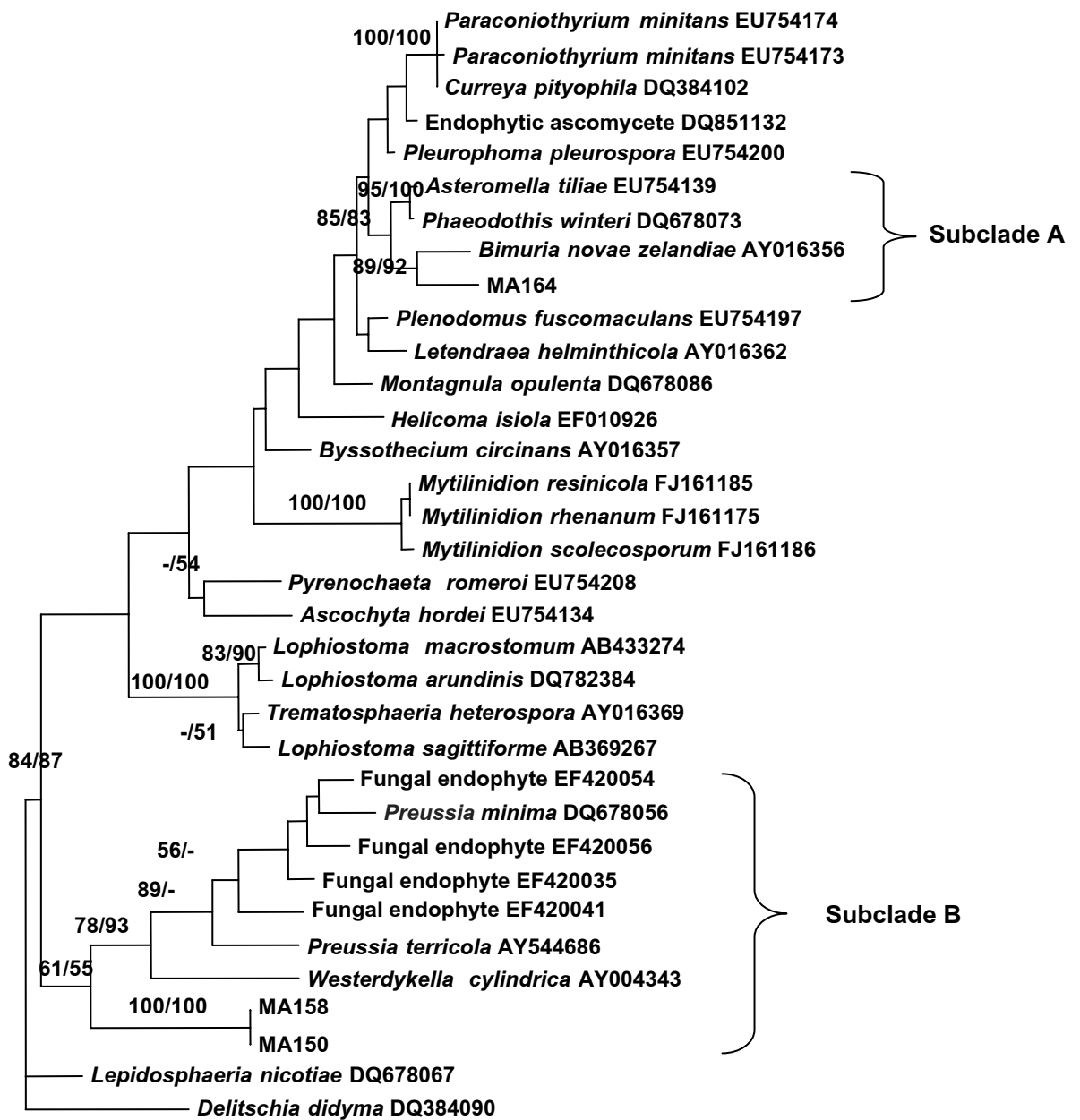
เชื้อรา MA164 มีตำแหน่งอยู่ใน subclade A ดังรูปที่ 21 ซึ่งมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ family Melanommataceae โดยแสดงความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อ *Bimuria novae-zelandiae* (AY016356) ด้วยค่าความเชื่อมั่น bootstrap ที่ค่อนข้างสูงคือ 89 และ 92% จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี MP และ NJ ตามลำดับ และพบว่า MA150 และ MA158 มีความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกันมากซึ่งดูได้จาก branch length ที่สั้น และเชื้อราทั้ง 2 isolates อยู่ใน subclade B ซึ่งเป็นราใน order Pleosporales แต่ไม่แสดงความสัมพันธ์กับ family ใดใน order นี้

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน ITS rDNA ของราเอนโดไฟท์ MA122 และ MA130 ซึ่งไม่มีข้อมูลในส่วนของ LSU rDNA เนื่องจากไม่สามารถเพิ่มจำนวนในส่วนนี้ได้ และเชื้อราเอนโดไฟท์ MA150, MA158 และ MA164 พบว่าให้ผลที่สอดคล้องกับการวิเคราะห์ด้วย LSU rDNA ที่ใช้วิธีการวิเคราะห์เดียวกัน โดยชุดข้อมูลประกอบด้วยรา MA122, MA130, MA150, MA158 และ MA164 และ ราชนิดอื่นใน order Pleosporales หลาย family โดยใช้ *Cochliobolus lunatus* (FJ792584) และ *Cochliobolus* sp. (FJ235087) เป็น outgroup มี total character 735 characters, parsimony informative 294 characters, parsimony uninformative 104 characters และได้ MPT 6 trees โดยมีค่า tree length, CI และ RI เท่ากับ 1336, 0.5075 และ 0.7488 ตามลำดับ รูปที่ 22

ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน ITS rDNA ของเชื้อราเอนโดไฟท์ทั้ง 5 taxa พบว่า มีตำแหน่งอยู่ใน 3 subclade ดังรูปที่ 22 โดย MA 164 มีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับเชื้อราใน family Pleosporaceae คือ *Leptosphaerulina chartarum* (EU272493) (subclade A) โดยมีค่าความเชื่อมั่น bootstrap 64 และ 100% จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี MP และ NJ ตามลำดับ และ MA164 มี % sequence similarity กับ *Leptosphaerulina chartarum* (EU272493) 96.1% สำหรับเชื้อรา MA 130 มีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับ *Lophiostoma* sp.

(AY787716) โดยมีค่าความเชื่อมั่น bootstrap 100 และ 100% ตามลำดับ และมี % sequence similarity เท่ากับ 89.7% ที่ถือว่าน้อย ในขณะที่ MA150 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Massarina corticola* (AF383957) ด้วยค่าความเชื่อมั่น bootstrap สูง 100 และ 100% มี % sequence similarity 100.0 % และเชื้อรา MA 122 และ MA158 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมาก โดยมีค่าความเชื่อมั่น 100 และ 100% จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี MP และ NJ ตามลำดับ มี % sequence similarity 99.8 % แม้ว่าจะไม่มีความสัมพันธ์กับเชื้อใดๆ ใน clade นี้

ดังนั้นจากผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วน LSU และ ITS rDNA ควรจัดจำแนกรวม MA150, และ MA164 เป็น *Massarina corticola* และ *Leptosphaerulina chartarum* ตามลำดับ ในขณะที่ MA130, MA122 และ MA158 ไม่สามารถจัดจำแนกอยู่ใน genus ใดๆ ได้



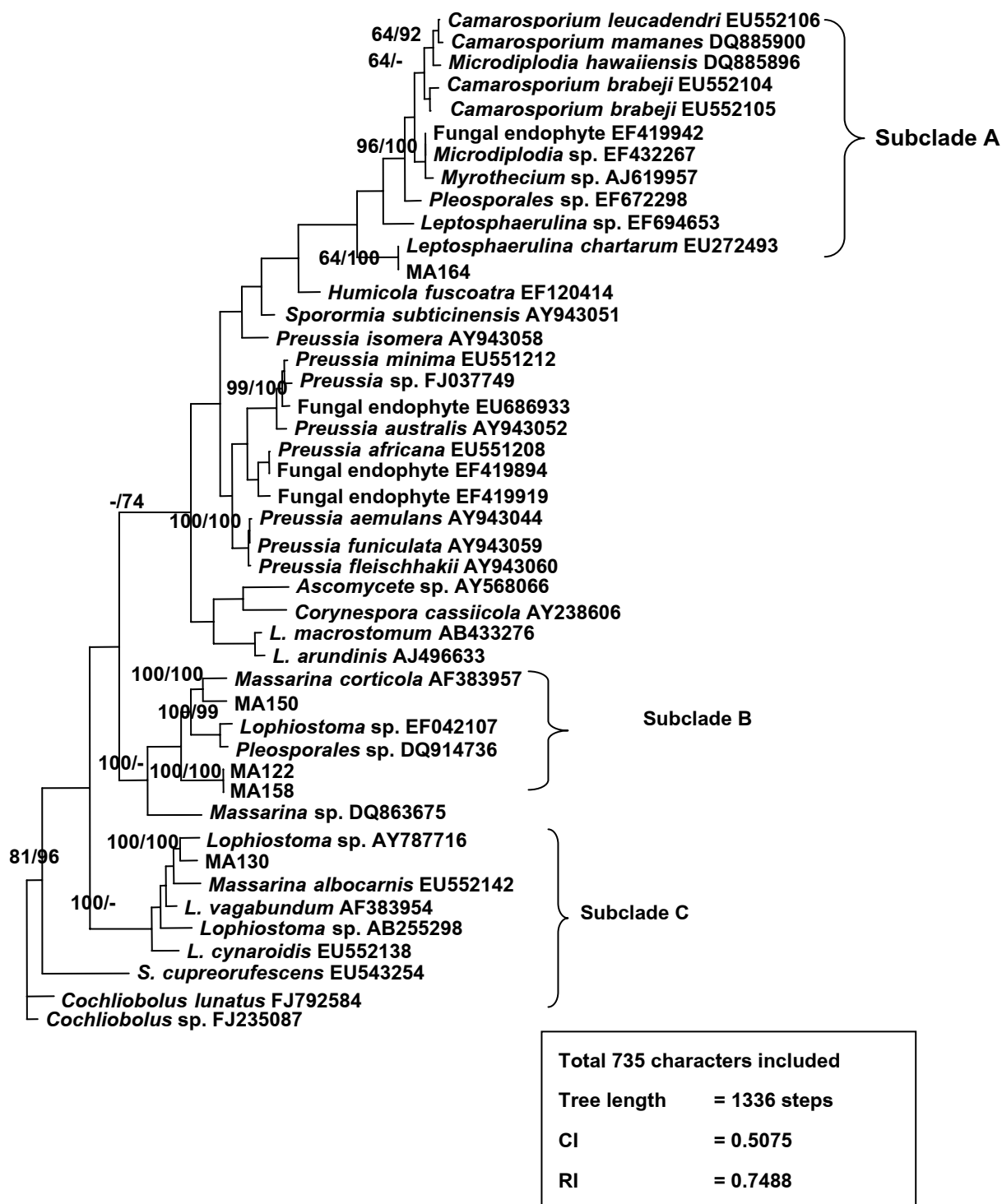
Total 1302 characters included

Tree length = 517 steps

CI = 0.5470

RI = 0.7530

รูปที่ 21 MPTที่เหมาะสมที่สุดจากการวิเคราะห์ส่วน LSU rDNA sequence โดยหลักการ MP ของราเอนโดไฟท์ order Pleosporales (MA150, MA158 และ MA164) ที่มีค่าความเชื่อมั่น bootstrap จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี MP (ซ้าย) และ วิธี NJ (ขวา) มากกว่า 50%



รูปที่ 22 MPT ที่เหมาะสมที่สุดจากการวิเคราะห์ส่วน ITS rDNA sequence โดยหลักการ MP ของราเอนโดไฟท์ order Pleosporales (MA122, MA130, MA150, MA158 และ MA164) ที่มีค่าความเชื่อมั่น bootstrap จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี MP (ซ้าย) และ วิธี NJ (ขวา) มากกว่า 50%

Order Botryosphaerales

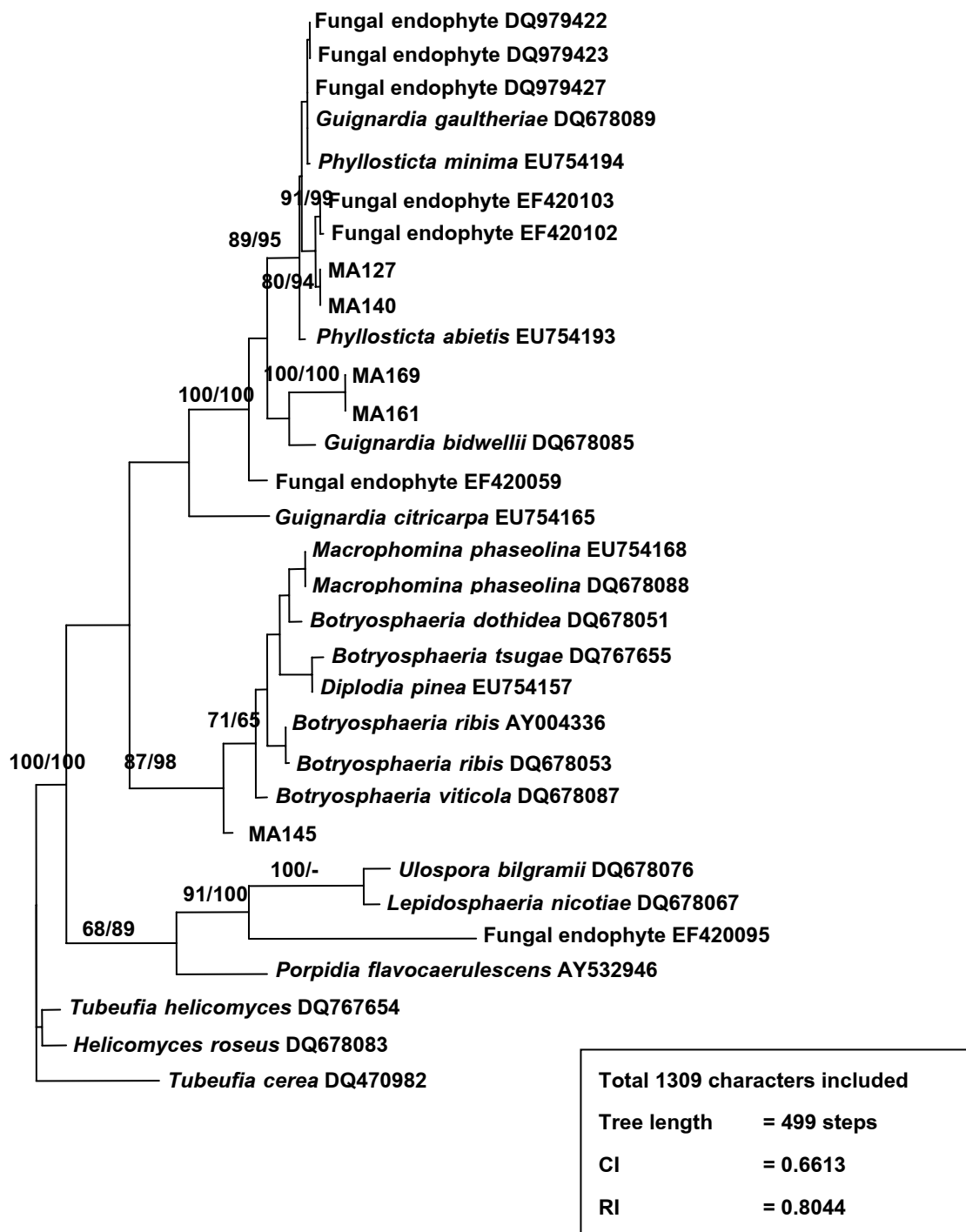
ราเอนโดไฟท์ 5 taxa ซึ่งประกอบด้วย MA127, MA140, MA145, MA161 และ MA169 เมื่อนำมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน LSU rDNA พบว่าจัดอยู่ใน order Botryosphaerales ซึ่งในชุดข้อมูลประกอบด้วยราชชนิดอื่นๆ ใน order นี้ และ fungal endophyte รวมทั้งสิ้น 31 taxa จากฐานข้อมูล GenBank โดยกำหนดให้ *Tubeufia cerea* (DQ470982) เป็น outgroup มี total character 1309 characters, parsimony informative 158 characters และ parsimony uninformative 108 characters เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี MP ทำให้ได้ MPT 72 trees โดยมีค่า tree length, CI และ RI เท่ากับ 499 steps, 0.6613 และ 0.8044 ตามลำดับ ดังแสดง tree ที่เหมาะสม ในรูปที่ 23 ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย K-H test หลังจากวิเคราะห์ด้วยวิธี MP และ วิธี NJ พบว่าทั้ง 2 วิธีมี topology ที่ใกล้เคียงกัน จึงแสดงผลเฉพาะ tree จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี MP จากการวิเคราะห์พบว่า ราเอนโดไฟท์ทั้ง 5 taxa สามารถจัดอยู่ใน order Botryosphaerales โดยพบว่าเชื้อรา MA127 และ MA140 มีความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกันมาก แต่มีค่าความเชื่อมั่น bootstrap ไม่สูงมาก คือ 80 และ 94% ตามลำดับ โดยเชื้อราทั้ง 2 isolates มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับเชื้อ fungal endophytes (EF420102 และ EF420103) และมีค่าความเชื่อมั่น bootstrap คือ 89 และ 95% เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี MP และ วิธี NJ ตามลำดับ สำหรับเชื้อ MA161 และ MA169 มีความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกันโดยมีค่าความเชื่อมั่น 100 และ 100% ซึ่งมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Guignardia bidwellii* DQ678085 ในขณะที่เชื้อ MA145 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อราใน family Botryosphaeriaceae แต่ไม่แสดงความสัมพันธ์กับ specie ใดๆ

ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน ITS rDNA ของเชื้อราเอนโดไฟท์ 3 taxa ได้แก่ MA127, MA140 และ MA145 ซึ่งรา MA161 และ MA169 ไม่สามารถเพิ่มปริมาณส่วน ITS rDNA ได้ โดยชุดข้อมูลที่ทำการศึกษาประกอบด้วย เชื้อราที่เป็นสมาชิกใน order Botryosphaerales และ fungal endophyte รวมทั้งหมด 36 taxa กำหนดให้ *Corynespora cassiicola* (FJ184988, FJ594961 และ EU935735) เป็น outgroup มี total character 688 characters, parsimony informative 372 characters, parsimony uninformative 31 characters และได้ MPT 76 trees โดยมีค่า tree length, CI และ RI เท่ากับ 1151, 0.6612 และ 0.8902 ตามลำดับ (รูปที่ 24)

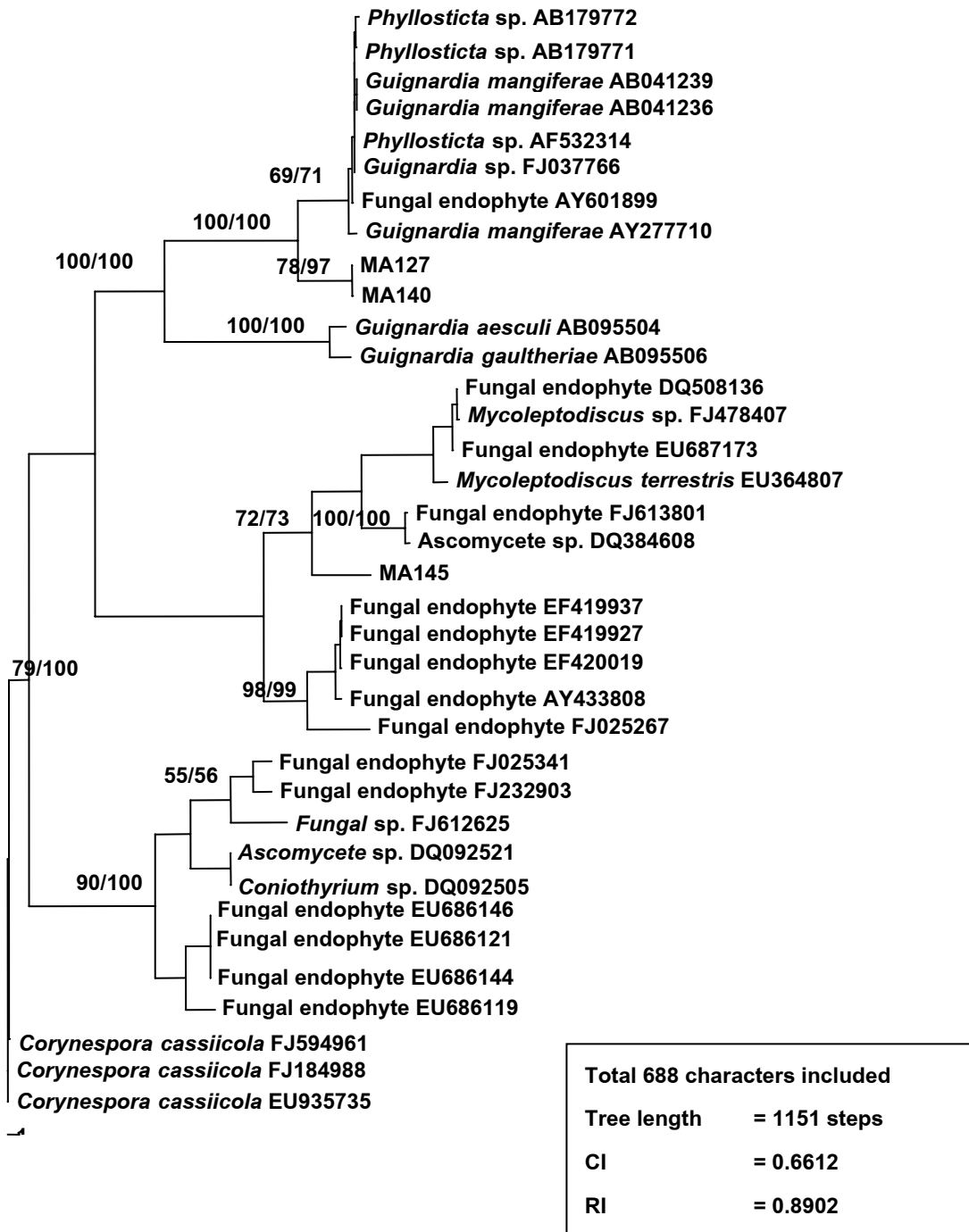
ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน ITS rDNA ของเชื้อรา 3 taxa ได้แก่ MA127, MA140 และ MA145 พบว่าให้ผลที่สอดคล้องกับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน LSU rDNA โดย MA127 และ MA140 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากโดยมี % sequence identity เท่ากับ 99.5% และมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับสมาชิกใน family Botryosphaeriaceae ได้แก่

Guignardia mangiferae AY277710 ด้วยค่าความเชื่อมั่น bootstrap ที่สูง คือ 100 และ 100 % จากการวิเคราะห์ทั้งสองวิธี ในขณะที่ MA145 ไม่มีความสัมพันธ์กับเชื้อรา species ใดๆ ใน family นี้

ดังนั้นจากผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ของ LSU rDNA ควรจัดจำแนก MA169 และ MA161 เป็น *Guignardia* sp. ในขณะที่ ผลของ LSU และ ITS rDNA ควรจัดจำแนก MA127 และ MA140 เป็น *Guignardia* sp. และ MA145 เป็นสมาชิกใน family Botryosphaeriaceae



รูปที่ 23 MPTที่เหมาะสมที่สุดจากการวิเคราะห์ส่วน LSU rDNA sequence โดยหลักการ MP ของราเอนโดไฟท์ order Bostryosphaeriales (MA127, MA140, MA145, MA161 และ MA169) ที่มีค่าความเชื่อมั่น bootstrap จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี MP (ซ้าย) และ วิธี NJ (ขวา) มากกว่า 50%



รูปที่ 24 MPT ที่เหมาะสมที่สุดจากการวิเคราะห์ส่วน ITS rDNA sequence โดยหลักการ MP ของราเอนโดไฟท์ order Botryosphaerales (MA127, MA140 และ MA145) ที่มีค่าความเชื่อมั่น bootstrap จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี MP (ซ้าย) และ วิธี NJ (ขวา) มากกว่า 50%

Order Diaporthales

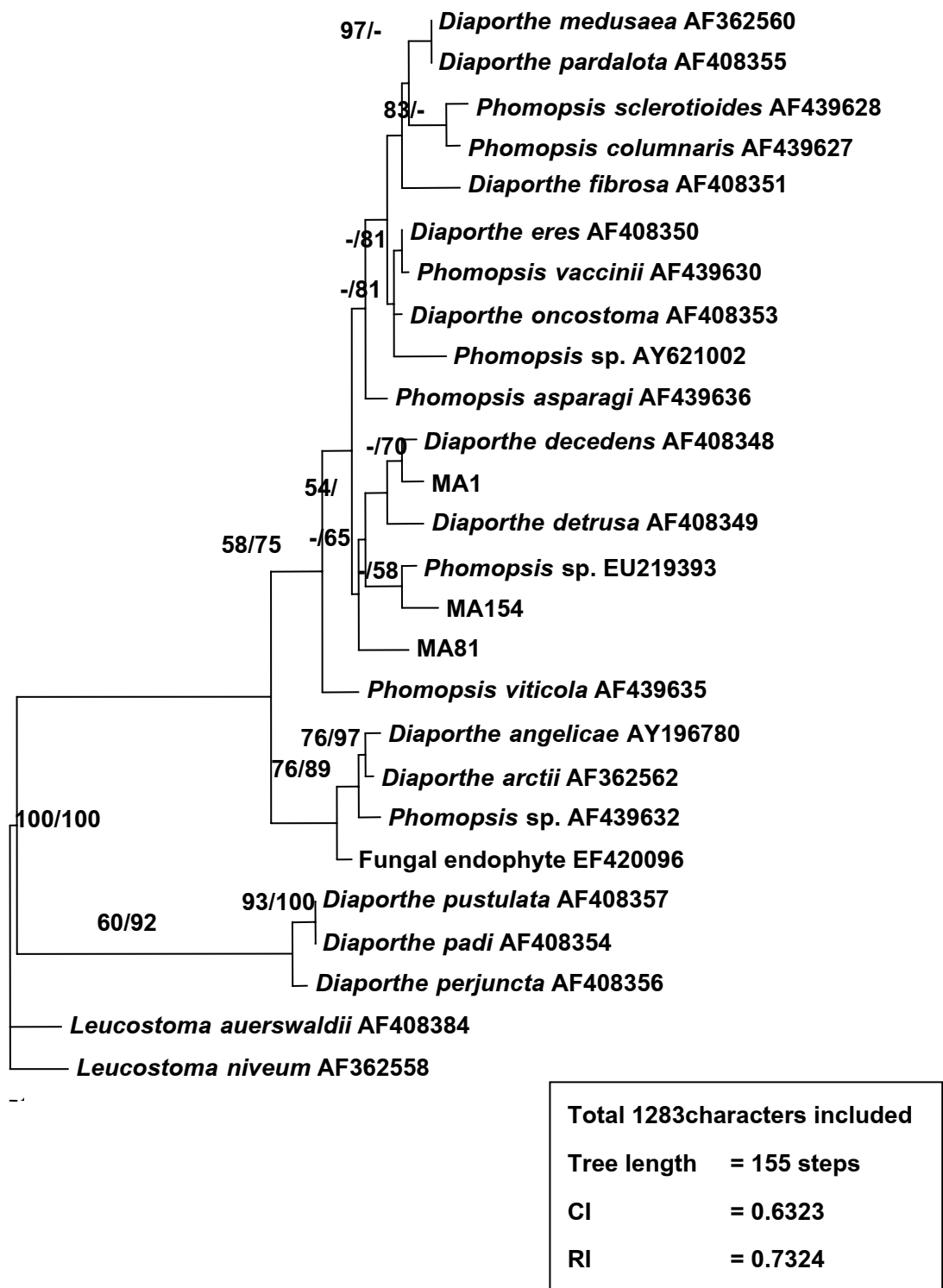
ราเอนโดไฟท์ 3 taxa ซึ่งประกอบด้วย MA1, MA81 และ MA154 เมื่อนำมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน LSU rDNA พบว่าจัดอยู่ใน order Diaporthales ซึ่งในชุดข้อมูลประกอบด้วยราชชนิดอื่นๆ ใน order นี้ และ Fungal endophyte รวมทั้งสิ้น 26 taxa จากฐานข้อมูล GenBank โดยกำหนดให้ *Leucostoma auerswaldii* (AF408384) และ *Leucostoma niveum* (AF362558) เป็น outgroup มี total character 1283 characters, parsimony informative 64 characters และ parsimony uninformative 29 characters เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี MP ทำให้ได้ MPT 34 trees โดยมีค่า tree length, CI และ RI เท่ากับ 155 steps, 0.6323 และ 0.7324 ตามลำดับ ดังแสดง tree ที่เหมาะสม ในรูปที่ 25 ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย K-H test หลังจากวิเคราะห์ด้วยวิธี MP และ วิธี NJ พบว่าทั้ง 2 วิธีมี topology ที่ใกล้เคียงกัน จึงแสดงผลเฉพาะ tree จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี MP

จากการวิเคราะห์พบว่าราเอนโดไฟท์ทั้ง 3 taxa อยู่ใน clade เดียวกัน โดยพบว่า MA1 มีความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกับ *Diaporthe decedens* (AF408348) โดยมีความเชื่อมั่น bootstrap ที่ต่ำคือ <50% และ 70% เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี MP และ วิธี NJ ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่า MA154 มีความสัมพันธ์กับ *Phomopsis* sp. EU219393 แต่มีค่าความเชื่อมั่นที่ต่ำ คือ <50% และ 58% ตามลำดับ ในขณะที่ MA81 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับเชื้อใน order นี้แต่ไม่แสดงความสัมพันธ์กับ species ใดๆ

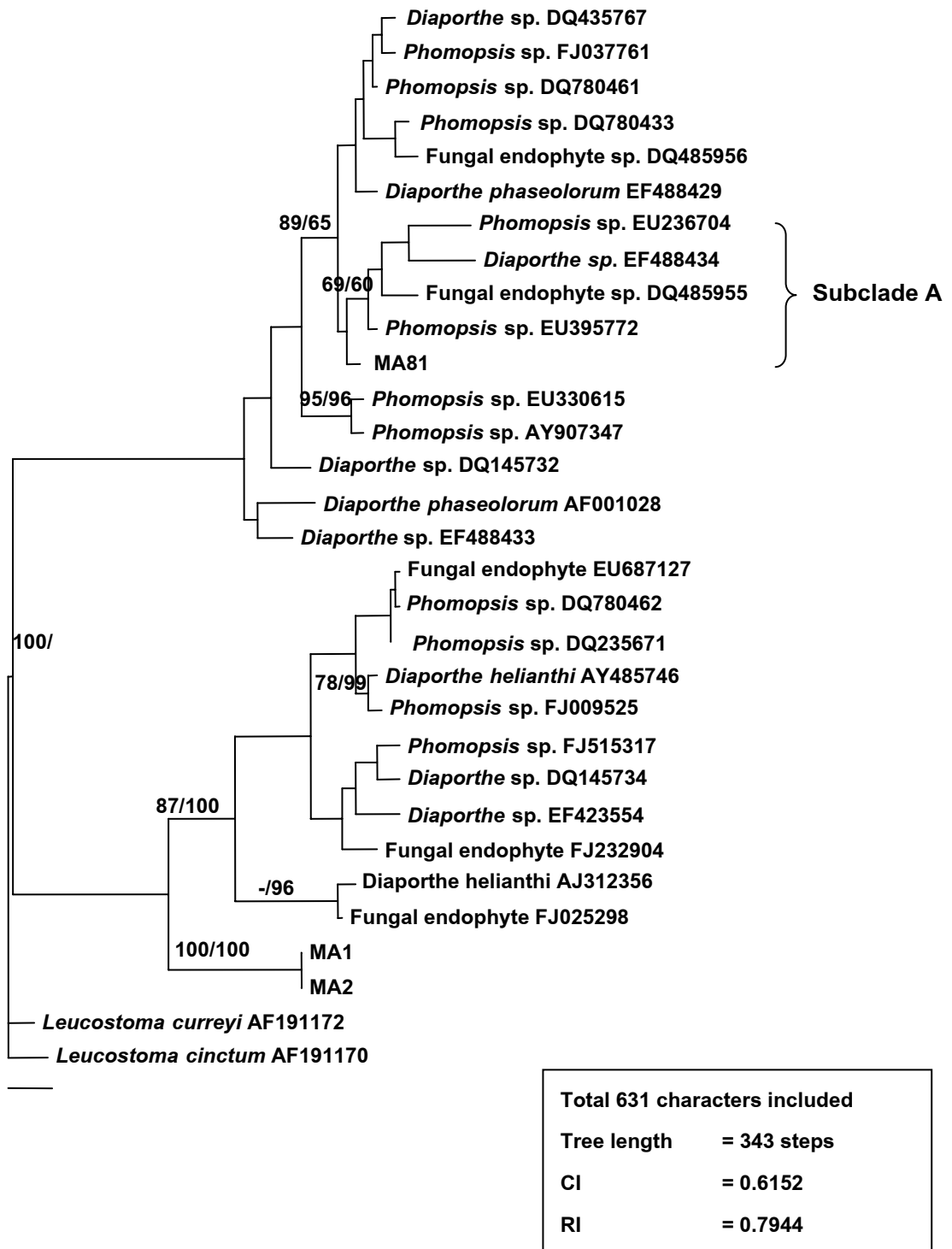
ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน ITS rDNA ของเชื้อราเอนโดไฟท์ 3 taxa ได้แก่ MA1, MA2 (ไม่มีข้อมูล LSU) และ MA81 โดยชุดข้อมูลที่ทำการศึกษาประกอบด้วย เชื้อราที่เป็นสมาชิกใน order Diaporthales และ fungal endophyte รวมทั้งหมด 31 taxa กำหนดให้ *Leucostoma curreyi* (AF191172) และ *Leucostoma cinctum* (AF191170) เป็น outgroup มี total character 631 characters, parsimony informative 118 characters, parsimony uninformative 38 characters และได้ MPT 3 trees โดยมีค่า tree length, CI และ RI เท่ากับ 343, 0.6152 และ 0.7944 ตามลำดับ (รูปที่ 26)

ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน ITS rDNA ของเชื้อรา 3 taxa พบว่าให้ผลที่สอดคล้องกับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน LSU rDNA โดยพบว่า MA1 และ MA2 มีความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกันมากโดยมีค่าความเชื่อมั่น bootstrap ที่สูงคือ 100 และ 100% มี % sequence similarity 100% และมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับสมาชิกใน family Diaporthaceae ด้วยค่าความเชื่อมั่น bootstrap 87 และ 100% ในขณะที่ MA81 พบอยู่ใน subclade A ซึ่งมีความสัมพันธ์กับราใน family Diaporthaceae แต่ไม่มีความสัมพันธ์กับเชื้อรา species ใดๆ นอกเหนือจาก *Phomopsis* และ *Diaporthe*

ดังนั้นจากผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ของ LSU และ ITS rDNA ควรจัดจำแนก MA1, MA2 เป็น *Diaporthe* sp., MA154 เป็น *Phomopsis* sp., สำหรับ MA81 เป็นสมาชิกใน family Diaporthaceae



รูปที่ 25 MPT ที่เหมาะสมที่สุดจากการวิเคราะห์ส่วน LSU rDNA sequence โดยหลักการ MP ของราเอนโดไฟท์ order Diaporthales (MA1, MA81 และ MA154) ที่มีค่าความเชื่อมั่น bootstrap จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี MP (ซ้าย) และ วิธี NJ (ขวา) มากกว่า 50%



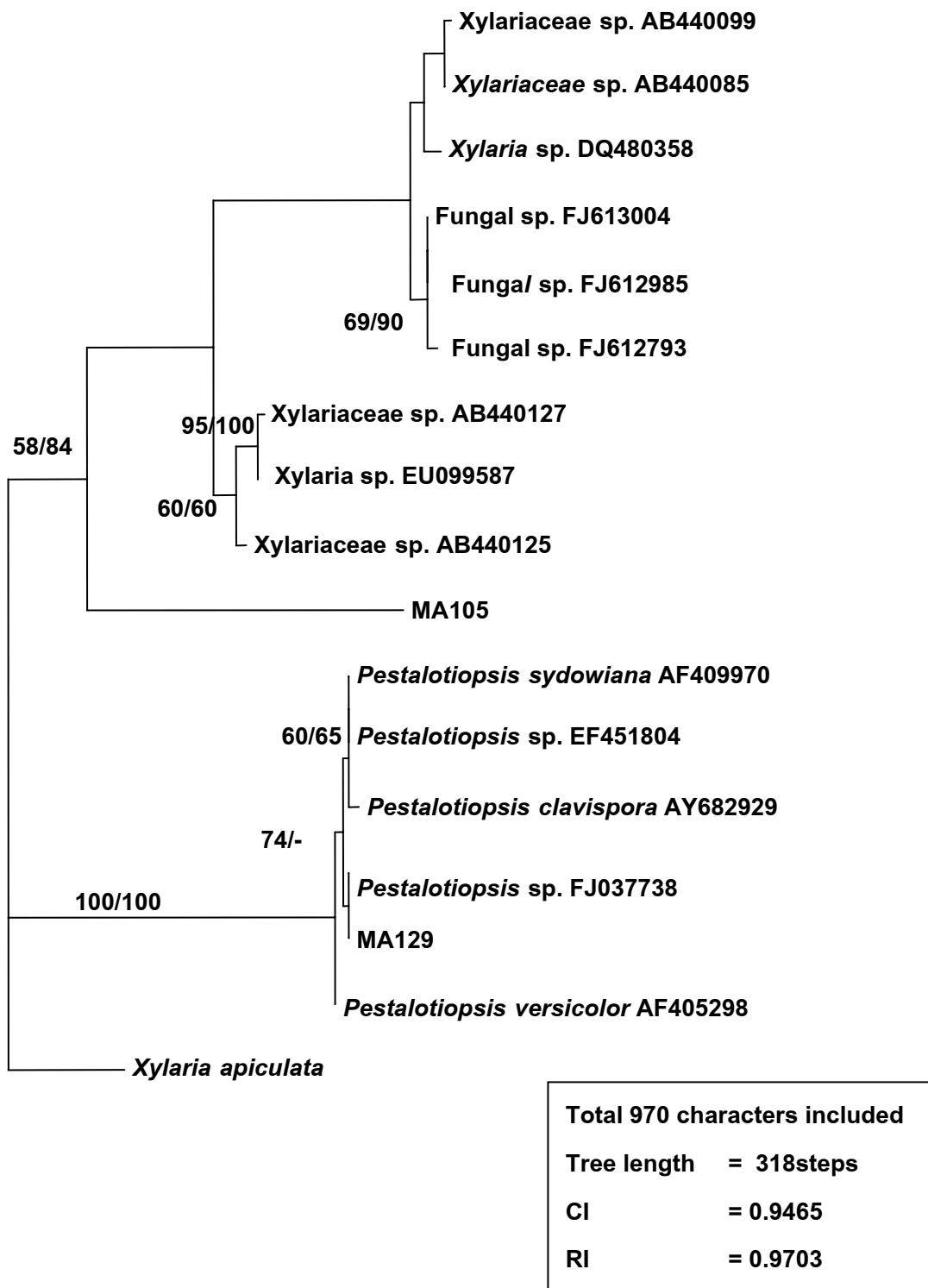
รูปที่ 26 MPT ที่เหมาะสมที่สุดจากการวิเคราะห์ส่วน ITS rDNA sequence โดยหลักการ MP ของราเอนโดไฟท์ order Diaporthales (MA1, MA2 และ MA81) ที่มีค่าความเชื่อมั่น bootstrap จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี MP (ซ้าย) และ วิธี NJ (ขวา) มากกว่า 50%

Order Xylariales

ในการวิเคราะห์ราเอนโดไฟท์ 2 taxa ได้แก่ MA105 และ MA129 พบว่าอยู่ใน order Xylariales ซึ่งในการวิเคราะห์ใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน ITS rDNA เนื่องจากไม่มีข้อมูลในส่วนของ LSU ในการวิเคราะห์ ชุดข้อมูลที่นำมาศึกษาประกอบด้วยราใน family Xylariaceae และ Amphisphaeriaceae สมาชิกใน order Xylariales รวมทั้งหมด 17 taxa กำหนดให้ *Xylaria apicularta* เป็น outgroup มี total character 970 characters, parsimony informative 127 characters, parsimony uninformative 142 characters และได้ MPT 271 trees โดยมีค่า tree length, CI และ RI เท่ากับ 318, 0.9465 และ 0.9703 ตามลำดับ (รูปที่ 27)

ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน ITS rDNA ของเชื้อรา 2 taxa พบว่า MA129 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Pestalotiopsis* sp. FJ037738 มี % sequence identity 99.8% ในขณะที่ MA105 มีความสัมพันธ์กับราใน order Xylariales แต่ไม่มีความใกล้ชิดกับเชื้อใดๆ ใน order นี้ อีกทั้ง MA105 มี branch length ที่ยาวมากเนื่องจากมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างไปจากราชนิดอื่นๆ ที่นำมาเทียบเคียง

ดังนั้นจากผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ITS rDNA ควรจัดจำแนก MA105 เป็นสมาชิกใน family Xylariaceae และ MA129 เป็น *Pestalotiopsis* sp.



รูปที่ 27 MPT ที่เหมาะสมที่สุดจากการวิเคราะห์ส่วน ITS rDNA sequence โดยหลักการ MP ของราเอนโดไฟท์ order Xylariales (MA105 และ MA129) ที่มีค่าความเชื่อมั่น bootstrap จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี MP (ซ้าย) และ วิธี NJ (ขวา) มากกว่า 50%

สรุปการจัดจำแนกราเณโดไฟท์โดยวิธีทางชีวโมเลกุล

จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรมโดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ LSU และ ITS rDNA สามารถสรุปและจัดจำแนกราเณโดไฟท์ทั้ง 19 isolates ที่มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ lipase และ cellulase ดังตารางที่ 18 โดยสามารถจัดจำแนกในระดับ genus ได้ 13 isolates (68.4%) ได้แก่ *Cladosporium* sp. MA111 และ PMA1, *Diaporthe* sp. MA1 และ MA2, *Guignardia* sp. MA127, MA140, MA161 และ MA169, *Leptosphaerulina chartarum* MA164, *Massarina corticolar* MA150, *Phomopsis* sp. MA154, *Pestalotiopsis* sp. MA129, *Schizophyllum commune* MA56, ส่วนที่เหลือจัดจำแนกได้ในระดับ family หรือ order เท่านั้น

ตารางที่ 18 สรุปผลการจัดจำแนกราเอนโดไฟท์ โดยใช้ข้อมูลลำดับเบส ribosomal DNA

Phylum	Class	Order	Gene	Accession no.	Expected species	% ITS sequence Identity with the closest taxa	รหัสราเอนโดไฟท์
Basidiomycota	Agaricomycetes	Agaricales	ITS	GQ254677	<i>Schizophyllum commune</i>	99.2%	MA56
			LSU	GQ254661			
Ascomycota	Sordariomycetes	Diaporthales	ITS	GQ254675	<i>Diaporthe</i> sp.	-	MA1
			LSU	GQ254660			
			ITS	GQ254676	<i>Diaporthe</i> sp.	-	MA2
			ITS	GQ254678	Diaporthaceae sp.	-	MA81
			LSU	GQ254662			
			ITS	GQ254686	<i>Phomopsis</i> sp.	-	MA154
		LSU	GQ254667				
		Xylariales	ITS	GQ254679	Xylariaceae sp.	-	MA105
			ITS	GQ254681	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	99.8%	MA129*
		Dothideomycetes	Capnodiales	ITS	GQ254680	<i>Cladosporium</i> sp.	99.5%
	LSU			GQ254663			
	LSU			GQ254668	<i>Cladosporium</i> sp.	-	PMA1*
	Pleosporales		ITS	GQ254682	Pleosporales sp.	-	MA122
			ITS	GQ254683	Pleosporales sp.	89.7%	MA130
LSU			GQ254664				
ITS			GQ254684	<i>Massarina corticola</i>	100%	MA150	
LSU			GQ254665				
ITS	GQ254685	Pleosporales sp.	-	MA158			
LSU	GQ254666						

* สร้างโครงสร้างสีบนพื้นอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 18 (ต่อ) สรุปผลการจัดจำแนกราเนาโดไฟท์ โดยใช้ข้อมูลลำดับเบส ribosomal DNA

Phylum	Class	Order	Gene	Accession no.	Expected species	% ITS sequence Identity with the closest taxa	รหัสราเนาโดไฟท์
	Dothideomycetes	Pleosporales	ITS	GQ254687	<i>Leptosphaerulina chartarum</i>	91.1%	MA164
			LSU	GQ254669			
	Dothideomycetes incertae sedis	Botryosphaeriales	ITS	GQ254688	<i>Guignardia</i> sp.	-	MA127
			LSU	GQ254670			
			ITS	GQ254689	<i>Guignardia</i> sp.	-	MA140
			LSU	GQ254671			
			ITS	GQ254690	Botryosphaeriaceae sp.	-	MA145
			LSU	GQ254672			
	LSU	GQ254673	<i>Guignardia</i> sp.	-	MA161		
	LSU	GQ254674	<i>Guignardia</i> sp.	-	MA169		

* สร้างโครงสร้างสีบนฐานอาหารเลี้ยงเชื้อ

บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การแยกราเอ็นโดไฟท์จากพืชป่าชายเลน

การแยกราเอ็นโดไฟท์จากพืชป่าชายเลน ทั้งหมด 7 ชนิด ได้แก่ โกงกางใบเล็ก (*R. apiculata*) ตะบูนขาว (*X. granatum*) ถั่วขาว (*B. cylindrica*) ฝาดดอกแดง (*L. littorea*) เล็บมีอนาง (*A. corniculatum*), ลำพู (*S. caseolaris*) และ แสมขาว (*A. alba*) แยกราเอ็นโดไฟท์ ได้ทั้งหมด 76 isolates มีอัตราการแยกราเอ็นโดไฟท์เฉลี่ย 0.42 isolates/ชิ้นตัวอย่างพืช ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับการศึกษาของ จิรายุ (ติดต่อบริเวณตัว) ที่แยกราเอ็นโดไฟท์จากพืชป่าชายเลน 18 ชนิด รวม 63 ต้น ได้อัตราการแยกราเอ็นโดไฟท์เฉลี่ย 0.49 isolates/ชิ้นตัวอย่างพืช และพบอัตราการแยกราเอ็นโดไฟท์จากต้นฝาดดอกแดงสูงที่สุด เท่ากับ 1.0 isolate/ชิ้นตัวอย่างพืช ใกล้เคียงกับการศึกษาของจิรายุ ที่แยกได้ 0.85 isolate/ชิ้นตัวอย่างพืช จากพืชชนิดนี้เช่นกัน อย่างไรก็ตาม จิรายุ สามารถแยกราเอ็นโดไฟท์ได้จากถั่วขาวมากที่สุด 1.05 isolates/ชิ้นตัวอย่างพืช ในขณะที่การศึกษานี้พบอัตราการแยกราเอ็นโดไฟท์จากต้นถั่วขาวต่ำที่สุด เพียง 0.1 isolate/ชิ้นตัวอย่างพืช อาจเป็นไปได้ว่าพืชแต่ละแหล่งมีราเอ็นโดไฟท์ที่อาศัยอยู่จำนวนแตกต่างกัน นอกจากนี้ยังมีรายงานพบว่าอายุของพืชมีผลต่อจำนวนราเอ็นโดไฟท์ด้วย ดังเช่นการศึกษาของ Pang และคณะ (2008) ที่รายงานว่าสามารถแยกราเอ็นโดไฟท์จาก *Kandelia candel* ซึ่งเป็นพืชป่าชายเลนในวงศ์ Rhizophoraceae จากพืชต้นแก่ (53.5%) ได้มากกว่าพืชต้นอ่อน (12.5%)

ราเอ็นโดไฟท์จะพบได้ในพืชทุกชนิด และทุกส่วนของพืช (Arnold et al., 2000) การศึกษานี้พบว่าแยกราเอ็นโดไฟท์ได้จากส่วนของกิ่งมากที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ ณัฐวุฒิ (2549) เนื่องจากส่วนของกิ่ง เป็นที่รวมของ xylem และ phloem ซึ่งเป็นทางลำเลียงของน้ำและอาหาร ซึ่งเป็นแหล่งที่อุดมสมบูรณ์ที่สุดในพืชจึงทำให้บริเวณนี้พบราเอ็นโดไฟท์จำนวนมากที่สุด

4.2 การคัดเลือกราเอนโดไฟท์ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ lipase, cellulase, amylase และ protease เมื่อทดสอบเบื้องต้นโดยวิธี plate method

ในการทดสอบเบื้องต้นของราเอนโดไฟท์ในการสร้าง lipase, cellulase, amylase และ protease ด้วยวิธี plate method โดยใช้อาหารที่ประกอบด้วย tributyrin, CMC, soluble starch และ sodium caseinate ซึ่งเป็นสับสเตรทที่จำเพาะกับ lipase, cellulase, amylase และ protease ตามลำดับ และประเมินผลจากค่า EPR (extracellular enzyme production ratios) โดยสุ่มเลือกราเอนโดไฟท์ 300 isolates ที่แยกได้จากพืชป่าชายเลน 14 ชนิด ซึ่งเมื่อทดสอบไปได้ประมาณ 150 isolates พบว่าราเอนโดไฟท์สามารถสร้างเอนไซม์ lipase และ cellulase แต่พบการสร้างเอนไซม์ amylase และ protease น้อยมาก จึงทดสอบการสร้างเอนไซม์ 2 ชนิด หลังเพียง 180 isolates และทดสอบการสร้างเอนไซม์ lipase และ cellulase ทั้ง 300 isolates ผลการทดสอบพบว่าราเอนโดไฟท์ 31.7 และ 24.0% สร้างเอนไซม์ lipase และ cellulase ได้ตามลำดับ และมีเพียง 1.1% เท่านั้น ที่สร้างเอนไซม์ amylase และไม่พบราเอนโดไฟท์ที่สร้าง protease ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Maria และคณะ (2005) ที่ได้ศึกษาการสร้างเอนไซม์จากราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากพืชป่าชายเลน 2 ชนิด ได้แก่ *Acanthus ilicifolius* และ *Acrostichum aureum* ที่ประเทศอินเดีย พบว่า ราเอนโดไฟท์ทุกตัวที่นำมาทดสอบสามารถสร้างเอนไซม์ lipase และ cellulase ได้ แต่พบการสร้างเอนไซม์ amylase และ protease น้อยมาก อย่างไรก็ตามในงานวิจัยของ Maria และคณะ (2005) ศึกษาราเอนโดไฟท์เพียง 7 isolates เท่านั้น ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้ได้ศึกษากับเชื้อราจำนวนมากที่แยกได้จากพืชป่าชายเลนหลากหลายชนิด จึงเป็นการยืนยันได้ว่า ราเอนโดไฟท์จากพืชป่าชายเลนส่วนใหญ่สร้างเอนไซม์ lipase และ cellulase แต่สร้าง amylase และ protease ได้น้อยมาก นอกจากนี้ยังมีรายงานการวิจัยของ Lumyong และคณะ (2002) ที่ศึกษาการสร้าง cellulase, mannanase, protease และ xylanase โดยราเอนโดไฟท์ที่แยกจากพืชพื้นเมืองจากอุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ-ปุย จังหวัดเชียงใหม่ พบว่าราเอนโดไฟท์สามารถสร้างเอนไซม์ต่างๆ เหล่านี้ได้แต่มีเชื้อราจำนวนน้อยที่สามารถสร้าง protease ได้ Lindstrom และคณะ (1993) พบราเอนโดไฟท์ *Acremonium typhinum* ที่แยกได้จากหญ้า (*Poa ampla*) ผลิต protease และจากการศึกษาต่อมาพบว่า เป็น protease ที่คล้าย subtilisin ในยูคาริโอต ซึ่งคล้ายกับ protease ที่พบในราที่ก่อโรคกับแมลงและไส้เดือนฝอย หรือราอื่นๆ อย่างไรก็ตาม protease ที่คล้าย subtilisin นี้ไม่ได้จำกัดอยู่เฉพาะในราที่ทำให้เกิดโรค แต่อาจเป็นลักษณะทั่วไปของราในกลุ่ม Ascomycetes และ Deuteromycetes (Reddy *et al.*, 1996) ซึ่งการศึกษารุ่นนี้พบว่าราเอนโดไฟท์จากพืชป่าชายเลนสามารถสร้างเอนไซม์ lipase, cellulase และ amylase ได้ แสดงว่าราสร้างเอนไซม์

เพื่อย่อยสลายสับสเตรทต่างๆ ของพืชที่จำเพาะต่อเอนไซม์ต่างๆ เหล่านี้ โดยเฉพาะเซลลูโลส เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ของพืช

สำหรับในการศึกษาเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายสับสเตรทจำพวกไขมันสามารถแบ่งออกเป็น esterase และ lipase ซึ่ง esterase จำเพาะกับสับสเตรทที่มีจำนวนคาร์บอนอะตอมน้อยกว่าหรือเท่ากับ 10 ซึ่งได้แก่ tributyrin น้ำมันมะพร้าว และไขมันเนย เป็นต้น สำหรับ lipase จะมีความจำเพาะกับสับสเตรทที่มีจำนวนอะตอมของคาร์บอนมากกว่าหรือเท่ากับ 10 ได้แก่ น้ำมันมะกอก และน้ำมันปาล์ม (Fucinos *et al.*, 2005) เป็นต้น ซึ่งในการศึกษาค้างนี้ใช้ tributyrin เป็นสับสเตรทสำหรับการคัดเลือกเชื้อเบื้องต้น ด้วยวิธี plate method เนื่องจาก tributyrin เป็นสับสเตรทที่ดีสำหรับวิธีตรวจสอบที่ต้องการเห็นผลเร็ว และเป็นสารที่กระจายตัวในน้ำได้ง่ายกว่าสับสเตรทตัวอื่นๆ Torres และคณะ (2003) ศึกษาการสร้างเอนไซม์ lipase ของราเอนโดไฟท์ ที่แยกจากพืชแถบเมดิเตอร์เรเนียน โดยทดสอบบนอาหาร tributyrin เช่นเดียวกันพบว่า 80% ของเชื้อที่ทดสอบให้ผลบวก ซึ่งมีค่าสูงกว่าการทดลองนี้มาก ซึ่งการทดลองครั้งนี้พบเพียง 31.7% ดังนั้นในการศึกษาค้างนี้จึงนำราเอนโดไฟท์ที่ให้ผลบวกบนอาหาร tributyrin ไปทดสอบเพื่อศึกษาความสามารถของราเอนโดไฟท์ในการย่อยสลายสับสเตรทโมเลกุลใหญ่ จึงได้ทดสอบบนอาหาร rhodamine B ที่ผสมน้ำมันมะกอก พบว่ามีเพียง 3 isolates เท่านั้นที่ให้ผลบวกเมื่อศึกษาบนอาหารดังกล่าว แสดงว่าราเอนโดไฟท์ที่ศึกษาในค้างนี้สร้าง esterase เป็นส่วนใหญ่ ซึ่งมีความจำเพาะกับสับสเตรทที่มีจำนวนคาร์บอนอะตอมน้อยกว่าหรือเท่ากับ 10 และไม่สามารถสร้างเอนไซม์ที่จำเพาะกับสับสเตรทที่มีโมเลกุลใหญ่ๆ ได้

4.3 การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ด้วยชุดทดสอบ API ZYM test kit

การทดสอบการสร้างเอนไซม์โดยวิธี plate method เลือกใช้สับสเตรทเพียง 4 ชนิดเท่านั้น ทำให้ทราบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ 4 ชนิดได้แก่ lipase, cellulase, amylase และ protease สำหรับการทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ด้วยชุดทดสอบ API ZYM test kit สามารถทดสอบการสร้างเอนไซม์ได้จำนวน 19 ชนิด ทำให้ทราบว่าราเอนโดไฟท์ที่ต้องการศึกษาสามารถสร้างเอนไซม์อื่นๆ ได้อีกหลายชนิด โดยการทดสอบด้วยชุดทดสอบมีหลักการที่คล้ายคลึงกับการทดสอบด้วยวิธี plate method กล่าวคือ ในแต่ละหลุมของชุดทดสอบจะถูกเคลือบด้วยสับสเตรทที่จำเพาะกับเอนไซม์แต่ละชนิดที่ทดสอบ เมื่อทดสอบด้วยเอนไซม์ที่จำเพาะกับสับสเตรทแต่ละชนิด สับสเตรทจะถูกย่อยทำให้เห็นเป็นสีแล้วนำมาเปรียบเทียบกับแผ่นเทียบของบริษัทผู้ผลิต ทำให้ทราบว่าราเอนโดไฟท์แต่ละตัวสามารถสร้างเอนไซม์ใดได้บ้าง และวิธีการทดสอบด้วยชุดทดสอบมีความไวสูงกว่าการทดสอบด้วยวิธี plate method เนื่องจากตรวจปริมาณเอนไซม์ได้ในระดับ nanomole ดังนั้นถ้าเชื้อราสร้างเอนไซม์ได้ปริมาณน้อยก็

สามารถตรวจพบได้ด้วยวิธีนี้ นอกจากนี้ยังสามารถยืนยันผลการทดสอบที่ทดสอบด้วยวิธี plate method ได้อีกด้วย ซึ่งจากผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์ cellulase พบว่าการทดสอบด้วย 2 วิธีดังกล่าวให้ผลการทดสอบที่สอดคล้องกัน โดยราเอนโดไฟท์จำนวน 23 isolates ที่ทดสอบแล้วให้ผลบวกบนอาหาร CMC ซึ่งแปลผลว่าสามารถสร้างเอนไซม์ cellulase ได้ เมื่อนำไปทดสอบด้วยชุดทดสอบ API ZYM test kit พบว่ามี 21 isolates ที่ให้ผลบวกกับชุดทดสอบ และราเอนโดไฟท์ 5 isolates ที่ให้ผลลบบนอาหาร CMC ให้ผลบวกกับชุดทดสอบ API ZYM และสามารถระบุได้ว่าเป็น β -glucosidase และราเอนโดไฟท์จำนวน 31 isolates ที่ให้ผลบวกเมื่อทดสอบการสร้างเอนไซม์ lipase ด้วยวิธี plate method ซึ่งเมื่อนำไปทดสอบด้วยชุดทดสอบ พบว่าให้ผลบวก 28 isolates แต่มีราเอนโดไฟท์ 10 isolates ที่ให้ผลลบ กับวิธี plate method แต่เมื่อนำไปทดสอบการสร้างเอนไซม์ด้วยชุดทดสอบแสดงผลเป็นบวก อาจเนื่องมาจากราเอนโดไฟท์เหล่านี้สามารถสร้างเอนไซม์ lipase ได้น้อย ทำให้ไม่สามารถตรวจพบด้วยวิธี plate method แต่เนื่องจากชุดทดสอบมีความไวมากกว่าเนื่องจากวัดได้ในระดับ nanomole จึงสามารถตรวจพบการสร้างเอนไซม์นั้นๆ ได้ และจากผลการทดสอบพบว่ามีราเอนโดไฟท์ 3 isolates ที่ให้ผลบวกเมื่อทดสอบการสร้างเอนไซม์ lipase ด้วยวิธี plate method แต่ให้ผลลบเมื่อทดสอบกับชุดทดสอบ API ZYM test kit เนื่องจากรานี้ อาจไม่สร้างเอนไซม์ในอาหารเหลว ดังผลการทดสอบเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว หรือ อาจเนื่องจากเชื้อราสร้างเอนไซม์ที่อยู่ภายในเซลล์ เช่นที่ Torres และคณะ (2003) รายงานไว้

นอกจากนี้การทดสอบด้วย API ZYM ยังสามารถระบุชนิดของเอนไซม์ lipase ได้เป็น 3 ชนิด คือ esterase (C4), esterase lipase (C8) และ lipase (C14) ซึ่งราเอนโดไฟท์ที่นำมาทดสอบส่วนใหญ่สร้าง esterase (C4) และ esterase lipase (C8) เป็นการยืนยันผลการทดสอบบน tributyrin agar ได้ว่า เอนไซม์ที่ราเอนโดไฟท์สร้างเป็นกลุ่ม esterase และ tributyrin เป็นสับสเตรทที่มีคาร์บอนอะตอมน้อยกว่า 10 และมีราเอนโดไฟท์ 3 isolates (MA56, MA105 และ MA129) ที่สร้างเอนไซม์ lipase (C14) โดยเชื้อ 2 isolates (MA105 และ MA109) ให้ผลบวกบนอาหาร rhodamine B ที่ผสมน้ำมันมะกอก ดังนั้นผลการทดสอบทั้ง 2 วิธีสอดคล้องกัน

เนื่องจาก API ZYM test kit สามารถตรวจหาเอนไซม์ ได้ถึง 19 ชนิด จึงนิยมนำมาใช้จำแนกชนิดจุลินทรีย์กลุ่มต่างๆ เช่น Hesami และคณะ (2008) ศึกษาเชื้อ *Flavobacterium psychrophilum* ที่ก่อโรคกับปลาเทราท์ สามารถจำแนกเชื้อที่มีลักษณะทางชีวเคมี และฟีโนทัยป์เหมือนกันออกได้เป็น 2 biovars ส่วน Leone และคณะ (1998) ใช้ enzymatic profile ที่ทดสอบโดย API ZYM test kit จำแนก *Cryptococcus neoformans* ที่แยกได้จากผู้ป่วยเอดส์ ได้ถึง 15 type การศึกษาในครั้งนี้ จากเชื้อรา 47 isolates พบว่ามี enzymatic profile ที่แตกต่างกันถึง 42 type โดยมีเชื้อรา MA154 และ MA159 มีการสร้างเอนไซม์ 3 ชนิด คือ acid phosphatase, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase และ β -glucosidase เหมือนกัน ในขณะที่

PMA4, PMA43, MA45 และ MA47 สร้างเอนไซม์ 5 ชนิด (alkaline phosphatase, esterase (C4), esterase lipase (C8), lipase (C14), acid phosphatase และ naphthol-AS-BI-phosphohydrolase) ส่วน MA150 และ MA158 มีเอนไซม์ 10 ชนิดที่เหมือนกัน (alkaline phosphatase, esterase (C4), esterase lipase (C8), leucine arylamidase, acid phosphatase, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase, β -galactosidase, α -glucosidase, β -glucosidase และ N-acetyl- β -glucosaminidase) จะเห็นได้ว่าราเอนโดไฟท์จากพืชป่าชายเลนมีการสร้างเอนไซม์ที่แตกต่างกันมาก

โดยสรุปแล้วข้อดีของวิธีการทดสอบด้วย plate method คือ สามารถดูผลได้ง่ายคือถ้าเชื้อราสามารถสร้างเอนไซม์ได้ จะสังเกตเห็น clear zone รอบโคโลนีรา แต่ก็ยังมีข้อเสียคือ มีความไวต่ำ สำหรับชุดทดสอบ API ZYM test kit มีข้อดี คือ มีความไวในการทดสอบสูง ซึ่งทดสอบได้ในหน่วยของ nanomole และสามารถตรวจสอบการสร้างเอนไซม์ได้หลายชนิดในชุดทดสอบเพียงชุดเดียวและสามารถระบุชื่อเอนไซม์ได้ แต่วิธีนี้มีข้อเสีย คือ ราคาแพง และอาจให้ระดับคะแนนของการเกิดสีที่ไม่ถูกต้องได้ เพราะใช้วิธีการเปรียบเทียบกับสายตา

4.4 การทดสอบประสิทธิภาพของราเอนโดไฟท์ในการสร้างเอนไซม์ lipase และ cellulase

จากการทดสอบเบื้องต้นโดยวิธี plate method พบว่าราเอนโดไฟท์ส่วนใหญ่สร้าง lipase และ cellulase ได้ มีเพียง 2 isolates ที่สร้าง amylase และไม่พบราเอนโดไฟท์ที่สร้าง protease ได้ จึงคัดเลือกราที่ให้ผลทดสอบบนอาหารที่ผสม tributyrin และ CMC ดีที่สุดมาชนิดละ 3 isolates เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ในอาหารเหลวสำหรับราเอนโดไฟท์ที่ให้ผลบวกบนอาหาร tributyrin agar นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มี tributyrin ความเข้มข้น 1% (v/v) เป็นสับสเตรท จากการทดสอบพบว่าราเอนโดไฟท์ทั้ง 3 isolates ไม่สร้างเอนไซม์ lipase ที่สภาวะที่ใช้ในการศึกษา โดยตรวจไม่พบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ตลอดระยะเวลา 14 วัน

สำหรับราเอนโดไฟท์ 3 isolates ที่ให้ผลบวกบนอาหาร CMC agar นำมาศึกษาประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ cellulase โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มี CMC ความเข้มข้น 1% (v/v) เป็นสับสเตรท พบว่ามีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ cellulase ต่ำมากทั้ง 3 isolates โดยให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ cellulase ไม่แตกต่างกัน ราเอนโดไฟท์ที่สร้างเอนไซม์ cellulase ได้ดีที่สุดคือ MA145 ซึ่งให้ค่ากิจกรรมสูงที่สุดเท่ากับ 0.25 U/ml และมีการเจริญสูงสุดที่ 1.2 g น้ำหนักแห้ง ส่วนราเอนโดไฟท์อีก 2 isolates มีการเจริญของน้อยมาก (น้ำหนักแห้งสูงสุด 0.76-0.79 g) การที่ราเอนโดไฟท์ที่นำมาศึกษาสร้างเอนไซม์ cellulase ได้ดีเมื่อทดสอบ

ด้วยวิธี plate method แต่เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวพบกิจกรรมของเอนไซม์น้อยมาก อาจเนื่องมาจาก เมื่อเชื้อเจริญอยู่ในอาหารแข็งเอนไซม์จะถูกสร้างและค่อยๆ ปล่อยออกมาภายนอกเซลล์โดยจะแพร่อยู่ในอาหารรอบๆ ตัวเชื้อทำให้เอนไซม์มีความเข้มข้นสูงจึงเห็น clear zone ปรากฏรอบตัวเชื้อกว้างและมีค่า EPR สูง แต่เมื่อนำไปเลี้ยงในอาหารเหลวพบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดน้อยมาก เนื่องจากการเลี้ยงราในอาหารเหลวไม่ใช่ลักษณะตามธรรมชาติของราอาจส่งผลให้ราไม่ผลิตเมทาบอลไลท์ (Hölker *et al.*, 2004) นอกจากนี้การผลิตเมทาบอลไลท์ยังขึ้นอยู่กับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราที่เจริญอยู่ในอาหารเหลว ซึ่งมีความแตกต่างกันไป ขึ้นกับชนิดของเชื้อรา องค์ประกอบของอาหารและสภาวะแวดล้อมที่ราเจริญอยู่ เช่น ปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้ (dissolved oxygen) และคาร์บอนไดออกไซด์ และสภาวะแวดล้อมที่ราเติบโตอยู่ (Papagianni, 2004) สาเหตุอีกประการที่ทำให้ราสร้างเอนไซม์ได้น้อยอาจเนื่องมาจากราไม่ได้อยู่ในสภาวะถูกกระตุ้นให้สร้างเอนไซม์ โดยในขั้นตอนของการเก็บรักษาเชื้อทำการเก็บเชื้อใน glycerol และก่อนการทดสอบจะนำมาเลี้ยงบนอาหาร PDA ซึ่งไม่มีสับสเตรทของเอนไซม์ใดๆ นอกจากนี้ Torres และคณะ (2003) กล่าวว่า tributyrin plate method สามารถตรวจวัดได้ทั้งเอนไซม์ที่สร้างออกมานอกเซลล์ และเอนไซม์ที่ติดอยู่กับผนังเซลล์ของเชื้อรา และใช้วิธีนี้ในการศึกษาการสร้างเอนไซม์ lipase ชนิดที่ติดอยู่ที่ผนังเซลล์ ดังนั้นราเอนโดไฟท์ที่นำมาศึกษาครั้งนี้อาจสร้างเอนไซม์ที่เกาะอยู่ที่ผนังเซลล์ ทำให้ตรวจไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ในส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อมีรายงานการศึกษาพบว่าจุลินทรีย์ที่สร้าง lipase ได้ พบมากในกลุ่มเชื้อรา และแอกติโนมัยซีท์ที่แยกได้จากดิน (Ko *et al.*, 2005) เช่น *Penicillium wortmanii* สร้าง lipase ได้สูงสุด 12.5 U/ml ในอาหารที่มีน้ำมันมะกอก 5% (w/v) ในวันที่ 7 (Costa and Peralta 1999) ส่วน Colen และคณะ (2006) พบว่า *Colletotrichum gloeosporioides* ที่แยกได้จากดิน สร้างเอนไซม์ปริมาณสูงถึง 27,700 U/l เชื้อราที่แยกได้จากเมล็ดพืชที่มีไขมันสูงอย่างเช่น เมล็ดโกโก้ พบเชื้อรา *Rhizopus oryzae* และ *Absidia corymbifera* สามารถสร้างเอนไซม์ lipase ได้ดี (Guehi *et al.*, 2007)

สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ cellulase เมื่อเลี้ยงในอาหารแข็งที่มีฟางข้าวเพียงอย่างเดียว และอาหารที่มีฟางข้าวผสมใบพืชป่าชายเลนในอัตราส่วน 3:2 เป็นสับสเตรท พบว่าราเอนโดไฟท์ MA150 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุดเท่ากับ 1.93 U/ml ในอาหารที่มีฟางข้าวเพียงอย่างเดียว รองลงมาคือ MA130 และ MA145 ตามลำดับ ซึ่งผลที่ได้ไม่สอดคล้องกับวิธี plate method ที่พบว่าเชื้อ MA145 ให้ค่า EPR สูงสุด ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสภาวะที่ใช้ในการทดสอบต่างกันไม่จำเป็นต้องมีผลการทดลองที่สอดคล้องกัน เนื่องจากเชื้อแต่ละตัวชอบสภาวะที่ไม่เหมือนกัน (Theantana *et al.*, 2007)

เมื่อทดสอบประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์โดยการเลี้ยงเชื้อในอาหารแข็งที่มีฟางข้าวและใบพืชป่าชายเลน ในอัตราส่วน 3:2 พบว่าราเอนโดไฟท์ MA150 ให้ค่ากิจกรรมสูงที่สุดเท่ากับ 2.7 U/ml รองลงมาคือ MA130 และ MA145 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างการ

เลี้ยงราในอาหารเหลวและอาหารแข็ง การเลี้ยงในอาหารแข็งจะใกล้เคียงกับการเจริญในธรรมชาติของรา จึงส่งผลให้ราผลิตเมทาบอลิไทต์ได้ดีกว่า เช่น การผลิต lipase จาก *A. niger* NCIM 1027 และการผลิต esterase จาก *A. niger* I-1472 ที่พบว่าราจะผลิตเอนไซม์ในอาหารแข็งได้ดีกว่าในอาหารเหลว (Hölker *et al.*, 2004) และเมื่อเปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ cellulase เมื่อเลี้ยงราในอาหารที่มีฟางข้าวเพียงอย่างเดียว และในอาหารที่มีฟางข้าวผสมใบพืชป่าชายเลน ให้ค่ากิจกรรมสูงที่สุดอาจเนื่องมาจากราเอนโดไฟท์ที่ศึกษาแยกมาจากพืชป่าชายเลน ดังนั้นเมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารที่มีใบพืชป่าชายเลน ทำให้ลักษณะของสับสเตรทใกล้เคียงกับที่เคยอยู่เดิมจึงถูกกระตุ้นให้สร้างเอนไซม์ cellulase ได้ดี

สำหรับการศึกษาเปอร์เซ็นต์ความชื้นของอาหารเลี้ยงเชื้อในแต่ละวันไม่ได้ทำการศึกษาเนื่องจาก จากผลการศึกษาของ ประไพพิศ (2549) ที่ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างเอนไซม์ cellulase โดยราเอนโดไฟท์ *Penicillium* sp. A2 พบว่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นของอาหารเลี้ยงเชื้อในแต่ละวันที่ทำการศึกษาไม่เปลี่ยนแปลง

อย่างไรก็ตามราเอนโดไฟท์ที่คัดเลือกได้ ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ lipase และ cellulase ค่อนข้างต่ำจึงไม่เหมาะที่จะนำไปใช้ประโยชน์

4.5 การจัดจำแนกชนิดของราเอนโดไฟท์ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์

การจัดจำแนกชนิดของราที่นิยมศึกษากันในอดีต คือ วิธีศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นหลัก แต่การจัดจำแนกด้วยวิธีนี้มีข้อจำกัดหลายประการ เช่น รางบางชนิดมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคลายคลึงกัน แต่ไม่ได้มีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกัน อีกทั้งการจัดจำแนกด้วยวิธีนี้ต้องอาศัยความรู้ความชำนาญของผู้ศึกษา ในการพิจารณาลักษณะและโครงสร้างต่างๆ ของเชื้อราที่ทำการศึกษาเพื่อการจัดจำแนกชนิดที่ถูกต้อง และการจัดจำแนกด้วยวิธีนี้ต้องอาศัยระยะเวลานาน เนื่องจากเชื้อราบางชนิดมีการเจริญเติบโตช้า นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อราบางชนิดไม่สร้างโครงสร้างการสืบพันธุ์ใดๆ นอกจากเส้นใย ซึ่งเรียกเชื้อรากลุ่มนี้ว่า Mycelia sterilia ซึ่งพบบ่อยในการศึกษาราเอนโดไฟท์ (Cheng *et al.*, 2008) จึงทำให้การจัดจำแนกราดด้วยวิธีการทางสัณฐานวิทยาไม่ประสบผลสำเร็จเท่าที่ควร (Guo *et al.*, 2003)

สำหรับการศึกษานี้ได้คัดเลือกราเอนโดไฟท์ที่มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ lipase และ cellulase 10 อันดับแรก และ ราเอนโดไฟท์ที่ให้ผลบวกเมื่อทดสอบบนอาหาร rhodamine B รวมทั้งสิ้น 21 isolates มาจัดจำแนกชนิดเบื้องต้นด้วยวิธีการศึกษาทางสัณฐานวิทยา พบว่ามีราเอนโดไฟท์เพียง 3 isolates ที่สร้างโครงสร้างการสืบพันธุ์ ได้แก่ PMA1, MA111 และ MA129 ส่วนราเอนโดไฟท์จำนวน 18 isolates ได้แก่ MA1, MA2, MA56, MA105, MA111, MA122, MA127, MA129, MA130, MA132, MA140, MA145, MA148, MA150, MA154, MA158, MA161, และ MA169 ไม่สร้างโครงสร้างการสืบพันธุ์ใดๆ โดยสร้างเพียงเส้นใยเท่านั้น

ทำให้ไม่สามารถจัดจำแนกได้ถึงระดับ genus หรือ species ได้ ดังนั้นจึงต้องอาศัยข้อมูลทางพันธุกรรมมาช่วยในการจัดจำแนกชนิด และยังทำให้ทราบถึงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับราชนิดอื่นๆ ได้ด้วย (Rollo *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1997; Guo *et al.*, 2000) การใช้ข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยา มาประกอบกันกับข้อมูลด้านพันธุกรรมช่วยในการจัดจำแนกชนิดของราทำให้เกิดความถูกต้องมากยิ่งขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Gams และคณะ (1999) ที่ศึกษาชนิดของราที่แยกจากหญ้า (*Miscanthus sinensis*) พบ *Fusarium miscanthi* sp. nov. โดยใช้ข้อมูลของส่วน large subunit 28S rDNA, mitochondrial small subunit (mtSSU) rDNA และ β -tubulin gene เพื่อเป็นการยืนยันผลการระบุชนิดรา และงานวิจัยของ Cheng และคณะ (2008) ที่ศึกษาราดินโดไฟไฟท์ที่แยกจากต้นรังกะแท้ (*Kandelia*) พบ *Fusarium proliferatum* โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาควบคู่กับข้อมูล 18S rDNA, 28S rDNA, ITS และ EF-1 α

การศึกษาดังนี้เลือกทำการจัดจำแนกชนิดของราดินโดไฟไฟท์โดยใช้ข้อมูลจากส่วน ITS และ LSU rDNA เนื่องจากข้อมูลจากส่วน ITS ซึ่งเป็นส่วนที่มีความผันแปรสูง (high variable region) สามารถใช้เพื่อจัดจำแนกราดินโดไฟไฟท์จนถึงระดับ genus และ species ได้ มีราดินโดไฟไฟท์เพียงบาง isolates เท่านั้นที่จัดจำแนกได้แค่ระดับ order หรือ family และข้อมูลในส่วน LSU ซึ่งเป็นส่วนที่มีความแปรผันต่ำ ทำให้จัดจำแนกราดินโดไฟไฟท์ได้ในระดับอนุกรมวิธานสูงๆ ได้แก่ order, family หรือ class เป็นต้น (Ellis *et al.*, 1998; Hopple Jr. and Vilgalys, 1999; Artjariyasriping *et al.*, 2001)

ข้อมูลลำดับเบสที่ผ่านๆ มาใช้นิวคลีโอไทด์ DNA ในส่วน ITS มีการนำมาใช้เพื่อการจัดจำแนกชนิดของเชื้อราในหลายงานวิจัย เช่น ลิตา (2551) ศึกษาชนิดของเชื้อราที่แยกจากกัลปังหาที่มีฤทธิ์ในการสร้างสารต้านจุลินทรีย์ สามารถจำแนกได้ถึงระดับ genus และ species Amna และคณะ (2006) ศึกษาราดินโดไฟไฟท์ที่แยกจาก *Nothapodytes foetida* ที่มีฤทธิ์ในการสร้างสาร camptothecin (CPT) เช่นเดียวกับ Phongpaichit และคณะ (2006, 2007) ที่จำแนกราดินโดไฟไฟท์จากพืชสกุล *Garcinia* ที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์และฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ

สำหรับการศึกษาดังนี้ ใช้การวิเคราะห์ข้อมูลทาง phylogeny 2 วิธี คือ maximum parsimony และ neighbor joining ซึ่งพบว่า topology ของทั้ง 2 วิธี มีความคล้ายคลึงกัน โดยแตกต่างกันเพียงเล็กน้อยบริเวณตำแหน่งของ subclade เท่านั้น ดังนั้นจึงเลือกนำเสนอเพียง maximum parsimony เพียงแบบเดียวเท่านั้น โดย phylogenetic tree ที่แสดงไว้เป็นแบบ most parsimonious tree เท่านั้น โดยแสดงค่าความเชื่อมั่น bootstrap ทั้งวิธี maximum parsimony และ neighbor joining ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Gams และคณะ (1999) ที่ศึกษาราดินโดไฟไฟท์ที่แยกได้จากหญ้า โดยใช้การวิเคราะห์แบบ maximum parsimony และนำเสนอเพียง most parsimonious tree สำหรับงานวิจัยของ

Cheng และคณะ (2008) ที่ศึกษาราเอนโดไฟท์จากพืชป่าชายเลนพบ *Fusarium proliferatum* ใช้การวิเคราะห์ แบบ Bayesian และ maximum parsimony พบว่าผลที่ได้จากการวิเคราะห์ ต่างกันเล็กน้อย จึงนำเสนอ tree เพียงจากการวิเคราะห์แบบ Bayesian โดยนำเสนอค่าความ เชื่อมั่นทางสถิติจากการวิเคราะห์แบบ Bayesian และ maximum parsimony

การจัดจำแนกชนิดของราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากพืชป่าชายเลนชนิดต่าง ๆ ที่มี ประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ lipase และ cellulase โดยคัดเลือกมาทั้งหมด 21 isolates มา ทำการจัดจำแนกขั้นต้นโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยการเพาะเลี้ยงราที่ต้องการศึกษา บนอาหาร PDA พบว่ามีการสร้างสปอร์ชนิดโคนิดิโอสปอร์ หรือ โคนิดีเดียวเพียง 3 isolates (14.3%) จำแนกได้เป็น *Cladosporium* sp. 2 isolates และ *Pestalotiopsis* sp. 1 isolate ส่วน ราเอนโดไฟท์ที่เหลือจำนวน 18 isolates (85.7%) ไม่พบการสร้างสปอร์ จึงมีความจำเป็นต้องใช้ ข้อมูลทางพันธุกรรมมาช่วยในการจัดจำแนก

ในการพิจารณาถึงความหลากหลายของราเอนโดไฟท์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ lipase และ cellulase จำนวน 21 isolates พบว่าสามารถจัดจำแนกอยู่ใน 6 orders ได้แก่ Agaricales, Diaporthales, Xylariales, Capnodiales, Pleosporales และ Botryosphaerales ซึ่งสามารถจัด จำแนกในระดับ genus ได้ดังนี้ *Cladosporium*, *Diaporthe*, *Guignardia*, *Phomopsis*, *Pestalotiopsis*, *Leptosphaerulina*, *Massarina* และ *Schizophyllum* และมีเชื้อราบาง isolates ที่ไม่สามารถจำแนกได้ในระดับ genus ได้แก่ MA2, MA81, MA105, MA122, MA127, MA130, MA140, MA145 และ MA158 เนื่องจาก มีข้อมูลของลำดับเบส DNA ไม่เพียงพอในการ เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank และจากการศึกษาครั้งนี้ มีราเอนโดไฟท์จำนวน 2 isolates (MA132 และ MA148) ที่ไม่สามารถจัดจำแนกได้เนื่องจากไม่สามารถเพิ่มจำนวนทั้ง ในส่วนของ LSU และ ITS rDNA

การศึกษาเกี่ยวกับราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากพืชป่าชายเลนชนิดต่าง ๆ มีรายงานพบรา ได้หลาย genus เช่น *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis*, *Phoma*, *Phomopsis*, *Phyllosticta* และ *Trichodema* (Liu et al., 2007) และ จากงานวิจัยของ Maria และคณะ (2005) ได้ทำการแยก ราเอนโดไฟท์จากเหงือกปลาหมอ (*Acanthus ilicifolius*) และ ปรงทะเล (*Acrostichum aureum*) พบว่า *Acremonium* sp., *Alternaria chlamydosporus*, *Alternaria* sp., *Nigrospora oryzae*, *Aspergillus* sp. และ *Pestalotiopsis* sp. สามารถสร้างเอนไซม์ lipase และ cellulase ได้ สำหรับงานวิจัยของ Torres และคณะ (2003) พบว่า *Rhizopus oryzae* ที่แยกจากพืชแถบ เมดิเตอร์เรเนียน สามารถสร้างเอนไซม์ lipase ชนิดที่เป็น mycelium bound ได้

นอกจากนี้แล้วราเอนโดไฟท์ในพืชบกก็มีการศึกษาถึงประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ ได้หลายชนิดเช่นกัน เช่น การศึกษาของ Urairaj และคณะ (2003) พบว่าเชื้อรากลุ่ม

Xylariaceae ที่แยกจากพืชพื้นเมืองทางภาคเหนือของประเทศไทย มีความสามารถในการสร้าง lignolytic enzyme สำหรับงานวิจัยของ Choi และคณะ (2005) ที่ศึกษาราดราเอนโดไฟท์ที่แยกจากต้นราชดัด (*Brucea javanica*) พบว่า *Colletotrichum* sp., *Fusarium* sp., *Phomopsis* sp., *Phoma* sp., *Coelomycete* sp., *Hyphomycete* sp., Xylariaceae sp., และ *Sterilia Mycelia* สามารถสร้างเอนไซม์ amylase และ cellulase ได้

อย่างไรก็ตามการศึกษความหลากหลายของราเอนโดไฟท์ที่แยกจากพืชป่าชายเลนที่มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ ยังมีการศึกษาอยู่ในวงจำกัด และยังเป็นแหล่งที่มีผู้ให้ความสนใจน้อย เนื่องจากอาจเป็นแหล่งที่สร้างเอนไซม์ได้ไม่ดัดนัก จึงทำให้มีข้อมูลที่จะใช้เปรียบเทียบน้อยอยู่

สำหรับการศึกษาในครั้งนี้พบว่าราเอนโดไฟท์ที่มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์กระจายอยู่ใน order Botryosphaerales และ Pleosporales มากที่สุด จำนวน 5 isolates ซึ่งจากการศึกษาพบว่าราเอนโดไฟท์ที่เป็นสมาชิกของแต่ละ order แม้ว่าจะมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกัน แต่เมื่อพิจารณาโดยอาศัยข้อมูลทางพันธุกรรมพบว่า เป็นเชื้อคนละ genus และ species กัน เช่น MA150 และ MA164 ซึ่งเป็นราเอนโดไฟท์ใน order Pleosporales มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกัน (รูปที่ 16) แต่เมื่อนำมาศึกษาโดยใช้การวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรมสามารถจำแนกชนิดได้เป็น *Massarina corticola* และ *Leptosphaerulina chartarum* ตามลำดับ ซึ่งการจำแนกชนิดของเชื้อราโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวไม่เพียงพอ เพราะเชื้อที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เหมือนกันอาจเป็นเชื้อคนละชนิดกัน (Guo *et al.*, 1998; Taylor *et al.*, 1999)

จากการศึกษาในครั้งนี้ที่ใช้ผลของการจัดจำแนกทางสัณฐานวิทยา และการวิเคราะห์ผลทาง phylogeny พบการกระจายตัวของราเอนโดไฟท์ใน 6 orders ซึ่งสามารถแบ่งอธิบายแต่ละ order ได้ดังนี้

Order Agaricales ซึ่งเป็นสมาชิกใน phylum Basidiomycota จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน LSU และ ITS rDNA สามารถจัดจำแนกราดราเอนโดไฟท์ MA56 เป็น *Schizophyllum commune* ซึ่ง *S. commune* เป็นราที่อยู่ใน phylum Basidiomycota ส่วนใหญ่สามารถพบได้บนไม้ที่ตายแล้ว (James *et al.*, 2001) และสามารถพบเป็นราเอนโดไฟท์ได้ด้วย มีรายงานว่าราที่เป็นสมาชิกในกลุ่ม Basidiomycota สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยสลายลิกนิน และองค์ประกอบต่างๆ ของพืชได้ (Oses *et al.*, 2006)

ราเอนโดไฟท์ที่พบใน order Capnodiales ได้แก่ MA111 และ PMA1 พบว่าสร้างโครงสร้างสืบพันธุ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ และจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน LSU rDNA และ ITS rDNA ของราเอนโดไฟท์ MA111 พบว่ามีความใกล้เคียงกับ *Davidiella tassiana* ที่มี anamorph เป็น *Cladosporium* และพบว่า MA111 และ PMA1 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกัน ประกอบกับราเอนโดไฟท์ทั้ง 2 isolates นี้ มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึง และมีการ

สร้างสปอร์แบบ *Cladosporium* เช่นเดียวกัน จึงจัดจำแนกราเอนโดไฟท์ MA111 และ PMA1 เป็น *Cladosporium* sp. โดย *Cladosporium* sp. เป็นราที่สามารถก่อโรคในพืช และยังพบเป็นราเอนโดไฟท์จากพืชป่าชายเลนได้ด้วย (Liu *et al.*, 2007) ซึ่งราชนิดนี้มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ได้หลายชนิดเช่นกัน (Abrha and Gashe, 1992; Ghahfarokhi *et al.*, 2004)

ราเอนโดไฟท์ที่พบใน order Pleosporales ประกอบด้วย MA122, MA130, MA150, MA158 และ MA164 โดย MA122 และ MA158 ไม่สามารถจัดจำแนกถึงระดับ genus ได้ เนื่องจากราเอนโดไฟท์ทั้ง 2 isolates ไม่สามารถจัดกลุ่มอยู่กับ genus ใดๆ จึงจัดจำแนกรา 2 isolates นี้ เป็นเพียงสมาชิกใน order Pleosporales เท่านั้น เนื่องจากใน clade ที่ MA122 และ MA158 เป็นสมาชิกอยู่นั้นประกอบด้วยราเอนโดไฟท์หลาย family ใน order นี้ ในขณะที่ MA130 ที่ใช้การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน ITS rDNA พบว่ามีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Lophiostoma* sp. AY787716 แต่เนื่องจากมี % sequence identity ที่ต่ำ จึงไม่ควรจัด MA130 เป็น *Lophiostoma* sp. แต่สามารถจัดเป็นสมาชิกใน order Pleosporales

สำหรับราเอนโดไฟท์ MA150 เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน LSU rDNA พบว่ามีความใกล้เคียงกันมากกับ MA158 เมื่อพิจารณาจากลักษณะของโคโลนีพบว่ามีลักษณะที่คล้ายคลึงกัน และเมื่อวิเคราะห์โดยใช้ข้อมูลส่วน ITS rDNA พบว่า MA150 แสดงความสัมพันธ์ใกล้ชิดมากกับ *Massarina corticola* AF383957 ดังนั้นจึงจัดจำแนก MA150 เป็น *Massarina corticola* สำหรับ MA164 เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน LSU rDNA พบว่ามีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Bimuria novaezelandiae* AY016356 แต่มี branch length ค่อนข้างยาว ในขณะที่เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน ITS rDNA พบว่ามีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Leptosphaerulina chartarum* EU272493 และเมื่อดูจาก branch length พบว่า MA164 กับ *Leptosphaerulina chartarum* EU272493 มี branch length ที่สั้นมาก ดังนั้นจึงควรจัดจำแนก MA164 เป็น *Leptosphaerulina chartarum*

ราเอนโดไฟท์ order Botryosphaeriales ซึ่งประกอบด้วยราเอนโดไฟท์จำนวน 5 isolates ได้แก่ MA127, MA140, MA145, MA161 และ MA169 จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน LSU rDNA พบว่าราเอนโดไฟท์ MA127 และ MA140 มีความสัมพันธ์ที่ใกล้เคียงกันมาก ดูได้จาก branch length ที่สั้นมาก และพบว่ามีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ fungal endophyte EF420102 และ fungal endophyte EF420103 ซึ่งเป็นราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากพืชวงศ์สนแผง (cupressaceous trees) (Hoffman and Arnold, 2007) แต่เมื่อพิจารณาโดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน ITS rDNA พบว่าราเอนโดไฟท์ทั้ง 2 isolates มีความสัมพันธ์กับ *Guignardia mangiferae* AY277710 แต่เนื่องจาก branch length ที่ค่อนข้างยาวจึงจัดจำแนก MA127 และ MA140 เป็น *Guignardia* sp.

สำหรับราเอนโดไฟท์ MA145 เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน LSU และ ITS rDNA พบว่ามีตำแหน่งอยู่ห่างจากราอื่นๆ ที่อยู่ใน subclade เดียวกัน ดังนั้นจึงไม่สามารถจัด

จำแนกชนิดของราเอนโดไฟท์ MA145 ได้ เนื่องจากมีข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank ให้เปรียบเทียบน้อย โดยจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน ITS rDNA พบว่า MA145 มี fungal endophyte EF419927, EF419937 และ EF420019 ซึ่งเป็นราเอนโดไฟท์ที่แยกจากพืชวงศ์สนแผง (cupressaceous trees) (Hoffman and Arnold, 2008) และ fungal endophyte AY433808 เป็นราเอนโดไฟท์ที่แยกจาก *Taxus mairei* และ fungal endophyte FJ025267 เป็นราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากพืชใบกว้าง เป็น sister taxa

สำหรับราเอนโดไฟท์ MA161 และ MA169 สามารถวิเคราะห์ได้เพียงส่วน LSU rDNA เท่านั้น เนื่องจากไม่มีข้อมูลส่วน ITS rDNA จากการวิเคราะห์พบว่าราเอนโดไฟท์ทั้ง 2 isolates มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกันมาก โดยพบว่าทั้ง 2 isolates มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับ *Guignardia bidwellii* DQ678085 แต่เนื่องจากมี branch length ที่ห่างกันมาก จึงไม่สามารถบ่งชี้ได้ชัดเจนว่า MA161 และ MA169 เป็น *Guignardia bidwellii* หรือไม่ จึงอาจจัดจำแนกราเอนโดไฟท์ MA161 และ MA169 เป็น *Guignardia* sp.

สำหรับราเอนโดไฟท์ใน order Diaporthales ซึ่งประกอบด้วยราเอนโดไฟท์จำนวน 4 isolates ได้แก่ MA1, MA2, MA81 และ MA154 จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน LSU rDNA พบว่าราเอนโดไฟท์ MA1 มีความใกล้เคียงกับ *Diaporthe decedens* AF408348 แต่มีค่าความเชื่อมั่น bootstrap ต่ำ แต่เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน ITS rDNA พบว่าราเอนโดไฟท์ MA1 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับ MA2 ซึ่งอยู่ใน subclade ที่ประกอบด้วย fungal endophyte FJ025298 ที่แยกได้จากพืชใบกว้าง, fungal endophyte FJ232904 ที่แยกจากพืชสกุล *Dracaena cochinchinensis* (Lour.), fungal endophyte EU687127 ซึ่งเป็นราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากหญ้า, *Phomopsis* sp. และ *Diaporthe* sp. จากการจัดจำแนกโดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน ITS rDNA จึงควรจัดจำแนก MA1 และ MA2 เป็น *Diaporthe* sp. ในขณะที่ราเอนโดไฟท์ MA81 ที่วิเคราะห์โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน LSU และ ITS rDNA พบว่าราเอนโดไฟท์ MA81 ความห่างจากราอื่นๆ ใน subclade เดียวกันแต่ sister taxa ได้แก่ รากลุ่ม fungal endophyte DQ485955 เป็นราเอนโดไฟท์ที่แยกจากพืชสกุล *Magnolia liliifera* (Promputtha et al., 2005), *Phomopsis* sp. และ *Diaporthe* sp. จึงจัดจำแนก MA81 เป็น Diaporthaceae sp.

สำหรับราเอนโดไฟท์ MA154 มีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เฉพาะส่วน LSU rDNA เท่านั้น เนื่องจากไม่สามารถเพิ่มจำนวนส่วน ITS rDNA ได้ จากการวิเคราะห์พบว่า MA154 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับ *Phomopsis* sp. EU219393 ดังนั้นควรจัดจำแนกชนิดของ MA154 เป็น *Phomopsis* sp. จากการศึกษาการแยกราเอนโดไฟท์จากพืชป่าชายเลนโดย Liu และคณะ (2007) พบเชื้อราหลายชนิดรวมทั้ง *Phomopsis* และจากการศึกษาของ Choi และคณะ (2005) ศึกษาราเอนโดไฟท์ที่แยกจากต้นราชดัด พบ *Phomopsis* sp. ที่สามารถสร้างเอนไซม์ amylase และ cellulase ได้

ราเอนโดไฟท์ order Xylariales ที่ประกอบด้วย MA105 และ MA129 ซึ่งราเอนโดไฟท์ ทั้ง 2 isolates มีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เฉพาะส่วน ITS rDNA เท่านั้น เนื่องจากไม่สามารถเพิ่มจำนวนส่วน LSU rDNA ของราเอนโดไฟท์ทั้ง 2 isolates ได้ โดยราเอนโดไฟท์ MA105 มีความสัมพันธ์กับราใน family Xylariaceae จาก tree พบว่า MA105 มี branch length ที่ห่างจากราอื่นๆ ใน family Xylariaceae เนื่องจากมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างไปจากราชนิดอื่นๆ ที่นำมาเทียบเคียง

สำหรับราเอนโดไฟท์ MA129 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับ *Pestalotiopsis* sp. FJ037738 และจากการศึกษาทางสัณฐานวิทยาพบว่า MA129 สามารถสร้างสปอร์เป็น *Pestalotiopsis* ซึ่งยืนยันการจัดจำแนก isolate นี้ว่าเป็น *Pestalotiopsis* sp. จากรายงานพบว่า *Pestalotiopsis* sp. สามารถแยกได้จากพืชป่าชายเลน และยังพบว่าสามารถสร้าง เอนไซม์ lipase และ cellulase ได้ (Maria *et al.*, 2005) และจากการศึกษาของ Urairaj และคณะ (2003) พบว่ารากกลุ่ม Xylariaceae สามารถสร้าง ligninolytic enzyme ได้ นอกจากนี้ Choi และคณะ (2005) ยังพบว่า Xylariaceae sp. ซึ่งเป็นราเอนโดไฟท์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ amylase และ cellulase ได้

สำหรับราเอนโดไฟท์ที่ไม่สามารถจัดจำแนกชนิดได้จำนวน 2 isolates ได้แก่ MA132 และ MA148 เนื่องจากไม่สามารถเพิ่มจำนวนส่วน LSU และ ITS rDNA ได้ แต่ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ MA132 มีลักษณะใกล้เคียงกับ MA105 คือมีการสร้าง stroma ชูขึ้นมาจากอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเป็นลักษณะที่พบในรากกลุ่ม Xylariaceae ดังนั้นจึงน่าจะจัด MA132 เป็นราเอนโดไฟท์ในกลุ่ม Xylariaceae

แม้ว่าการจัดจำแนกชนิดโดยใช้ข้อมูลทางพันธุกรรมจะมีข้อดี คือ สะดวก รวดเร็ว และสามารถจัดจำแนกได้ถึงระดับ genus และ species อย่างไรก็ตามก็ยังมีข้อจำกัดอยู่เช่นเดียวกัน คือขึ้นอยู่กับแหล่งฐานข้อมูล GenBank ที่ใช้ในการเทียบเคียง หากข้อมูลที่มีให้เทียบมีน้อย หรือไม่มากพอ ก็อาจไม่สามารถจัดจำแนกถึงระดับชนิดได้ ดังนั้นในการจัดจำแนกชนิดของรา จึงยังจำเป็นต้องอาศัยข้อมูลทางสัณฐานวิทยาควบคู่กันไปด้วย เพื่อช่วยยืนยันและให้เกิดความถูกต้องมากยิ่งขึ้น

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

5.1 สรุปผลการทดลอง

จากการทดสอบเบื้องต้นเกี่ยวกับความสามารถของราเอนโดไฟท์ที่แยกจากพืชป่าชายเลนในการสร้างเอนไซม์ 4 ชนิด ได้แก่ lipase, cellulase, amylase และ protease โดยใช้วิธี plate method พบว่าราเอนโดไฟท์ที่ศึกษาส่วนใหญ่สามารถสร้างเอนไซม์ lipase และ cellulase ได้ และพบการสร้างเอนไซม์ amylase น้อยมาก ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ไม่พบราเอนโดไฟท์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ protease นอกจากนี้จากการศึกษาการสร้างเอนไซม์โดยชุด API ZYM test kit พบว่าราเอนโดไฟท์ทุก isolates ที่ทดสอบสามารถสร้างเอนไซม์ acid phosphatase ได้ และการทดสอบด้วยชุดทดสอบนี้ยังเป็นการช่วยยืนยันผลการทดสอบจากการทดสอบด้วยวิธี plate และจากการศึกษาประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ของราเอนโดไฟท์ที่คัดเลือก พบว่าราเอนโดไฟท์ที่นำไปศึกษามีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ได้ต่ำจึงไม่เหมาะสมที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในทางอุตสาหกรรม

จากการจัดจำแนกชนิดของราเอนโดไฟท์ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ lipase และ cellulase จำนวน 21 isolates พบว่าราเอนโดไฟท์ที่คัดเลือกได้ มีความหลากหลายกระจายอยู่ใน 6 orders, 8 genera แบ่งเป็น

- 1) จำแนกได้ถึงระดับ species จำนวน 3 isolates ได้แก่ *Leptosphaerulina chartarum* MA164, *Massarina corticola* MA150 และ *Schizophyllum commune* MA56
- 2) จำแนกได้จนถึงระดับ genus จำนวน 10 isolates ได้แก่ *Cladosporium* sp. MA111, *Cladosporium* sp. PMA1, *Diaporthe* sp. MA1, *Diaporthe* sp. MA2, *Guignardia* sp. MA127, *Guignardia* sp. MA140, *Guignardia* sp. MA161, *Guignardia* sp. MA169, *Phomopsis* sp. MA154 และ *Pestalotiopsis* sp. MA129
- 3) จำแนกได้ในระดับ family หรือ order ได้แก่ Diaporthaceae sp. MA81, Pleosporales sp. 3 isolates ได้แก่ MA122, MA130 และ MA158, Botryosphaeriaceae sp. MA145 และ Xylariaceae sp. MA105
- 4) ไม่สามารถจัดจำแนกได้ 2 isolates ได้แก่ MA132 และ MA148 แต่คาดว่า MA132 น่าจะเป็น Xylariaceous fungi

ข้อเสนอแนะ

1. ควรนำส่วนของตัวเซลล์มาศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ด้วยเพื่อศึกษาถึงเอนไซม์ที่อยู่ผิว (cell bound) นอกจากการศึกษาค่ากิจกรรมจากน้ำเลี้ยงเชื้อเพียงอย่างเดียว
2. ควรศึกษาเอนไซม์กลุ่ม lignolytic และ pectinase เพิ่มเติม
3. ควรหาอาหารเลี้ยงเชื้อหรือวิธีการวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ที่เหมาะสม

เอกสารอ้างอิง

- ขจีนาฏ โพธิเวชกุล, สุมาลี เหลืองสกุล และ สมใจ ศิริโชค. 2541. การคัดเลือกจุลินทรีย์เพื่อใช้ผลิตเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอส และไลเปส. วารสารมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร. 14: 18-32.
- จूरรัตน์ แซ่แต้. 2541. การคัดเลือกและศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิสูงที่แยกได้จากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.
- เจษฎา เต็มดวงบริพันธ์. 2545. ระบบวิทยาและวงศ์วานวิวัฒนาการ (systematics and phylogeny) เปิดโลกทัศน์ใหม่ทางชีววิทยา. วารสารวิทยาศาสตร์. 56: 168-175.
- ณัฐวุฒิ รุ่งจินดามัย. 2549. ราเอนโดไฟท์ที่ผลิตสารต้านจุลินทรีย์จากพืชสกุล *Garcinia*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา.
- บุญศรี จงเสรีจิตต์. 2533. การผลิตโคจิเพื่อใช้ในการหมักน้ำปลา. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.
- ประไพพิศ เชาวลิต. 2549. การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรโดยราเอนโดไฟท์ *Penicillium* sp. A2. โครงการวิจัยวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา.
- ปราณี อานเป็ลียง. 2543. เอนไซม์ทางอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 3 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.: กรุงเทพฯ.
- สิตา ปริदानนท์. 2551. การคัดเลือกและการจำแนกชนิดเชื้อราที่สร้างสารต้านจุลินทรีย์จากกัลปังหา. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา.
- สมรภัษ พันธุ์ผล. 2537. การทำให้บริสุทธิ์และคุณสมบัติของเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนสจาก *Aspergillus niger* ATCC 6275. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา.
- Abrha, B. and Gashe, B.A. 1992. Cellulase production and activity in a species of *Cladosporium*. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 8: 164-166.
- Alias, S.A. and Jones, E.B.G 2000. Vertical distribution of marine fungi on *Rhizophora apiculata* at Morib mangrove, Selangor, Malaysia. Mycoscience 41: 431-436.

- Alves, M.H., Campos-Takaki, G.M., Porto, A.L.F and Milanez, A.I. 2002. Screening of *Mucor* spp. for the production of amylase lipase polygalacturonase and protease. *Brazilian Journal of Microbiology*. 33: 325-330.
- Amna, T., Khajuria, R.K., Puri, S.C., Verma, V. and Qazi, G.N. 2006. Determination and quantification of camptothecin in an endophytic fungus by liquid chromatography: positive mode electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Current Science*. 91: 208-212.
- Ananda, K. and Sridhar, K.R. 2004. Diversity of filamentous fungi on decomposing leaf and woody litter of mangrove forests in the southwest coast of India. *Current Science*. 87: 1431-1437.
- Arnold, A.E., Maynard, Z., Gilbert, G.S, Coley, P.D. and Kursar, T.A. 2000. Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? *Ecology Letters*. 3: 267-274.
- Artjariyasripong, S., Mitchell, J.I., Hywel-Jones, N.L. and Jones, E.B.G. 2001. Relationship of the genus *Cordyceps*, and related genera, based on parsimony and spectral analysis of partial 18S and 28S ribosomal gene sequences. *Mycoscience*. 42: 503-517.
- Barnett, H.L. and Hunter B.B. 1998. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. 4th Ed. APS Press, St. Paul: Minnesota.
- Bills, G.F. 1996. Isolation and analysis of endophytic fungal communities from woody plants. In: *Endophytic fungi in grasses and woody plants: Systematics, ecology and evolution*. Redlin, S.C. and Carris, L.M. Eds. St. Paul Minnesota: APS Press. pp 31-65.
- Borriss, R. 1987. Biology of enzymes. In: *Biotechnology*. Ebel, H.F and Schultz, C. M. Eds. VCH: Newyork. pp 44-531.
- Bridge, P. 2002. The history and application of molecular mycology. *The Mycologist*. 16: 90-99.
- Brown, K.B. Hyde, K.D. and Guest, D.I. 1998. Preliminary studies on endophytic fungal communities of *Musa acuminata* species complex in Hong Kong and Australia. *Fungal Diversity*. 1: 27-51.
- Bunyard, B.A., Nicholson, M.S and Royse, D.J. 1994. A systematic assessment of *Morchella* using RFLP analysis of the 28S ribosomal RNA gene. *Mycologia*. 86: 762-772.

- Centis, S., Guillas, I., Sejalon, N., Esquerre-Tugaye, M.T. and Dumas, B. 1997. Endopolygalacturonase genes from *Colletotrichum lindemuthianum*: cloning of *CLPG2* and comparison of its expression to that of *CLPG1* during saprophytic and parasitic growth of the fungus. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 10: 769–775.
- Champreda, V., Kanokratana, P., Sriprang, R., Tanapongpipat, S. and Eurwilaichitr, L. 2007. Purification, biochemical characterization and gene cloning of a new extracellular thermotolerant and glucose tolerant maltooligosaccharide-forming α -amylase from an endophytic ascomycete *Fusarium* sp. BCC4124. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 71(1): 2010-2020.
- Chareprasert, S., Piapukiew, J., Thienhirun, S., Whalley, A.J.S. and Sihanonth, P. 2006. Endophytic fungi of teak leaves *Tectona grandis* L. and rain tree leaves *Samanea saman* Merr. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 22: 481–486.
- Cheng, C., Tang, W-C., Su, Z-J., Cai, Y., Sun, S-F., Chen, Q-T., Wang, F-H., Lin, Y-C., She, Z-G. and Vrijmoed, L.L.P. 2008. Identification of mangrove endophytic fungus 1403 (*Fusarium proliferatum*) based on morphological and molecular evidence. *Journal of Forestry Research*. 19: 214-224.
- Choi, Y.W. Hodgkiss, I.J. and Hyde, K.D. 2005. Enzyme production by endophytes of *Brucea javanica*. *Journal of Agricultural Technology*. 1: 55-66.
- Colen, G., Junqueira, R.G. and Moraes-Santos, T. 2006. Isolation and screening of alkaline lipase-producing fungi from Brazilian savanna soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 22: 881-885.
- Costa, M.A.F. and Peralta, R.M. 1999. Production of lipase by soil fungi and partial characterization of lipase from a selected strain (*Penicillium wortmanii*). *Journal of Basic Microbiology*. 39: 11-15.
- Ellis, J.T., Amoyal, G., Ryce, C., Harper, P.A.W., Clough, K.A., Homan, W.L. and Brindley, P.J. 1998. Comparison of the large subunit ribosomal DNA of *Neospora* and *Toxoplasma* and development of a new genetic marker for their differentiation based on the D2 domain. *Molecular Cellular Probes*. 12: 1-13.
- Faeth, S.H. 2002. Are endophytic fungi defensive plant mutualists? *Oikos*. 98: 25-36.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*. 39: 783-791.

- Fisher, P.J. and Petrini, O. 1992. Fungal saprobes and pathogens as endophytes of rice (*Oryza sativa* L.). *New Phytologists*. 120: 137-143.
- Fogarty, W.M. 1983. Microbial amylases. In: *Microbial enzymes and biotechnology*. Applied Science, England. pp 1-57.
- Fröhlich, J. and Hyde, K.D. 1999. Biodiversity of palm fungi in the tropics: are global fungal diversity estimates realistic? *Biodiversity and Conservation*. 8: 977-1004.
- Fröhlich, J., Hyde, K.D. and Petrini, O. 2000. Endophytic fungi associated with palms . *Mycological Research*. 104: 1202-1212.
- Fucinos, P., Abadin, C.M., Sanroman, A., Longo, M.A., Pastrana, L. and Rua, M.L. 2005. Identification of extracellular lipases/esterases produced by *Thermus thermophilus* HB27: Partial purification and preliminary biochemical characterization. *Journal of Biotechnology*. 117: 233–241.
- Gams, W., Klamer, M. and O' Dennell, K. 1999. *Fusarium miscanthi* sp. nov. from *Miscanthus* litter. *Mycologia*. 91: 263-268.
- Gao, X.X., Zhou, H., Xu, D.Y., Yu, C.H., Chen, Y.Q. and Qu, L.H. 2005. High diversity of endophytic fungi from the pharmaceutical plant, *Heterosmilax japonica* Kunth revealed by cultivation-independent approach. *FEMS Microbiology Letter*. 249: 255-266.
- Georgieva, S., Christensen, S., Petersen, H., Gjelstrup, P. and Thorup-Kristensen, K. 2005. Early decomposer assemblages of soil organisms in litterbags with vetch and rye roots. *Soil Biology and Biochemistry*. 37: 1145–1155.
- Ghahfarokhi, M.S., Fazli, A., Lotfi, A. and Abyaneh, M.R. 2004. Cellobiose dehydrogenase production by the genus *Cladosporium*. *Iranian Biomedical Journal*. 8: 107-111.
- Ghimire, S.R. and Hyde, K.D. 2004. Fungal endophytes. In: *Plant surface microbiology*. Varma, A., Abbott, L., Werner, D. and Hampp, R. Eds. Berlin, pringer. pp. 281-292.
- Gilbert, G.S., Mejia-Chang, M. and Rojas, E. 2002. Fungal diversity and plant disease in mangrove forests: salt excretion as a possible defense mechanism. *Oecologia*. 132: 278-285.
- Guehi, T.S. Dingkuhn, M., Cros, E., Fourny, G., Ratomahenina, R., Moulin, G. and Vidal, A.C. 2007. Identification and Lipase-producing abilities of moulds isolated

- from Ivorian raw cocoa beans. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*. 3: 838-843.
- Guimaraes, L.S.H., Peixoto-Nogueira, S.C., Michelin, M., Rizzatti, A.C.S., Sandrim, V. C., Zanoelo, F.F., Aquino, A.C.M.M., Junior, A.B. and Polizeli, M. de L.T.M. 2006. Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. *Brazilian Journal of Microbiology*. 37: 474-480.
- Gulati, R., Isar, J., Kumar, V., Prasad, A.K., Parmar, V.S. and Saxena, R.K. 2005. Production of a novel alkaline lipase by *Fusarium globulosum* using neem oil, and its applications. *Pure and Applied Chemistry*. 77: 251–262.
- Guo, L.D., Hyde, K.D. and Liew, E.C.Y. 1998. A method to promote sporulation in palm endophytic fungi. *Fungal Diversity* 1: 109-113.
- Guo, B., Dai, J.R, Ng, S., Huang, Y., Leong, C. Ong, W. and Carte, B.K. 2000. Cytonic acids A and B: novel tridepside inhibitors of hCMV protease from the endophytic fungus *Cytonaema* species. *Journal of Natural Products*. 63: 602-604.
- Guo, L.D., Huang, G.R., Wang, Y., He, W.H., Zheng, W.H. and Hyde, K.D. 2003. Molecular identification of white morphotype strains of endophytic fungi from *Pinus tabulaeformis*. *Mycological Research*. 107: 680-688.
- Hall, T.A. 2005. BioEdit V.7.0.9: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. (online). Available <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html> (Access date 10 November 2008)
- Hesami, S., Allen, K.J., Metcalf, D., Ostland, V.E., Macinnes, J.I. and Lumsden, J.S. 2008. Phenotypic and genotypic analysis of *Flavobacterium psychrophilum* isolates from Ontario salmonids with bacterial coldwater disease. *Canadian Journal of Microbiology*. 54: 619-629.
- Hibbett, D.S. 1992. Ribosomal RNA and fungal systematics. *Transactions of the Mycological Society Japan*. 33: 533-556.
- Hillis, D.M. and Dixon, M.T. 1991. Ribosomal DNA: Molecular evolution and phylogenetic inference. *Quarterly Review of Biology*. 66: 411-453.
- Hiol, A., Jonzo, M.D., Druet, D. and Comeau, L. 1999. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Mucor hiemalis f. hiemalis*. *Enzyme and Microbial Technology*. 25: 80–87.
- Ho, W.H., To, P.C. and Hyde, K.D. 2003. Induction of antibiotic production of freshwater fungi using mix-culture fermentation. *Fungal Diversity*. 12: 45-51.

- Hoffman, M.T. and Arnold, A.E. 2008. Geographic locality and host identity shape fungal endophyte communities in cupressaceous trees. *Mycological Research*. 112: 331-344.
- Hölker, U., Höfer, M. and Lenz, J. 2004. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 64: 175–186.
- Hopple Jr., J.S. and Vilgalys, R. 1999. Phylogenetic relationships in mushroom genus *Coprinus* and dark-spored allies based on sequence data from the nuclear gene coding for the large ribosomal subunit RNA: Divergent domains, outgroups and monophyly. *Molecular Phylogenetic and Evolution*. 13: 1-19.
- Hyde, K.D., Jones, E.B.G., Leano, E., Pointing, S.B. Poonyth, A.D. and Vrijmoed, L.L.P. 1998. Role of fungi in marine ecosystems. *Biodiversity and Conservation* 7: 1147-1161.
- Ibrahim, O.C. 2008. Development of applications of industrial enzymes from Malaysian indigenous microbial sources. *Bioresource Technology*. 99. 4572–4582
- Jansen, A.B., Gargas, A., Eilenberg, J. and Rosendhal, S. 1998. Relationships of the insect pathogenic order Entomophthorales (Zygomycota, Fungi) based on phylogenetic analyses of nuclear small subunit ribosomal DNA sequences (SSU rDNA). *Fungal General Biology*. 24: 325-334.
- James, T.Y., Moncalvo, J.M., Li, S. and Vilgalys, R. 2001. Polymorphism at the ribosomal DNA spacers and its relation to breeding structure of the widespread mushroom *Schizophyllum commune*. *Genetics*. 157:149-161.
- Jordaan, A., Taylor, J.E. and Rossenkhani, R. 2006. Occurrence and possible role of endophytic fungi associated with seed pods of *Colophospermum mopane* (Fabaceae) in Botswana. *South African Journal of Botany*. 72: 245-255.
- Jones, E.B.G and Hyde, K.D. 2004. Introduction to Thai fungal diversity. In: *Thai Fungal Diversity*. Jones, E.B.G., Tanticharoen, M. and Hyde, K.D. Eds. Biotec. Thailand.
- Kathiresan, K. and Bingham, B.L. 2001. Biology of mangroves and mangrove ecosystems. *Advances in Marine Biology*. 40: 81-251.
- Katz, B. and Lieth, H.H. 1980. Fungi associated with loblolly pine needles. II. Phenology and vertical distribution of fungi in the canopy and first year litter. *International Journal of Biometeorology*. 24: 179-197.

- Kaushik, N.K. and Hynes H.B.N. 1971. The fate of the dead leaves that fall into streams. *Archive of Hydrobiology*. 68: 465-515.
- Kavitha, N.S., Hilda, A., Gopinath, S. and Latha, K. 1997. Ecoethical technology using extracellular enzymes of *Chrysosporium*. Proceeding of the International Bioethics Workshop in Madras: Biomangement of Biogeoresources, Azariah J., Azariah H. and Macer R.J.D., University of Madras, 16-19 Jan.
- Ko, W.H. Wang, I.T. and Ann, P.J. 2005. A simple method for detection of lipolytic microorganisms in soils. *Soil Biology and Biochemistry*. 37: 597-599.
- Kohlmeyer, J. and Kohlmeyer, E. 1979. The higher fungi. In: *Marine Mycology*. Academic press, New York, London. pp 54-69.
- Kumaresan, V. and Surnayanarayanan, T.S. 2001. Occurrence and distribution of endophytic fungi in a mangrove community. *Mycological Research*. 105: 1388-1391.
- Kumaresan, V. Surnayanarayanan, T.S. and Johnson, J. A. 2002. Ecology of mangrove endophytes. *Fungal Diversity Research Series*. 7: 145-166.
- Landvik, S. 1996. *Neolecta*, a fruit-body producing genus of the basal ascomycetes, as shown by SSU and LSU rDNA sequences. *Mycological Research*. 100: 199-202.
- Landvik, S., Shailer, N.F.J. and Ericksson, O.E. 1996. SSU rDNA sequence support for a close relationship between the Elaphomycetales and Eurotiales and Onygenales. *Mycoscience*. 37: 237-241.
- Lee., S.Y. and Rhee, J.S. 1993. Production and partial purification of a lipase from *Pseudomonas putida* 3 SK. *Enzyme and Microbial Technology*. 15: 617-623.
- Leone, R., Buonomo, S, Nakamura, K., Aoki, S. and Vidotto, V. 1998. Enzymatic profile of *Cryptococcus neoformans* strains by using the API-ZYM system. *Revista iberoamericana de micología*. 15: 136-140.
- Lindstrom, J.T., Sun, S. and Belanger, F.C. A novel fungal protease expressed in endophytic infection of *Poa* species. *Plant Physiology*. 102: 645-650.
- Lipscomb, D. 1998. Basic of cladistic analysis. George Washington University. Washington DC.
- Liu, Z.L., Domier, L.L. and Sinclair, J.B. 1995. Polymorphism of genes coding for nuclear 18S rRNA indicates genetic distinctiveness of anastomosis group 10 from other groups in the *Rhizoctonia solani* species complex. *Applied and Environmental Microbiology*. 61: 2659–2664.

- Liu, A.R., Wu, X.P. and Xu, T. 2007. Research advances in endophytic fungi of mangrove. *Chinese Journal of Applied Ecology*. 18: 912–918.
- Lodge, D.J. 1997. Factors related to diversity of decomposer fungi in tropical forests. *Biodiversity and Conservation*. 6: 681-688.
- Lumyong, S., Thongantha, S., Lumyong, P. and Tomita, F. 2000. Endophytic fungi from 13 bamboo species in Thailand. *Biotechnology for Sustainable Utilization of Biological Resources in the Tropic*. 14: 96-101.
- Lumyong, S., Lumyong P., Mckenzie E.H.C. and Hyde K.D. 2002. Enzymatic activity of endophytic fungi of six native seeding species from Doi Suthep-Pui National Park, Thailand. *Canadian Journal of Microbiology*. 48: 1109-1112.
- Maccheroni Jr, W. and Azevedo, J.L. 1998. Synthesis and secretion of phosphatases by endophytic isolates of *Colletotrichum musae* grown under conditions of nutritional starvation. *Journal of General and Applied Microbiology*. 44: 381–387.
- Mahakhan, P. 2007. Microbial enzyme, cellulose. 1-6.
- Maia, M.M.D, Morais, M.M.C., Morais, Jr.M.A., Melo, E.H.M. and Lima F.J.L. 1999. Production of extracellular lipase by the phytopathogenic fungus *Fusarium solani* FS1. *Revista de Microbiologia*. 30: 304-309.
- Maria, G.L., Sridhar, K.R. and Raviraja, N.S. 2005. Antimicrobial and enzyme activity of mangrove endophytic fungi of southwest coast of India. *Journal of Agriculture Technology*. 1: 67-77.
- Marlida, Y., Saari, N., Hassan, Z. and Radu, S. 2000. Raw starch-degrading enzyme from newly isolated strains of endophytic fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 16: 573-578.
- Mazzola, M., Wong, O.T. and Cook, R.J. 1996. Virulence of *Rhizoctonia oryzae* and *R. solani* AG-8 on wheat and detection of *R. oryzae* in plant tissue by PCR. *Ecology and Epidemiology*. 86: 354-360.
- Mehdi, F.S. and Saifullah, S.M. 1992. Mangrove fungi of Karachi, Pakistan. *Journal of Islamic Academy of Sciences*. 5: 24-27.
- Mfilinge, P. L., Meziane, T, Bachok, Z. and Tsuchiya, M. 2005. Total lipid and fatty acid classes in decomposing mangrove leaves of *Bruguiera gymnorrhiza* and *Kandelia candel*: significance with respect to lipid input. *Journal of Oceanography*. 61: 613-622.

- Muller, M.M., Valjakka, R., Suokko, A. and Hantula, J. 2001. Diversity of endophytic fungi of single Norway spruce needles and their role as pioneer decomposers. *Molecular Ecology*. 10: 1801–1810.
- Mygind, P.H., Fischer, R.L., Schnorr, K.M., Hansen, M.T., Sonksen, C.P., Ludvigsen, S., Raventos, D., Buskov, S., Christensen, B., De Maria, L., Taboureau, O., Yaver, D., Elvig-Jørgensen, S.G., Sørensen, M.V., Christensen, B.E., Kjærulff, S., Frimodt-Møller, N., Lehrer, R.I., Zasloff, M. and Kristensen, H. 2005. Plectasin is a peptide antibiotic with therapeutic potential from a saprophytic fungus. *Nature*. 433: 975-980.
- O' Donnell, K., Cigelink, E., Weber, N.S. and Trappe, J.M. 1997. Phylogenetic relationship among ascomycetous truffles and the true and false morels inferred from 18S and 28S rinosomal DNA sequence analysis. *Mycologia*. 89: 48-65.
- Oses, R., Valenzuela, S., Freer, J., Baeza, J. and Rodriguez, J. 2006. Evaluation of fungal endophytes for lignocellulolytic enzyme production and wood biodegradation. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 57: 129–135.
- Osono, T., Bhatta, B.K. and Takeda, H. 2004. Phyllosphere fungi on living and decomposing leaves of giant dogwood. *Mycoscience*. 45: 35-41.
- Pang, K.L., Vrijmoed, L.L.P., Goh, T.K. Plaingam N. and Jones, E.B.G. 2008. Fungal endophytes associated with *Kandelia candel* (Rhizophoraceae) in Mai Po Nature Reserve, Hong Kong. *Botanica Marina*. 51: 171-178.
- Papagianni, M. 2004. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnology Advances*. 22: 189-259.
- Petrini, O. 1991. Fungal endophytes of tree leave. In: *Microbial ecology of leaves*. Andrew, J.H. and Hirano, S.S. Eds. New York, pringer. pp. 179-197.
- Phongpaichit, S., Rungjindamai, N., Rukachaisirikul, V. and Sakayaroj, J. 2006. Antimicrobial activity in cultures of endophytic fungi isolated from *Garcinia* species. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 48: 367–372.
- Phongpaichit, S., Nikom, J., Rungjindamai, N., Sakayaroj, J., Hutadilok-Towatana, N., Rukachaisirikul, V. and Kirtikara, K. 2007. Biological activities of extracts from endophytic fungi isolated from *Garcinia* plants. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 51: 517-525.

- Photita, W., Lumyong, S., Lumyong, P. and Hyde, K.D. 2001. Endophytic fungi of wild banana (*Musa acuminata*) at Doi Suthep-Pui National Park, Thailand. *Mycological Research*. 105: 1508-1513.
- Photita, W., Lumyong, S., Lumyong, P., McKenzie, E.H.C and Hyde, K.D. 2004. Are some endophytes of *Musa acuminata* latent pathogens? *Fungal Diversity*. 16: 131-140.
- Prompttha, I., Jeewon, R., Lumyong, S., McKenzie, E.H.C. and Hyde, K.D. 2005. Ribosomal DNA fingerprinting in the identification of non sporulating endophytic from *Magnolia liliifera* (Magnoliaceae). *Fungal Diversity*. 20:167-186.
- Raghukumar, S., Sharma, S., Raghukumar, C., Sathe-Pathak, V. and Chandramohan, D. 1994. Thraustochytrid and fungal component of marine detritus. 4. Laboratory studies on decomposition of leaves of the mangrove *Rhizophora apiculata* Blume. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 183: 113-131.
- Raghukumar, S. 2008. Marine fungal biotechnology: an ecological perspective. *Fungal Diversity*. 31: 19-35.
- Reddy, P.V, Lam, C.K. and Belanger, F.C. Mutualistic fungal endophyte express a proteinase that is homologous to proteases suspected to be important in fungal pathogenicity. *Plant Physiology*. 111: 1209-1218.
- Rollo, F., Sassaroli, S. and Ubaldi, M. 1995. Molecular phylogeny of the fungi of the Iceman' s grass clothing. *Current Genetics*. 28:289-297.
- Romeo, M.D., Aguado, J., Gonzalez, L. and Ladero, M. 1999. Cellulase production by *Neurospora crassa* on wheat straw. *Enzyme and Microbial Technology*. 25: 244-250.
- Rossmann, A.Y. 1994. Strategy for an all-texas inventory of fungal biodiversity. In: *Biodiversity and terrestrial ecosystems*. Peng, C.I. and Chou, C.U. Eds. Inst. Botany Acad. pp 169-194.
- Saikkonen, K., Ahlholm, J., Helander, M. Lehtimaki, S. and Niemelainen, O. 2000. Endophytic fungi in wild and cultivated grasses in Finland *Ecography* 23: 360-366.
- Samson, R.A., Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C. and Filtenborg, O 1995. Introduction to food-borne fungi. 4th Eds. Wageningen, The Netherlands
- Sarma, V.V., Hyde, K.D. and Vittal, B.P.R. 2001. Frequency of occurrence of mangrove fungi from the east coast of India. *Hydrobiologia*. 455: 41–53.

- Shearer, C.A., Descals, E., Kohlmeyer, B., Kohlmeyer, J., Marvanova, L., Padgett, D., Porter, D., Raja, H.A., Schmit, J.P., Thorton, H.A. and Voglymayr, H. 2007. Fungal biodiversity in aquatic habitats. *Biodiversity and Conservation*. 16: 49–67.
- Schulz, B., Boyle, C., Draeger, S., Rommert, A.K. and Krohn, K. 2002. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycological Research*. 106: 996-1004.
- Sherameti, I., Shahollari, B., Venus, Y., Altschmied, L., Varma, A. and Oelmüller, R. 2005. The endophytic fungus *Piriformospora indica* stimulates the expression of nitrate reductase and the starch-degrading enzyme glucan-water dikinase in tobacco and *Arabidopsis* roots through a homeodomain transcription factor that binds to a conserved motif in their promoters. *The Journal of Biological Chemistry*. 280: 26241-26247.
- Spatafora, J.W. and Blackwell, M. 1993. Molecular systematics of unitunicate perithecial ascomycetes: the Clavicipitales-Hypocreales connection. *Mycologia*. 85: 912-922
- Sridhar, K.R. 2004. Mangrove fungi in India. *Current Science*. 86: 1586-1587.
- Storck, R. 1996. Nucleotide Composition of Nucleic Acids of Fungi II. Deoxyribonucleic Acids. *Journal of Bacteriology*. 91: 227-230.
- Suryanarayanan, T.S., Kumaresan, V. and Johnson, J.A. 1998. Foliar endophytes from two species of the mangrove *Rhizophora*. *Canadian Journal of Microbiology*. 44:1003-1006.
- Swofford, D.L. 2002. PAUP, Phylogenetic analysis using parsimony version 4.0b10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Tan, R.X. and Zou, W.X. 2001. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural Product Report*. 18: 448-459.
- Tanaka, M., Yoshimura, M., Suto, M., Yokota, A., Asano, K., Sukara, E. and Tomita, F. 2002. Production of lipidimide by an endophytic fungus from polysaccharide extracted from *Abelmoschus* sp. identification of the product and the organism producing it. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 93: 531-536.
- Taylor, J.E., Hyde, K.D. and Jones, E.B.G. 1999. Endophytic fungi associated with the temperate palm, *Trachycarpus fortunei*, within and outside its natural geographic range. *New Phytologist*. 142: 335-346.

- Theantana, T., Hyde, K.D. and Lumyong, S. 2007. Asparaginase production by endophytic fungi isolated from some Thai medicinal plants. *KMITL Science and Technology Journal*. 7: 13-18.
- Torres, M., Dolcet, M.M., Sala, N. and Canela, R. 2003. Endophytic fungi associated with Mediterranean plants as a source of mycelium-bound lipase. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 51: 3328-3333.
- Umali, T.E., Quimio, T.H. and Hyde, K.D. 1999. Endophytic fungi in leaves of *Bambusa tuldoidea*. *Fungal Science*. 14: 11-18.
- Urairuj, C., Khanongnuch, C. and Lumyong, S., 2003. Ligninolytic enzymes from tropical endophytic Xylariaceae. *Fungal Diversity*. 13: 209-219.
- Wang, J.W., Wu, J.H. Huang, W.Y. and Tan, R.X. 2006. Laccase production by *Monotospora* sp., an endophytic fungus in *Cynodon dactylon*. *Bioresource Technology*. 97: 786-789.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J.W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, eds. Innis, M.A., Gelfand, D. H., Sninsky, J.J. and White, T.J. Academic Press, Inc.: New York. pp 315-322.
- Wiyakrutta, S., Sriubolmas, N., Panphut, W., Thongon, N., Danwisetkanjana, K., Ruangrungsri, N. and Meevootisom, V. 2004. Endophytic fungi with anti-microbial, anti-cancer and anti-malarial activities isolated from Thai medicinal plants. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 20: 265–272.
- Wu, R.Y. 1993. Studies on the microbial ecology of the Tansui Estuary. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*. 34: 13-30.
- Wu, X., Liu, X., Jiang, G., Lin, Y., Chan, W. and Vrijmoed, L.L.P. 2005. Xyloketal G, a novel metabolite from the mangrove fungus *Xylaria* sp. 2508. *Chemistry of Natural Compounds*. 41: 27–29.
- Yang, L.S., Huang, Y.J., Zheng, Z.H., Song, S.Y., Su, W.J., Sheng, Y.M. 2006. The population fluctuation and bioactivity of endophytic fungi from mangrove plants in different seasons. *Natural Science*. 45: 95–99.
- Yuan, K.P., Vrijmoed, L.L.P. and Feng, M.G. 2005. Survey of coastal mangrove fungi for xylanase production and optimized culture and assay conditions. *Acta Microbiologica Sinica*. 45: 91–96.

Zhang, W., Wendel, J.E. and Clark, L.G. 1997. Bamboozled again! inadvertent isolation of fungal rDNA sequences from bamboos (Poaceae: Bambusoideae). *Molecular Phylogenetic and Evolution*. 8: 205-217.

<http://www.wikipedia.org/wiki/%E0%B8%9B%E0%B9%88%E0%B8%B2%E0%B8%8A%E0%B8%B2%E0%B8%A2%E0%B9%80%E0%B8%A5%E0%B8%99> (Access date 12 Febury 2008)

<http://www.dmcg.go.th/st03/forest2.html> (Access date 12 Febury 2009)

<http://www.forest.go.th/stat/stat44/TAB3.htm> (Access date 12 Febury 2009)

<http://www.kmitl.ac.th/agritech/nutthakorn/sproject/patcharapong/mangroove/index.html>
(Access date 12 Febury 2008)

<http://www.talaythai.com/Education/42620260e/42620260e.php3> (Access date 23 Febury 2009)

<http://blogs.princeton.edu/chm333/f2005/group3/triglyceride.gif> (Access date 26 May 2009)

http://www.promma.ac.th/chemistry/biomolecule/Biomolecule039_files/image006.gif
(Access date 26 May 2009)

http://www.promma.ac.th/chemistry/biomolecule/Biomolecule039_files/image004.gif
(Access date 26 May 2009)

<http://www.cyberlipid.org/fa/acid0001.htm> (Access date 26 May 2009)

<http://www.aesop.rusger.edu/belangerlab/research.html> (Access date 19 Febury 2008)

http://www.aboutrtf.com/endophyte_seed.html (Access date 19 Febury 2008)

<http://www.lutzonilab.net/primers/image247> (Access date 26 April 2009)

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Potato dextrose agar อาหาร 500 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

Potato infusion	10.0	กรัม
Becto dextrose	10.0	กรัม
Agar	7.5	กรัม

2. Potato dextrose broth อาหาร 500 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

Potato infusion	10.0	กรัม
Becto dextrose	10.0	กรัม

3. Corn meal agar อาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

Corn meal	2.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Penosep	0.05	กรัม

ทำการเติมยาปฏิชีวนะ หลังจากฆ่าเชื้ออาหาร โดยรอกจนอุณหภูมิของอาหารเย็นลง เหลือประมาณ 45-50°C แล้วจึงเติมยาปฏิชีวนะลงไป เขย่าให้เข้ากัน แล้วจึงเทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

4. Tributyrin agar อาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

Peptone	5.0	กรัม
Yeast extract	3.0	กรัม
Agar	10.0	กรัม
Tributyrin	10.0	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากันโดยใช้ blender 1-3 นาที จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อที่ 121°C นาน 15 นาที แล้วจึงนำมาเทใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อ

5. CMC agar อาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

Yeast extract	0.1	กรัม
Peptone	0.5	กรัม

Agar	16.0	กรัม
CMC	5	กรัม

ผสมส่วนผสมให้เข้ากันโดยใช้ความร้อน จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อที่ 121°C นาน 15 นาที แล้วจึงนำมาเทใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อ

6. Soluble starch agar อาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

Yeast extract	0.1	กรัม
Peptone	0.5	กรัม
Agar	16.0	กรัม
Soluble starch	20	กรัม

ผสมส่วนผสมให้เข้ากันโดยใช้ความร้อน จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อที่ 121°C นาน 15 นาที แล้วจึงนำมาเทใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อ

7. Sodium caseinate agar อาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

Sodium caseinate	20	กรัม
K ₂ HPO ₄	0.2	กรัม
MgSO ₄	0.2	กรัม
FeSO ₄	ปริมาณเล็กน้อย	
Agar	15.0	กรัม

ผสมส่วนผสมให้เข้ากันโดยใช้ความร้อน จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อที่ 121°C นาน 15 นาที แล้วจึงนำมาเทใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อ

8. Rhodamine B agar อาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

Nutrient broth	8	กรัม
NaCl	4	กรัม
Agar	10	กรัม
น้ำมันมะกอก	30	มิลลิลิตร
Rhodamine B	0.010	กรัม

ผสมส่วนผสมให้เข้ากันโดยใช้ sonicator จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อที่ 121°C นาน 15 นาที แล้วจึงนำมาเทใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเหลวสำหรับทดสอบเอนไซม์

9. อาหารทดสอบเอนไซม์ lipase

อาหาร 1000 มิลลิลิตร ประกอบด้วย		
Peptone	5.0	กรัม
Yeast extract	3.0	กรัม
Tributyrin	10.0	มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นจนครบ 1000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ blender 1-3 นาที จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อที่ 121°C นาน 15 นาที แล้วจึงนำมาแบ่งใส่ขวดแบน ขวดละ 20 มิลลิลิตร

10. อาหารทดสอบเอนไซม์ cellulase

อาหาร 1000 มิลลิลิตร ประกอบด้วย		
CMC	10	กรัม
KH ₂ PO ₄	1.0	กรัม
KCl	0.5	กรัม
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2	กรัม
CaCl ₂	0.1	กรัม
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.54	กรัม
Yeast extract	0.5	กรัม

เติมน้ำกลั่นจนครบ 1000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อที่ 121°C นาน 15 นาที แล้วจึงนำมาแบ่งใส่ขวดแบน ขวดละ 20 มิลลิลิตร

การเตรียมสารเคมี

สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ทางชีวโมเลกุล

1. Tris EDTA (TE) buffer

เติม 1 M Tris HCl stock, pH 8.0 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และ 0.5 M EDTA, pH 8.0 ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ลงใน น้ำกลั่น ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อที่ 121°C นาน 15 นาที จากการเตรียมจะทำให้ได้ ความเข้มข้นสุดท้ายคือ 100 mM Tris HCl, pH 8.0 และ 1 mM EDTA, pH 8.0

2. 50X TAE buffer (Tris Acetate EDTA buffer)

เติม Tris base 242 กรัม และ glacial acetic acid ปริมาตร 57.1 มิลลิลิตร และ 0.5 M EDTA, pH 8.0 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 1000 มิลลิลิตร

3. 7.5 M Ammonium acetate

ละลาย ammonium acetate 11.562 กรัม ใน nanopure water ปริมาตร 20 มิลลิลิตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อที่ 121°C นาน 15 นาที

4. Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB) lysis buffer

เติม 5 M NaCl ปริมาตร 28 มิลลิลิตร, 10% CTAB ปริมาตร 20 มิลลิลิตร, 5 M Tris HCl ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และ 0.5 M EDTA ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วปรับ pH ให้ได้ 8.4 หลังจากนั้นปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 100 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่ 121°C นาน 15 นาที จะทำให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายคือ 100 mM Tris HCl, 1.4 M NaCl, 25 mM EDTA และ 2% CTAB

5. 1% Agrose gel

เติม agarose 1 กรัม ลงใน 1X TAE buffer 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปต้มจน agarose ละลาย แล้วจึงเท agarose ลงในถาดที่เตรียมไว้เพื่อให้ได้ gel ขนาดที่ต้องการ

6. การตรวจหาชิ้นส่วน DNA

ย้อม agarose gel ในสารละลาย ethidium bromide (ความเข้มข้นสุดท้าย 2.5×10^{-5} mg/มิลลิลิตร) เป็นเวลา 10-15 นาที ตรวจหาชิ้นส่วน DNA ภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง UV lighy transilluminator, Gel Documentation (Syngene Gene G enius) บันทึกความเข้มข้นและแถบที่เกิดขึ้น

7. 6X loading dye

ผสม 0.25% bromophenol blue กับ 0.25% xylene cyanol FF และ 30% glycerol เขย่าให้เข้ากัน แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C

สารเคมีสำหรับวิเคราะห์เอนไซม์

1. 0.1 M acetate buffer pH 5.0

เตรียมโดยผสมสารละลาย A และสารละลาย B ตาม pH ที่ต้องการ เมื่อ

สารละลาย A คือ 0.2 M acetic acid เตรียมโดยใช้ acetic acid ปริมาตร 11.5 มิลลิลิตร
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1000 มิลลิลิตร

สารละลาย B คือ 0.2 M sodium acetate เตรียมโดยชั่ง sodium acetate 16.40 กรัม
ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1000 มิลลิลิตร

0.1 M acetate buffer เตรียมโดยผสมสารละลาย A และสารละลาย B ตาม pH ที่
ต้องการ จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร

ตารางที่ 1ก อัตราส่วนการเตรียม acetate buffer pH ต่างๆ

สารละลาย A	สารละลาย B	pH
46.3	3.7	3.6
44.0	6.0	3.8
41.0	9.0	4.0
36.8	13.2	4.2
30.5	19.5	4.4
25.5	24.5	4.6
20.2	30.5	4.8
14.8	35.2	5.0
10.5	39.2	5.2
8.8	41.2	5.4
4.8	45.2	5.6

2. สารละลาย iodine ใน potassium iodide

ประกอบด้วย iodine 1 กรัม, potassium iodide (KI) 2 กรัม และน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร
เตรียมโดย ผสมคลุกเคล้า iodine และ potassium iodide ให้เข้ากันก่อน จากนั้นจึงเติมน้ำกลั่น

3. 2% congo red

ละลาย congo red 2 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

4. Somogyi reagent

ละลาย sodium potassium tartrate 12 กรัม และ Anhydrous sodium carbonate 24 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 250 มิลลิลิตร, ละลาย $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร จากนั้นเติม NaHCO_3 16 กรัม ละลายให้เข้ากัน, ละลาย anhydrous Na_2SO_4 180 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร นำไปต้มให้เดือด ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นผสมสารดังกล่าวข้างต้นเข้าด้วยกัน ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น เก็บไว้ในขวดสีชาเป็นเวลา 1 สัปดาห์ก่อนนำมาใช้

5. Nelson reagent

ละลาย ammonium molybdate 25 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 450 มิลลิลิตร, ละลาย $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 25 มิลลิลิตร ค่อยๆ เติม conc. H_2SO_4 ปริมาตร 21 มิลลิลิตร จากนั้นผสมสารดังกล่าวข้างต้นเข้าด้วยกัน ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น เก็บไว้ในขวดสีชาเป็นเวลา 1 สัปดาห์ก่อนนำมาใช้

6. การเตรียมสารละลาย 5% (w/v) cupric acetate-pyridine reagent

เตรียมโดยชั่ง cupric acetate ($\text{C}_4\text{H}_6\text{CuO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 5 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร กรองส่วนที่ไม่ละลายออก ปรับ pH ให้ได้เท่ากับ 6.1 โดยใช้ pyridine ปริมาตร ด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 100 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข

การเตรียมกราฟมาตรฐานและการวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Nelson-Samogyi

1. การเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐาน

เตรียมโดยชั่งกลูโคส 0.0020 กรัม แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายกลูโคสที่มีความเข้มข้น 200 $\mu\text{g/ml}$ จากนั้นนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 50, 100, 150 และ 200 $\mu\text{g/ml}$

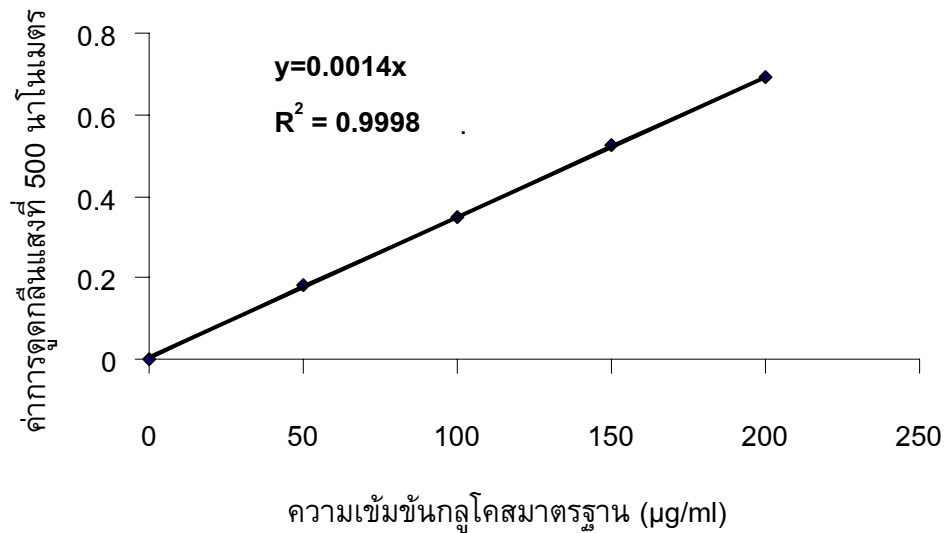
ตารางที่ 1ข การเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Nelson-Samogyi

หลอดที่	สารละลายกลูโคส (200 $\mu\text{g/ml}$) (ml)	น้ำกลั่น (ml)	สารละลายกลูโคส มาตรฐาน ($\mu\text{g/ml}$)
1	0	1	0
2	1	3	50
3	1	1	100
4	3	1	150
5	1	0	200

วิธีการวิเคราะห์

- หากกราฟมาตรฐาน โดยดูจุดสารละลายตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์หรือสารละลายกลูโคสมาตรฐานความเข้มข้น 50-200 $\mu\text{g/ml}$ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดสอบ ใช้ น้ำกลั่น เป็น blank
- เติม Somogyi reagent ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือด 10 นาที แล้วทำให้เย็นทันทีโดยแช่ในน้ำแข็ง
- เติม Nelson reagent ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันทิ้งไว้ 15 นาที
- เติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร

5. นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากสารละลายกลูโคสมาตรฐานไปเขียนกราฟเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสกับค่าการดูดกลืนแสงใช้เป็นกราฟมาตรฐาน



รูปที่ 1ข กราฟมาตรฐานกลูโคส

2. การเตรียมกราฟมาตรฐานของกรดบิวทิริก

การเตรียมสารละลายกรดบิวทิริก

ชั่งกรดบิวทิริก 0.2564 กรัม ละลายใน iso-octane ปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วย iso-octane จะได้กรดบิวทิริกเข้มข้น 10 ไมโครโมล/มิลลิลิตร

ตารางที่ 2ข การเตรียมสารละลายกรดบิวทิริกมาตรฐาน

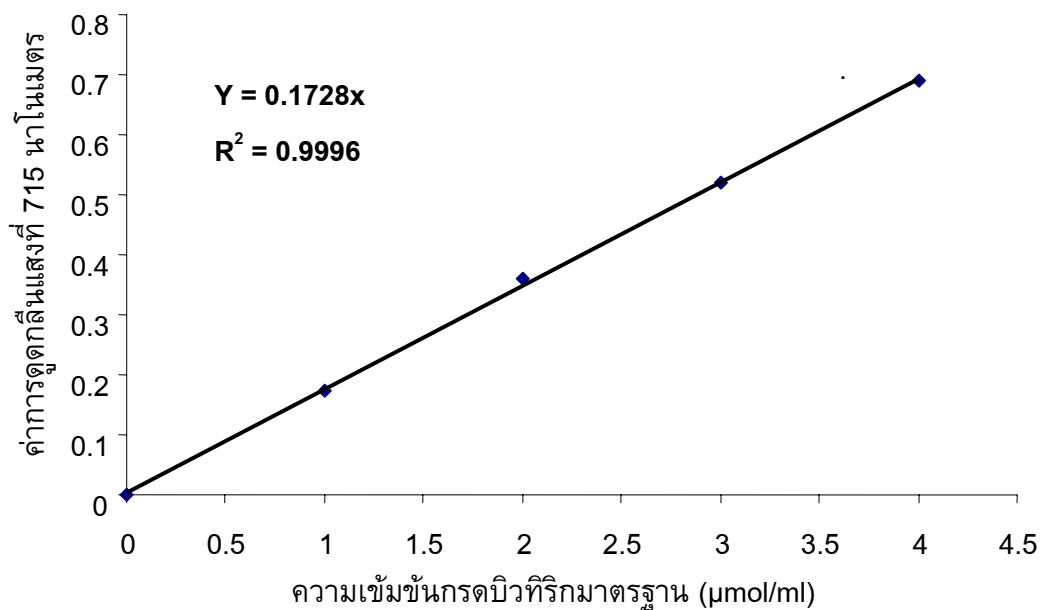
หลอดที่	สารละลายกรดบิวทิริก (10 µmol/ml) (ml)	น้ำกลั่น (ml)	สารละลายกรดบิวทิริกมาตรฐาน (µmol/ml)
1	0	1	0
2	0.1	0.9	1
3	0.2	0.8	2
4	0.3	0.7	3
5	0.4	0.6	4

วิธีการวิเคราะห์

1. ดูดสารละลายกรดบิวทิริกมาตรฐานความเข้มข้น 1-4 $\mu\text{mol/ml}$ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร
2. เติมสารละลาย 5% (w/v) cupric acetate-pyridine reagent ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทิ้งให้แยกชั้น
3. ดูดสารละลายชั้นบนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 715 นาโนเมตร โดยใช้ iso-octane เป็น Blank
4. นำข้อมูลที่ได้ไปเขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของกรดบิวทิริก
5. คำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

คำนวณค่ากิจกรรมจากสูตร

$$\text{Unit enzyme} = \frac{\text{ความเข้มข้นของกรดบิวทิริก}}{\text{ปริมาตรตัวอย่าง} \times \text{เวลา}}$$



รูปที่ 2ข กราฟมาตรฐานกรดบิวทิริก

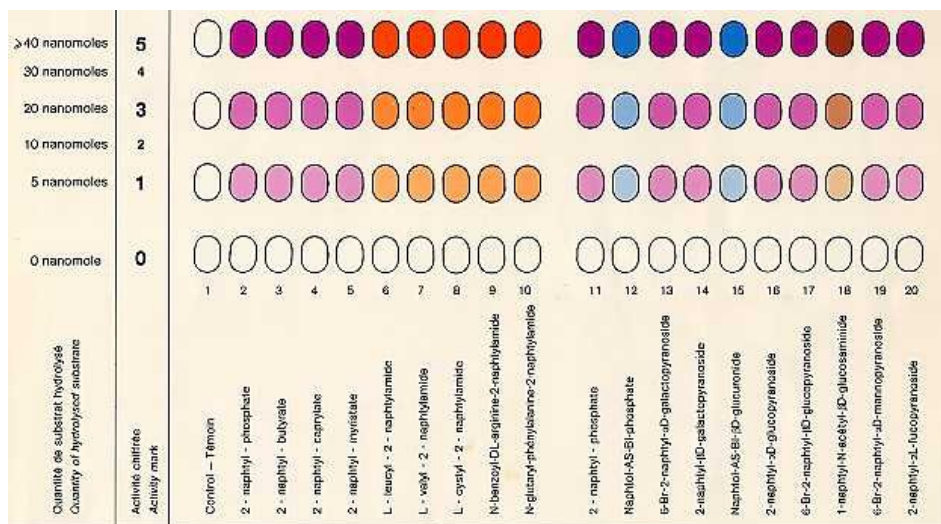
3. การหาน้ำหนักแห้ง

หาน้ำหนักกระทงก่อนโดยนำกระทง (กระดาษอลูมิเนียม) ที่เตรียมไว้มาอบ และชั่งจนน้ำหนักคงที่ จากนั้นนำเส้นใยของราที่ได้จากการกรองมาชั่งหาน้ำหนักสด แล้วนำไปอบที่ 95 °C ช้ามคืน แล้วชั่ง อย ต่อจนน้ำหนักคงที่ และจะได้น้ำหนักแห้งของเส้นใยรา ทุกครั้งที่ชั่งค่าที่ได้นำไปหักลบกับน้ำหนักกระทงเสมอ

$$\text{น้ำหนักแห้ง} = \text{น้ำหนักสด} - \text{น้ำหนักแห้ง}$$

4. การประเมินผลชุด API ZYM test kit

โดยการเทียบสีกับแผ่นเทียบสีที่แสดงถึงการสร้างเอนไซม์แต่ละชนิด



รูปที่ 3ค แผ่นมาตรฐานเทียบสีของชุด API ZYM test kit

ภาคผนวก ค

นิยามศัพท์ และคำอธิบายทางด้านสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

Phylogenetic tree

แผนภูมิที่แสดงถึงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของกลุ่มสิ่งมีชีวิต

Taxon (singular) และ Taxa (plural)

หน่วยย่อย หรือลักษณะนาม ที่ใช้เรียกในอนุกรมวิธาน หรือการวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ ซึ่งบ่งบอกถึงการจัดอยู่ในระดับของการจัดจำแนก

Branch length

ความยาวของแขนของ phylogenetic tree ซึ่งแสดงถึงจำนวนการเปลี่ยนแปลง หรือระดับความแตกต่างทางพันธุกรรม ที่เกิดขึ้นใน branch นั้นๆ โดยถ้ายาวมาก แสดงว่ามีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นมาก

Tree length

ผลรวมทั้งหมด ที่ได้จากความยาวของแขน phylogenetic tree แสดงถึงผลรวมของการเปลี่ยนแปลงลักษณะที่เกิดขึ้นในสายวิวัฒนาการ

Topology

ลักษณะและรูปแบบของ tree ที่แสดงความสัมพันธ์ของกลุ่มสิ่งมีชีวิต โดยเชื่อมโยงกันจากจุดเชื่อมต่อ (node) และแขนของ tree (branch)

Clade

กลุ่มของสิ่งมีชีวิตที่แสดงความใกล้ชิดกัน เนื่องจากมีความสัมพันธ์ร่วมกัน หรืออาจมีบรรพบุรุษเดียวกัน หรืออาจเรียกได้ว่า monophyletic group

Monophyletic group

กลุ่มของสิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะบางอย่างร่วมกัน พัฒนามาจากบรรพบุรุษร่วมกัน

Homoplasy

การที่สิ่งมีชีวิต มีลักษณะทางพันธุกรรม (genotype) แตกต่างกันแต่มีลักษณะแสดงออก (phenotype) เหมือนกัน

Ingroup

Taxa ของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการวิเคราะห์ถึงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

Outgroup

Taxa ของสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ที่นำมาใช้เปรียบเทียบกับ ingroup และเป็นกลุ่มที่คาดว่าวิวัฒนาการมาก่อน ingroup

Most parsimonious tree (MPT)

เป็น phylogenetic tree ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี maximum parsimony ซึ่งอาจมีจำนวนมากกว่า 1 tree ที่แสดงถึงความเปลี่ยนแปลงทางวิวัฒนาการน้อยที่สุด

Kishino-Hasekawa Test (K-H test)

การวิเคราะห์ทางสถิติ ที่ใช้ในการเลือก most parsimonious tree ที่มี topology เหมาะสมที่สุด (best tree)

Total character

ลักษณะรวมทั้งหมด เมื่อทำการวิเคราะห์ทางสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ประกอบด้วย 3 ลักษณะคือ

Constant character

ลักษณะของ character ที่มีความเหมือนกัน ไม่มีการเปลี่ยนแปลง

Parsimony informative character

ลักษณะของ character ที่มีความแตกต่างกัน ในชุดข้อมูลอย่างน้อย 2 characters จึงนำไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ โดยวิธี maximum parsimony

Parsimony uninformative character

ลักษณะของ character ที่แตกต่างกัน ในชุดข้อมูลและไม่นำมาวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการโดยวิธี maximum parsimony

Consistency index (CI) (Lipscomb, 1998)

ดัชนีที่ใช้วัดจำนวนของ homoplasy หรือบอกถึงระดับการเข้ากันได้ของข้อมูล และ phylogenetic tree ซึ่งจะมีค่าตั้งแต่ 0-1 ซึ่ง 1 หมายถึง ไม่มี homoplasy ค่าดัชนี CI คำนวณได้จาก

$$CI = \frac{\text{Total character state changes expected}}{\text{Total tree length}}$$

Retention index (RI) (Lipscomb, 1998)

ดัชนีที่ใช้บอกสัดส่วนของ synapomorphy (ลักษณะที่พัฒนาไปร่วมกัน) ที่พบบน phylogenetic tree โดยมีค่าตั้งแต่ 0-1 ซึ่ง 1 หมายถึง ไม่มี homoplasy ค่าดัชนี RI คำนวณได้จาก

$$RI = \frac{\text{Maximum possible tree length} - \text{number of character state changes on the tree}}{\text{Maximum possible tree length} - \text{number of character state changes in the data}}$$

ค่าความเชื่อมั่น bootstrap

ค่าความเชื่อมั่นที่ได้จากการคำนวณทางสถิติ โดยทำการสร้างชุดข้อมูลใหม่ แล้วทำการวิเคราะห์ซ้ำประมาณ 100-1,000 ครั้ง (หรืออาจมากกว่า) เพื่อคำนวณร้อยละ ของการจัดกลุ่มของสิ่งมีชีวิตแต่ละ taxa

ตารางที่ 1ค รายละเอียดของเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกจากพืชป่าชายเลน โดย
น.ส.จิรายุ บัวทอง

No.	Code	New code	แยกจากพืชสกุล	ชื่อภาษาไทย	แยกจากส่วน	สถานที่เก็บตัวอย่าง
1	BAO4	MA1	<i>Avicennia officinalis</i>	แสมดำ	branch	หาดบางคิลา จ. สตูล
2	BAO5	MA2	<i>Avicennia officinalis</i>	แสมดำ	branch	หาดบางคิลา จ. สตูล
3	BAO6	MA3	<i>Avicennia officinalis</i>	แสมดำ	branch	หาดบางคิลา จ. สตูล
4	BAO8	MA4	<i>Avicennia officinalis</i>	แสมดำ	branch	หาดบางคิลา จ. สตูล
5	DAL1	MA5	<i>Avicennia alba</i>	แสมขาว	midrib	หาดปากเมง จ. ตรัง
6	DAL2	MA6	<i>Avicennia alba</i>	แสมขาว	vein	หาดปากเมง จ. ตรัง
7	DAL7	MA7	<i>Avicennia alba</i>	แสมขาว	midrib	หาดปากเมง จ. ตรัง
8	DAO1	MA8	<i>Avicennia officinalis</i>	แสมดำ	midrib	อ.ดอนสัก จ.สุราษฎร์ธานี
9	DAO2	MA9	<i>Avicennia officinalis</i>	แสมดำ	petiole	อ.ดอนสัก จ.สุราษฎร์ธานี
10	DAO3	MA10	<i>Avicennia officinalis</i>	แสมดำ	petiole	อ.ดอนสัก จ.สุราษฎร์ธานี
11	DAO4	MA11	<i>Avicennia officinalis</i>	แสมดำ	midrib	อ.ดอนสัก จ.สุราษฎร์ธานี
12	DAO5	MA12	<i>Avicennia officinalis</i>	แสมดำ	lamina	อ.ดอนสัก จ.สุราษฎร์ธานี
13	DRM1	MA13	<i>Rhizophora mucronata</i>	โกงกางใบใหญ่	branch	อ.ดอนสัก จ.สุราษฎร์ธานี
14	DRM2	MA14	<i>Rhizophora mucronata</i>	โกงกางใบใหญ่	branch	อ.ดอนสัก จ.สุราษฎร์ธานี
15	DSC1	MA15	<i>Sonneratia caseolaris</i>	ลำพู	petiole	บ้านแหลมโพธิ์ จ. สงขลา
16	DSC2	MA16	<i>Sonneratia caseolaris</i>	ลำพู	branch	บ้านแหลมโพธิ์ จ. สงขลา
17	DSC3	MA17	<i>Sonneratia caseolaris</i>	ลำพู	midrib	บ้านแหลมโพธิ์ จ. สงขลา
18	DXM1	MA18	<i>Xylocarpus moluccensis</i>	ตะบูนดำ	vein	อ.ดอนสัก จ.สุราษฎร์ธานี
19	DXM2	MA19	<i>Xylocarpus moluccensis</i>	ตะบูนดำ	branch	อ.ดอนสัก จ.สุราษฎร์ธานี
20	DXM5	MA20	<i>Xylocarpus moluccensis</i>	ตะบูนดำ	vain	บ้านคลองลิติ อ.ท่าแพ จ. สตูล
21	HSC11	MA21	<i>Sonneratia caseolaris</i>	ลำพู	branch	บ้านแหลมโพธิ์ จ. สงขลา
22	HSC34	MA22	<i>Sonneratia caseolaris</i>	ลำพู	vein	บ้านแหลมโพธิ์ จ. สงขลา
23	KBC2	MA23	<i>Bruguiera cylindrica</i>	ถั่วขาว	midrib	ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งสุราษฎร์ธานี
24	KBC3	MA24	<i>Bruguiera cylindrica</i>	ถั่วขาว	midrib	ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งสุราษฎร์ธานี
25	KBP11	MA25	<i>Bruguiera parviflora</i>	ถั่วดำ	midrib	บ้านคลองลิติ อ.ท่าแพ จ. สตูล
26	KBP17	MA26	<i>Bruguiera parviflora</i>	ถั่วดำ	branch	ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งสุราษฎร์ธานี
27	KBP2	MA27	<i>Bruguiera parviflora</i>	ถั่วดำ	branch	ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งสุราษฎร์ธานี
28	KBP25	MA28	<i>Bruguiera parviflora</i>	ถั่วดำ	lamina	ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งสุราษฎร์ธานี
29	KBP3	MA29	<i>Bruguiera parviflora</i>	ถั่วดำ	midrib	ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งสุราษฎร์ธานี

ตารางที่ 1ค (ต่อ) รายละเอียดของเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกจากพืชป่าชายเลน โดย
น.ส.จิรายุ บัวทอง

No.	Code	New code	แยกจากพืชสกุล	ชื่อภาษาไทย	แยกจากส่วน	สถานที่เก็บตัวอย่าง
30	KBP4	MA30	<i>Bruguiera parviflora</i>	ถั่วดำ	branch	ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งสุราษฎร์ธานี
31	KBP5	MA31	<i>Bruguiera parviflora</i>	ถั่วดำ	lamina	บ้านคลองลิติ อ.ท่าแพ จ. สตูล
32	KBP6	MA32	<i>Bruguiera parviflora</i>	ถั่วดำ	vein	ชายฝั่งสุราษฎร์ธานี จ.สุราษฎร์ธานี
33	KBP7	MA33	<i>Bruguiera parviflora</i>	ถั่วดำ	branch	ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งสุราษฎร์ธานี
34	KBP8	MA129	<i>Bruguiera parviflora</i>	ถั่วดำ	branch	บ้านคลองลิติ อ.ท่าแพ จ. สตูล
35	KBP9	MA35	<i>Bruguiera parviflora</i>	ถั่วดำ	branch	ชายฝั่งสุราษฎร์ธานี จ.สุราษฎร์ธานี
36	KRA13	MA36	<i>Rhizophora apiculata</i>	โกงกางใบเล็ก	branch	ต. คลองแห อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา
37	KRA14	MA37	<i>Rhizophora apiculata</i>	โกงกางใบเล็ก	vein	ต. คลองแห อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา
38	KRA15	MA38	<i>Rhizophora apiculata</i>	โกงกางใบเล็ก	vein	ต. คลองแห อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา
39	KRA16	MA39	<i>Rhizophora apiculata</i>	โกงกางใบเล็ก	midrib	ต. คลองแห อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา
40	KRA26	MA40	<i>Rhizophora apiculata</i>	โกงกางใบเล็ก	lamina	ต. คลองแห อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา
41	KRA27	MA41	<i>Rhizophora apiculata</i>	โกงกางใบเล็ก	lamina	ต. คลองแห อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา
42	KRA30	MA42	<i>Rhizophora apiculata</i>	โกงกางใบเล็ก	larmina	ต. คลองแห อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา
43	KRA35	MA43	<i>Rhizophora apiculata</i>	โกงกางใบเล็ก	branch	ต. คลองแห อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา
44	KRA36	MA44	<i>Rhizophora apiculata</i>	โกงกางใบเล็ก	branch	ต. คลองแห อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา
45	KRA4	MA45	<i>Rhizophora apiculata</i>	โกงกางใบเล็ก	lamina	ต. คลองแห อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา
46	KRA49	MA46	<i>Rhizophora apiculata</i>	โกงกางใบเล็ก	petiole	ต. คลองแห อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา
47	KRA53	MA47	<i>Rhizophora apiculata</i>	โกงกางใบเล็ก	petiole	ต. คลองแห อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา
48	KRA8	MA48	<i>Rhizophora apiculata</i>	โกงกางใบเล็ก	vein	ต. คลองแห อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา

ตารางที่ 1ค (ต่อ) รายละเอียดของเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกจากพืชป่าชายเลน โดย
น.ส.จิรายุ บัวทอง

No.	Code	New code	แยกจากพืชสกุล	ชื่อภาษาไทย	แยกจากส่วน	สถานที่เก็บตัวอย่าง
49	KRA9	MA49	<i>Rhizophora apiculata</i>	โก่งกางใบเล็ก	vein	ต. คลองแห อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา
50	KRM1	MA50	<i>Rhizophora mucronata</i>	โก่งกางใบใหญ่	laminar	ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งสุราษฎร์ธานี
51	KRM2	MA51	<i>Rhizophora mucronata</i>	โก่งกางใบใหญ่	petiole	ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งสุราษฎร์ธานี
52	KRM4	MA52	<i>Rhizophora mucronata</i>	โก่งกางใบใหญ่	vein	ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งสุราษฎร์ธานี
53	KRM5	MA53	<i>Rhizophora mucronata</i>	โก่งกางใบใหญ่	vein	ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งสุราษฎร์ธานี
54	KRM6	MA54	<i>Rhizophora mucronata</i>	โก่งกางใบใหญ่	vein	ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งสุราษฎร์ธานี
55	KRM7	MA55	<i>Rhizophora mucronata</i>	โก่งกางใบใหญ่	vein	ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งสุราษฎร์ธานี
56	KSO3	MA56	<i>Sonneratia ovata</i>	ลำแพน	midrib	ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งสุราษฎร์ธานี
57	KSO5	MA57	<i>Sonneratia ovata</i>	ลำแพน	vein	ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งสุราษฎร์ธานี
58	KSO7	MA58	<i>Sonneratia ovata</i>	ลำแพน	vein	ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งสุราษฎร์ธานี
59	KSO9	MA59	<i>Sonneratia ovata</i>	ลำแพน	midrib	ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งสุราษฎร์ธานี
60	LAL6	MA60	<i>Avicennia alba</i>	แสมขาว	branch	บ้านคลองลิติ อ.ท่าแพ จ. สตูล
61	LBP10	MA62	<i>Bruguiera parviflora</i>	ถั่วดำ	petiole	บ้านคลองลิติ อ.ท่าแพ จ. สตูล
62	LBP7	MA63	<i>Bruguiera parviflora</i>	ถั่วดำ	vein	บ้านคลองลิติ อ.ท่าแพ จ. สตูล
63	LBP8	MA64	<i>Bruguiera parviflora</i>	ถั่วดำ	vein	บ้านคลองลิติ อ.ท่าแพ จ. สตูล
64	LSH5	MA65	<i>Soyphiphora hydrophyllacea</i>	สีง้ำ	vein	บ้านคลองลิติ อ.ท่าแพ จ. สตูล
65	LLT16	MA66	<i>Lumnitzera littorea</i>	ฝาดดอกแดง	branch	บ้านคลองลิติ อ.ท่าแพ จ. สตูล
66	LLT17	MA67	<i>Lumnitzera littorea</i>	ฝาดดอกแดง	branch	บ้านคลองลิติ อ.ท่าแพ จ. สตูล

ตารางที่ 1ค (ต่อ) รายละเอียดของเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกจากพืชป่าชายเลน โดย
น.ส.จิรายุ บัวทอง

No.	Code	New code	แยกจากพืชสกุล	ชื่อภาษาไทย	แยกจากส่วน	สถานที่เก็บตัวอย่าง
67	LRA7	MA68	<i>Rhizophora apiculata</i>	โกนกกางใบเล็ก	branch	บ้านคลองลิติ อ.ท่าแพ จ. สตูล
68	LRA8	MA69	<i>Rhizophora apiculata</i>	โกนกกางใบเล็ก	branch	บ้านคลองลิติ อ.ท่าแพ จ. สตูล
69	LRA9	MA70	<i>Rhizophora apiculata</i>	โกนกกางใบเล็ก	branch	บ้านคลองลิติ อ.ท่าแพ จ. สตูล
70	LSH3	MA71	<i>Soyphiphora hydrophyllacea</i>	สี้ง่า	branch	บ้านคลองลิติ อ.ท่าแพ จ. สตูล
71	LSH4	MA72	<i>Soyphiphora hydrophyllacea</i>	สี้ง่า	vein	บ้านคลองลิติ อ.ท่าแพ จ. สตูล
72	LXG2	MA73	<i>Xylocarpus granatum</i>	ตะบูนขาว	branch	บ้านคลองลิติ อ.ท่าแพ จ. สตูล
73	LXG3	MA74	<i>Xylocarpus granatum</i>	ตะบูนขาว	lamina	บ้านคลองลิติ อ.ท่าแพ จ. สตูล
74	LXG8	MA75	<i>Xylocarpus granatum</i>	ตะบูนขาว	branch	บ้านคลองลิติ อ.ท่าแพ จ. สตูล
75	LXM26	MA76	<i>Xylocarpus moluccensis</i>	ตะบูนดำ	vein	บ้านคลองลิติ อ.ท่าแพ จ. สตูล
76	LXM30	MA77	<i>Xylocarpus moluccensis</i>	ตะบูนดำ	vein	บ้านคลองลิติ อ.ท่าแพ จ. สตูล
77	NRA11	MA78	<i>Rhizophora apiculata</i>	โกนกกางใบเล็ก	branch	สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 36 จ. สตูล
78	TAL10	MA79	<i>Avicennia alba</i>	แสมขาว	lamina	หาดปากเมง จ. ตรัง
79	TAL2	MA80	<i>Rhizophora apiculata</i>	โกนกกางใบเล็ก	midrib	หาดปากเมง จ. ตรัง
80	TAL6	MA81	<i>Avicennia alba</i>	แสมขาว	midrib	หาดปากเมง จ. ตรัง
81	TAL8	MA82	<i>Avicennia alba</i>	แสมขาว	lamina	หาดปากเมง จ. ตรัง
82	TRA11	MA84	<i>Rhizophora apiculata</i>	โกนกกางใบเล็ก	branch	หาดปากเมง จ. ตรัง
83	TRA12	MA85	<i>Rhizophora apiculata</i>	โกนกกางใบเล็ก	branch	หาดปากเมง จ. ตรัง
84	TRA13	MA86	<i>Rhizophora apiculata</i>	โกนกกางใบเล็ก	branch	หาดปากเมง จ. ตรัง
85	TRA15	MA87	<i>Rhizophora apiculata</i>	โกนกกางใบเล็ก	vein	หาดปากเมง จ. ตรัง
86	TRA16	MA88	<i>Rhizophora apiculata</i>	โกนกกางใบเล็ก	midrib	หาดปากเมง จ. ตรัง
87	TRA17	MA89	<i>Rhizophora apiculata</i>	โกนกกางใบเล็ก	lamina	หาดปากเมง จ. ตรัง
88	TRA19	MA90	<i>Rhizophora apiculata</i>	โกนกกางใบเล็ก	midrib	หาดปากเมง จ. ตรัง
89	TRA2	MA91	<i>Rhizophora apiculata</i>	โกนกกางใบเล็ก	vein	หาดปากเมง จ. ตรัง
90	TRA20	MA92	<i>Rhizophora apiculata</i>	โกนกกางใบเล็ก	branch	หาดปากเมง จ. ตรัง
91	TRA23	MA93	<i>Rhizophora apiculata</i>	โกนกกางใบเล็ก	vein	หาดปากเมง จ. ตรัง

ตารางที่ 1ค (ต่อ) รายละเอียดของเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกจากพืชป่าชายเลน โดย
น.ส.จิรายุ บัวทอง

No.	Code	New code	แยกจากพืชสกุล	ชื่อภาษาไทย	แยกจากส่วน	สถานที่เก็บตัวอย่าง
92	TRA25	MA94	<i>Rhizophora apiculata</i>	โก่งกางใบเล็ก	lamina	หาดปากเมง จ. ตรัง
93	TRA26	MA95	<i>Rhizophora apiculata</i>	โก่งกางใบเล็ก	branch	หาดปากเมง จ. ตรัง
94	TRA28	MA96	<i>Rhizophora apiculata</i>	โก่งกางใบเล็ก	branch	หาดปากเมง จ. ตรัง
95	TRA3	MA97	<i>Rhizophora apiculata</i>	โก่งกางใบเล็ก	petiole	หาดปากเมง จ. ตรัง
96	TRA30	MA98	<i>Rhizophora apiculata</i>	โก่งกางใบเล็ก	branch	หาดปากเมง จ. ตรัง
97	TRA32	MA99	<i>Rhizophora apiculata</i>	โก่งกางใบเล็ก	branch	หาดปากเมง จ. ตรัง
98	TRA33	MA100	<i>Rhizophora apiculata</i>	โก่งกางใบเล็ก	vein	หาดปากเมง จ. ตรัง
99	TRA4	MA101	<i>Rhizophora apiculata</i>	โก่งกางใบเล็ก	branch	หาดปากเมง จ. ตรัง
100	TRA7	MA102	<i>Rhizophora apiculata</i>	โก่งกางใบเล็ก	lamina	หาดปากเมง จ. ตรัง
101	TRA8	MA103	<i>Rhizophora apiculata</i>	โก่งกางใบเล็ก	branch	หาดปากเมง จ. ตรัง
102	BAO7	MA104	<i>Avicennia officinalis</i>	แสมดำ	petiole	หาดบางศิลา จ. สตูล
103	KBP1	MA105	<i>Bruguiera parviflora</i>	ถั่วดำ	branch	ชายฝั่งสุราษฎร์ธานี จ.สุราษฎร์ธานี
104	LAL8	MA107	<i>Avicennia alba</i>	แสมขาว	vein	บ้านคลองลิติ อ.ท่าแพ จ. สตูล
105	HRA70	MA109	<i>Rhizophora apiculata</i>	โก่งกางใบเล็ก	branch	บ้านแหลมโพธิ์ จ. สงขลา
106	HRA69	MA110	<i>Rhizophora apiculata</i>	โก่งกางใบเล็ก	branch	บ้านแหลมโพธิ์ จ. สงขลา
107	HRA65	MA111	<i>Rhizophora apiculata</i>	โก่งกางใบเล็ก	petiole	บ้านแหลมโพธิ์ จ. สงขลา
108	LRM9	MA112	<i>Rhizophora mucronata</i>	โก่งกางใบใหญ่	branch	บ้านคลองลิติ อ.ท่าแพ จ. สตูล
109	LRM15	MA113	<i>Rhizophora mucronata</i>	โก่งกางใบใหญ่	branch	บ้านคลองลิติ อ.ท่าแพ จ. สตูล
110	LRA12	MA114	<i>Rhizophora apiculata</i>	โก่งกางใบเล็ก	vein	บ้านคลองลิติ อ.ท่าแพ จ. สตูล
111	LRM25	MA115	<i>Rhizophora mucronata</i>	โก่งกางใบใหญ่	midrib	บ้านคลองลิติ อ.ท่าแพ จ. สตูล
112	LLT6	MA116	<i>Lumnitzera littorea</i>	ฝาดดอกแดง	branch	บ้านคลองลิติ อ.ท่าแพ จ. สตูล
113	LLT14	MA117	<i>Lumnitzera littorea</i>	ฝาดดอกแดง	lamina	บ้านคลองลิติ อ.ท่าแพ จ. สตูล
114	LRM16	MA118	<i>Rhizophora mucronata</i>	โก่งกางใบใหญ่	branch	บ้านคลองลิติ อ.ท่าแพ จ. สตูล
115	LRM24	MA119	<i>Rhizophora mucronata</i>	โก่งกางใบใหญ่	branch	บ้านคลองลิติ อ.ท่าแพ จ. สตูล
116	NRM37	MA120	<i>Rhizophora mucronata</i>	โก่งกางใบใหญ่	branch	สถานีพัฒนาทรัพยากรป่า ชายเลนที่ 36 จ. สตูล

ตารางที่ 1ค (ต่อ) รายละเอียดของเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกจากพืชป่าชายเลน โดย
น.ส.จิรายุ บัวทอง

No.	Code	New code	แยกจากพืชสกุล	ชื่อภาษาไทย	แยกจากส่วน	สถานที่เก็บตัวอย่าง
117	NRM19	MA121	<i>Rhizophora mucronata</i>	โกนกงใบใหญ่	branch	สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 36 จ. สตูล
118	NRM32	MA122	<i>Rhizophora mucronata</i>	โกนกงใบใหญ่	midrib	สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 36 จ. สตูล
119	NRM20	MA123	<i>Rhizophora mucronata</i>	โกนกงใบใหญ่	branch	สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 36 จ. สตูล
120	NXG11	MA124	<i>Xylocarpus granatum</i>	ตะบูนขาว	branch	สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 36 จ. สตูล
121	NXG17	MA125	<i>Xylocarpus granatum</i>	ตะบูนขาว	branch	สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 36 จ. สตูล
122	NRM17	MA126	<i>Rhizophora mucronata</i>	โกนกงใบใหญ่	branch	สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 36 จ. สตูล
123	NXG14	MA127	<i>Xylocarpus granatum</i>	ตะบูนขาว	midrib	สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 36 จ. สตูล
124	NRM22	MA128	<i>Rhizophora mucronata</i>	โกนกงใบใหญ่	branch	สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 36 จ. สตูล
125	NXG21	MA130	<i>Xylocarpus granatum</i>	ตะบูนขาว	midrib	สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 36 จ. สตูล
126	DAL11	MA131	<i>Avicennia alba</i>	แสมขาว	petiole	หาดปากเมง จ. ตรัง
127	DRM3	MA132	<i>Rhizophora mucronata</i>	โกนกงใบใหญ่	branch	อ.ดอนสัก จ.สุราษฎร์ธานี
128	DAL4	MA133	<i>Avicennia alba</i>	แสมขาว	midrib	หาดปากเมง จ. ตรัง
129	DAL6	MA134	<i>Avicennia alba</i>	แสมขาว	lamina	หาดปากเมง จ. ตรัง
130	DAL10	MA135	<i>Avicennia alba</i>	แสมขาว	petiole	หาดปากเมง จ. ตรัง
131	DAL5	MA136	<i>Avicennia alba</i>	แสมขาว	vein	หาดปากเมง จ. ตรัง
132	LRA18	MA137	<i>Rhizophora mucronata</i>	โกนกงใบใหญ่	branch	บ้านคลองลิติ อ.ท่าแพ จ. สตูล
133	LRM22	MA139	<i>Rhizophora mucronata</i>	โกนกงใบใหญ่	petiole	บ้านคลองลิติ อ.ท่าแพ จ. สตูล
134	NXG16	MA140	<i>Xylocarpus granatum</i>	ตะบูนขาว	vein	สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 36 จ. สตูล
135	NXG13	MA141	<i>Xylocarpus granatum</i>	ตะบูนขาว	midrib	สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 36 จ. สตูล
136	NRM34	MA142	<i>Rhizophora mucronata</i>	โกนกงใบใหญ่	petiole	สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 36 จ. สตูล
137	LRA11	MA143	<i>Rhizophora apiculata</i>	โกนกงใบเล็ก	petiole	บ้านคลองลิติ อ.ท่าแพ จ. สตูล
138	NXG23	MA144	<i>Xylocarpus granatum</i>	ตะบูนขาว	vein	สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 36 จ. สตูล

ตารางที่ 1ค (ต่อ) รายละเอียดของเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกจากพืชป่าชายเลน โดย
น.ส.จิรายุ บัวทอง

No.	Code	New code	แยกจากพืชสกุล	ชื่อภาษาไทย	แยกจากส่วน	สถานที่เก็บตัวอย่าง
139	NRM31	MA145	<i>Rhizophora mucronata</i>	โกงกางใบใหญ่	midrib	สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 36 จ. สตูล
140	NRM35	MA146	<i>Rhizophora mucronata</i>	โกงกางใบใหญ่	petiole	สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 36 จ. สตูล
141	TRA9	MA147	<i>Rhizophora apiculata</i>	โกงกางใบเล็ก	midrib	หาดปากเมง จ. ตรัง
142	DAL9	MA148	<i>Avicennia alba</i>	แสมขาว	midrib	หาดปากเมง จ. ตรัง
143	DAL12	MA149	<i>Avicennia alba</i>	แสมขาว	lamina	หาดปากเมง จ. ตรัง
144	NLT10	MA150	<i>Lumnitzera littorea</i>	ฝาดดอกแดง	vein	สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 36 จ. สตูล
145	NLT2	MA153	<i>Lumnitzera littorea</i>	ฝาดดอกแดง	branch	สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 36 จ. สตูล
146	TAL1	MA151	<i>Avicennia alba</i>	แสมขาว	midrib	หาดปากเมง จ. ตรัง
147	TAL4	MA152	<i>Avicennia alba</i>	แสมขาว	midrib	หาดปากเมง จ. ตรัง
148	NLT2	MA153	<i>Lumnitzera littorea</i>	ฝาดดอกแดง	midrib	สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 36 จ. สตูล
149	NAC8	MA154	<i>Aegiceras conniculatum</i>	เล็บมือนาง	branch	สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 36 จ. สตูล
150	LBG1	MA155	<i>Bruguiera gymnorhiza</i>	พังกาหัวส้ม	branch	บ้านคลองลิติ อ.ท่าแพ จ. สตูล
151	NLT21	MA156	<i>Lumnitzera littorea</i>	ฝาดดอกแดง	midrib	สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 36 จ. สตูล
152	NLT11	MA157	<i>Lumnitzera littorea</i>	ฝาดดอกแดง	branch	สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 36 จ. สตูล
153	NLT14	MA158	<i>Lumnitzera littorea</i>	ฝาดดอกแดง	petiole	สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 36 จ. สตูล
154	TRA14	MA159	<i>Rhizophora apiculata</i>	โกงกางใบเล็ก	branch	หาดปากเมง จ. ตรัง
155	NLT4	MA160	<i>Lumnitzera littorea</i>	ฝาดดอกแดง	branch	สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 36 จ. สตูล
156	LXM28	MA161	<i>Xylocarpus moluccensis</i>	ตะบูนดำ	midrib	บ้านคลองลิติ อ.ท่าแพ จ. สตูล
157	NLT6	MA163	<i>Lumnitzera littorea</i>	ฝาดดอกแดง	midrib	สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 36 จ. สตูล
158	NSH8	MA164	<i>Soyphiphorahy drophyllacea</i>	สีง้ำ	branch	สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 36 จ. สตูล
159	NAC2	MA165	<i>Aegiceras conniculatum</i>	เล็บมือนาง	midrib	สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 36 จ. สตูล
160	TRA18	MA166	<i>Rhizophora apiculata</i>	โกงกางใบเล็ก	lamina	หาดปากเมง จ. ตรัง

ตารางที่ 1ค (ต่อ) รายละเอียดของเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกจากพืชป่าชายเลน โดย
น.ส.จิรายุ บัวทอง

No.	Code	New code	แยกจากพืชสกุล	ชื่อภาษาไทย	แยกจากส่วน	สถานที่เก็บตัวอย่าง
161	NSH13	MA167	<i>Soyphiphora hydrophyllacea</i>	สีง้ำ	midrib	สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 36 จ. สตูล
162	TRA22	MA169	<i>Rhizophora apiculata</i>	โก่งกางใบเล็ก	branch	หาดปากเมง จ. ตรัง
163	NAC3	MA170	<i>Aegiceras conniculatum</i>	เล็บมือนาง	branch	สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 36 จ. สตูล
164	NLT8	MA171	<i>Lumnitzera littorea</i>	ผาดดอกแดง	laminar	สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 36 จ. สตูล
165	TRA29	MA172	<i>Rhizophora apiculata</i>	โก่งกางใบเล็ก	laminar	หาดปากเมง จ. ตรัง
166	TRA24	MA173	<i>Rhizophora apiculata</i>	โก่งกางใบเล็ก	vein	หาดปากเมง จ. ตรัง
167	LXM29	MA174	<i>Xylocarpus moluccensis</i>	ตะบูนดำ	branch	บ้านคลองลิติ อ.ท่าแพ จ. สตูล
168	LXM16	MA175	<i>Xylocarpus moluccensis</i>	ตะบูนดำ	vein	บ้านคลองลิติ อ.ท่าแพ จ. สตูล
169	NLT7	MA176	<i>Lumnitzera littorea</i>	ผาดดอกแดง	midrib	สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 36 จ. สตูล
170	NSH16	MA177	<i>Soyphiphora hydrophyllacea</i>	สีง้ำ	vein	สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 36 จ. สตูล
171	NSH14	MA178	<i>Soyphiphora hydrophyllacea</i>	สีง้ำ	lamina	สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 36 จ. สตูล
172	NSH4	MA179	<i>Soyphiphora hydrophyllacea</i>	สีง้ำ	branch	สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 36 จ. สตูล
173	LBG2	MA180	<i>Bruguiera gymnorrhiza</i>	พังกาหัวสุม	midrib	บ้านคลองลิติ อ.ท่าแพ จ. สตูล
174	KRA3	MA185	<i>Rhizophora apiculata</i>	โก่งกางใบเล็ก	vein	หาดปากเมง จ. ตรัง
175	KRA6	MA186	<i>Rhizophora apiculata</i>	โก่งกางใบเล็ก	branch	ต. คลองแห อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา
176	KRA7	MA187	<i>Rhizophora apiculata</i>	โก่งกางใบเล็ก	vein	ต. คลองแห อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา
177	KRA11	MA188	<i>Rhizophora apiculata</i>	โก่งกางใบเล็ก	vein	ต. คลองแห อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา
178	KRA12	MA189	<i>Rhizophora apiculata</i>	โก่งกางใบเล็ก	branch	ต. คลองแห อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา
179	KRA18	MA190	<i>Rhizophora apiculata</i>	โก่งกางใบเล็ก	petiole	ต. คลองแห อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา
180	KRA20	MA191	<i>Rhizophora apiculata</i>	โก่งกางใบเล็ก	vein	ต. คลองแห อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา
181	KRA24	MA192	<i>Rhizophora apiculata</i>	โก่งกางใบเล็ก	midrib	ต. คลองแห อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา

ตารางที่ 1ค (ต่อ) รายละเอียดของเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกจากพืชป่าชายเลน โดย

น.ส.จิรายุ บัวทอง

No.	Code	New code	แยกจากพืชสกุล	ชื่อภาษาไทย	แยกจากส่วน	สถานที่เก็บตัวอย่าง
182	KRA33	MA193	<i>Rhizophora apiculata</i>	โกนกกางใบเล็ก	branch	ต. คลองแห อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา
183	KRA34	MA194	<i>Rhizophora apiculata</i>	โกนกกางใบเล็ก	larmina	ต. คลองแห อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา
184	KRA37	MA195	<i>Rhizophora apiculata</i>	โกนกกางใบเล็ก	larmina	ต. คลองแห อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา
185	KRA38	MA196	<i>Rhizophora apiculata</i>	โกนกกางใบเล็ก	branch	ต. คลองแห อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา
186	KRA40	MA197	<i>Rhizophora apiculata</i>	โกนกกางใบเล็ก	branch	ต. คลองแห อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา
187	KRA42	MA198	<i>Rhizophora apiculata</i>	โกนกกางใบเล็ก	branch	ต. คลองแห อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา
188	KRA43	MA199	<i>Rhizophora apiculata</i>	โกนกกางใบเล็ก	midrib	ต. คลองแห อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา
189	KRA47	MA200	<i>Rhizophora apiculata</i>	โกนกกางใบเล็ก	midrib	ต. คลองแห อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา
190	KRA48	MA201	<i>Rhizophora apiculata</i>	โกนกกางใบเล็ก	vein	ต. คลองแห อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา
191	KRA54	MA202	<i>Rhizophora apiculata</i>	โกนกกางใบเล็ก	vein	ต. คลองแห อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา
192	KRA55	MA203	<i>Rhizophora apiculata</i>	โกนกกางใบเล็ก	vein	ต. คลองแห อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา
193	KRA56	MA204	<i>Rhizophora apiculata</i>	โกนกกางใบเล็ก	vein	ต. คลองแห อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา
194	KRA57	MA205	<i>Rhizophora apiculata</i>	โกนกกางใบเล็ก	vein	ต. คลองแห อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา
195	KRA58	MA206	<i>Rhizophora apiculata</i>	โกนกกางใบเล็ก	vein	ต. คลองแห อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา
196	KRA59	MA207	<i>Rhizophora apiculata</i>	โกนกกางใบเล็ก	vein	ต. คลองแห อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา
197	KRA61	MA208	<i>Rhizophora apiculata</i>	โกนกกางใบเล็ก	petiole	ต. คลองแห อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา
198	KRA62	MA209	<i>Rhizophora apiculata</i>	โกนกกางใบเล็ก	petiole	ต. คลองแห อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา
199	KRA44	MA210	<i>Rhizophora apiculata</i>	โกนกกางใบเล็ก	larmina	ต. คลองแห อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา

ตารางที่ 1ค (ต่อ) รายละเอียดของเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกจากพืชป่าชายเลน โดย
น.ส.จิรายุ บัวทอง

No.	Code	New code	แยกจากพืชสกุล	ชื่อภาษาไทย	แยกจากส่วน	สถานที่เก็บตัวอย่าง
200	KRA22	MA214	<i>Rhizophora apiculata</i>	โกงกางใบเล็ก	larmina	ต. คลองแห อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา
201	KBC8	MA215	<i>Bruguiera cylindrica</i>	ถั่วขาว	vein	ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งสุราษฎร์ธานี
202	KSO14	MA216	<i>Sonneratia ovata</i>	ลำแพน	vein	ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งสุราษฎร์ธานี
203	KSO12	MA217	<i>Sonneratia ovata</i>	ลำแพน	vein	ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งสุราษฎร์ธานี
204	KSO13	MA218	<i>Sonneratia ovata</i>	ลำแพน	midrib	ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งสุราษฎร์ธานี
205	KSO11	MA219	<i>Sonneratia ovata</i>	ลำแพน	vein	ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งสุราษฎร์ธานี
206	KSO4	MA220	<i>Sonneratia ovata</i>	ลำแพน	vein	ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งสุราษฎร์ธานี
207	KSO6	MA221	<i>Sonneratia ovata</i>	ลำแพน	vein	ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งสุราษฎร์ธานี
208	KBC6	MA222	<i>Bruguiera cylindrica</i>	ถั่วขาว	vein	ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งสุราษฎร์ธานี
209	KBC15	MA223	<i>Bruguiera cylindrica</i>	ถั่วขาว	vein	ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งสุราษฎร์ธานี
210	KBC16	MA224	<i>Bruguiera cylindrica</i>	ถั่วขาว	vein	ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งสุราษฎร์ธานี
211	KBC19	MA225	<i>Bruguiera cylindrica</i>	ถั่วขาว	midrib	ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งสุราษฎร์ธานี
213	KBC6	MA227	<i>Bruguiera cylindrica</i>	ถั่วขาว	vein	ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งสุราษฎร์ธานี
214	KSO1	MA228	<i>Sonneratia ovata</i>	ลำแพน	vein	ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งสุราษฎร์ธานี
215	KBC18	MA229	<i>Bruguiera cylindrica</i>	ถั่วขาว	vein	ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งสุราษฎร์ธานี
216	LRM20	MA230	<i>Rhizophora mucronata</i>	โกงกางใบใหญ่	midrib	บ้านคลองลิติ อ.ท่าแพ จ. สตูล
217	LAL1	MA231	<i>Avicennia alba</i>	แสมขาว	branch	บ้านคลองลิติ อ.ท่าแพ จ. สตูล
218	LBP3	MA232	<i>Bruguiera parviflora</i>	ถั่วดำ	branch	บ้านคลองลิติ อ.ท่าแพ จ. สตูล
219	LAL4	MA233	<i>Avicennia alba</i>	แสมขาว	petiole	บ้านคลองลิติ อ.ท่าแพ จ. สตูล

ตารางที่ 1ค (ต่อ) รายละเอียดของเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกจากพืชป่าชายเลน โดย
น.ส.จิรายุ บัวทอง

No.	Code	New code	แยกจากพืชสกุล	ชื่อภาษาไทย	แยกจากส่วน	สถานที่เก็บตัวอย่าง
220	NBP8	MA234	<i>Bruguiera parviflora</i>	ถั่วดำ	petiole	สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 36 จ. สตูล
221	NAL1	MA235	<i>Avicennia alba</i>	แสมขาว	branch	สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 36 จ. สตูล
222	TRA29	MA236	<i>Rhizophora apiculata</i>	โกงกางใบเล็ก	lamina	หาดปากเมง จ. ตรัง
223	LBP13	MA237	<i>Bruguiera parviflora</i>	ถั่วดำ	midrib	บ้านคลองลิติ อ.ท่าแพ จ. สตูล
224	KRA28	MA238	<i>Rhizophora apiculata</i>	โกงกางใบเล็ก	lamina	ต. คลองแห อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา

ตารางที่ 2ค รายละเอียดของเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกจากพืชป่าชายเลน โดย
น.ส.ประไพพิศ เชาวลิต

No.	Code	New code	แยกจากพืชสกุล	ชื่อภาษาไทย	แยกจากส่วน	สถานที่เก็บตัวอย่าง
1	SM1	PMA1	<i>Avicennia alba</i>	แสมขาว	midrib	เกาะตะรุเตา จ. สตูล
2	FV3	PMA2	<i>Lumnitzera littorea</i>	ฝาดดอกแดง	vein	เกาะตะรุเตา จ. สตูล
3	FV2	PMA3	<i>Lumnitzera littorea</i>	ฝาดดอกแดง	vein	เกาะตะรุเตา จ. สตูล
4	FM3	PMA4	<i>Lumnitzera littorea</i>	ฝาดดอกแดง	midrib	เกาะตะรุเตา จ. สตูล
5	FL1	PMA5	<i>Lumnitzera littorea</i>	ฝาดดอกแดง	lamina	เกาะตะรุเตา จ. สตูล
6	LP2	PMA6	<i>Sonneratia caseolaris</i>	ลำพู	petiole	เกาะตะรุเตา จ. สตูล
7	TL1	PMA7	<i>Xylocarpus granatum</i>	ตะบูนขาว	leaf	เกาะตะรุเตา จ. สตูล
8	FM2	PMA8	<i>Lumnitzera littorea</i>	ฝาดดอกแดง	midrib	เกาะตะรุเตา จ. สตูล
9	SL3	PMA9	<i>Avicennia alba</i>	แสมขาว	leaf	เกาะตะรุเตา จ. สตูล
10	LP1	PMA10	<i>Sonertia caseolaris</i>	ลำพู	petiole	เกาะตะรุเตา จ. สตูล
11	FL2	PMA11	<i>Lumnitzera littorea</i>	ฝาดดอกแดง	leaf	เกาะตะรุเตา จ. สตูล
12	FM1	PMA12	<i>Lumnitzera littorea</i>	ฝาดดอกแดง	midrib	เกาะตะรุเตา จ. สตูล
13	TV1	PMA13	<i>Xylocarpus granatum</i>	ตะบูนขาว	vein	เกาะตะรุเตา จ. สตูล
14	LM1	PMA14	<i>Sonneratia caseolaris</i>	ลำพู	midrib	เกาะตะรุเตา จ. สตูล
15	FV1	PMA15	<i>Lumnitzera littorea</i>	ฝาดดอกแดง	vein	เกาะตะรุเตา จ. สตูล
16	FM1/1	PMA16	<i>Lumnitzera littorea</i>	ฝาดดอกแดง	midrib	เกาะตะรุเตา จ. สตูล
17	SL2	PMA17	<i>Avicennia alba</i>	แสมขาว	leaf	เกาะตะรุเตา จ. สตูล
18	LV1	PMA18	<i>Sonneratia caseolaris</i>	ลำพู	vein	เกาะตะรุเตา จ. สตูล
19	FL3	PMA19	<i>Lumnitzera littorea</i>	ฝาดดอกแดง	leaf	เกาะตะรุเตา จ. สตูล
20	SV1	PMA20	<i>Avicennia alba</i>	แสมขาว	vein	เกาะตะรุเตา จ. สตูล
21	FB6	PMA21	<i>Lumnitzera littorea</i>	ฝาดดอกแดง	branch	เกาะตะรุเตา จ. สตูล
22	TB4	PMA22	<i>Xylocarpus granatum</i>	ตะบูนขาว	branch	เกาะตะรุเตา จ. สตูล
23	SF1	PMA23	<i>Avicennia alba</i>	แสมขาว	vein	เกาะตะรุเตา จ. สตูล
24	FB3	PMA24	<i>Lumnitzera littorea</i>	ฝาดดอกแดง	branch	เกาะตะรุเตา จ. สตูล
25	TB5	PMA25	<i>Xylocarpus granatum</i>	ตะบูนขาว	branch	เกาะตะรุเตา จ. สตูล
26	FB4	PMA26	<i>Lumnitzera littorea</i>	ฝาดดอกแดง	branch	เกาะตะรุเตา จ. สตูล
27	SL1	PMA27	<i>Avicennia alba</i>	แสมขาว	leaf	เกาะตะรุเตา จ. สตูล
28	FB2	PMA28	<i>Lumnitzera littorea</i>	ฝาดดอกแดง	branch	เกาะตะรุเตา จ. สตูล
29	TB7	PMA29	<i>Xylocarpus granatum</i>	ตะบูนขาว	branch	เกาะตะรุเตา จ. สตูล
30	FB7	PMA30	<i>Lumnitzera littorea</i>	ฝาดดอกแดง	branch	เกาะตะรุเตา จ. สตูล
31	FB5	PMA31	<i>Lumnitzera littorea</i>	ฝาดดอกแดง	branch	เกาะตะรุเตา จ. สตูล
32	SP3	PMA32	<i>Avicennia alba</i>	แสมขาว	petiole	เกาะตะรุเตา จ. สตูล
33	LEB1	PMA33	<i>Aegiceras conniculatum</i>	เล็บมือนาง	branch	เกาะตะรุเตา จ. สตูล
34	TL3	PMA34	<i>Xylocarpus granatum</i>	ตะบูนขาว	leaf	เกาะตะรุเตา จ. สตูล
35	TB6	PMA35	<i>Xylocarpus granatum</i>	ตะบูนขาว	branch	เกาะตะรุเตา จ. สตูล
36	TAB1	PMA36	<i>Bruguiera cylindrica</i>	ถั่วขาว	branch	เกาะตะรุเตา จ. สตูล

ตารางที่ 2ค รายละเอียดของเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกจากพืชป่าชายเลน โดย
น.ส.ประไพพิศ เชาวลิต

No.	Code	New code	แยกจากพืชสกุล	ชื่อภาษาไทย	แยกจากส่วน	สถานที่เก็บตัวอย่าง
37	SB1	PMA37	<i>Avicennia alba</i>	แสมขาว	branch	เกาะตะรุเตา จ. สตูล
38	TB3	PMA38	<i>Xylocarpus granatum</i>	ตะบูนขาว	branch	เกาะตะรุเตา จ. สตูล
39	SB2	PMA39	<i>Avicennia alba</i>	แสมขาว	branch	เกาะตะรุเตา จ. สตูล
40	TB1	PMA40	<i>Xylocarpus granatum</i>	ตะบูนขาว	branch	เกาะตะรุเตา จ. สตูล
41	SP2	PMA41	<i>Avicennia alba</i>	แสมขาว	petiole	เกาะตะรุเตา จ. สตูล
42	TB2	PMA42	<i>Lumnitzera littorea</i>	ฝาดดอกแดง	branch	เกาะตะรุเตา จ. สตูล
43	SFLM1	PMA43	<i>Lumnitzera littorea</i>	ฝาดดอกแดง	midrib	เกาะยอ จ. สงขลา
44	SFLL2	PMA44	<i>Lumnitzera littorea</i>	ฝาดดอกแดง	leaf	เกาะยอ จ. สงขลา
45	SFM1	PMA45	<i>Lumnitzera littorea</i>	ฝาดดอกแดง	midrib	เกาะยอ จ. สงขลา
46	SFV1	PMA46	<i>Lumnitzera littorea</i>	ฝาดดอกแดง	vein	เกาะยอ จ. สงขลา
47	SFV3	PMA47	<i>Lumnitzera littorea</i>	ฝาดดอกแดง	vein	เกาะยอ จ. สงขลา
48	SFLV2	PMA48	<i>Lumnitzera littorea</i>	ฝาดดอกแดง	vein	เกาะยอ จ. สงขลา
49	SFL1	PMA49	<i>Lumnitzera littorea</i>	ฝาดดอกแดง	leaf	เกาะยอ จ. สงขลา
50	SFLV3	PMA50	<i>Lumnitzera littorea</i>	ฝาดดอกแดง	midrib	เกาะยอ จ. สงขลา
51	SFM3	PMA51	<i>Lumnitzera littorea</i>	ฝาดดอกแดง	midrib	เกาะยอ จ. สงขลา
52	SFV2	PMA52	<i>Lumnitzera littorea</i>	ฝาดดอกแดง	vein	เกาะยอ จ. สงขลา
53	SFLL1	PMA53	<i>Lumnitzera littorea</i>	ฝาดดอกแดง	leaf	เกาะยอ จ. สงขลา
54	SFLM2	PMA54	<i>Lumnitzera littorea</i>	ฝาดดอกแดง	midrib	เกาะยอ จ. สงขลา
55	SFLV1	PMA55	<i>Lumnitzera littorea</i>	ฝาดดอกแดง	vein	เกาะยอ จ. สงขลา
56	SSM1	PMA56	<i>Avicennia alba</i>	แสมขาว	midrib	เกาะยอ จ. สงขลา
57	SFLB1	PMA57	<i>Lumnitzera littorea</i>	ฝาดดอกแดง	branch	เกาะยอ จ. สงขลา
58	SGV1	PMA58	<i>Rhizophora apiculata</i>	โกงกางใบเล็ก	vein	เกาะยอ จ. สงขลา
59	SGB1	PMA59	<i>Rhizophora apiculata</i>	โกงกางใบเล็ก	branch	เกาะยอ จ. สงขลา
60	SFLB3	PMA60	<i>Lumnitzera littorea</i>	ฝาดดอกแดง	branch	เกาะยอ จ. สงขลา
61	SFM1/1	PMA61	<i>Lumnitzera littorea</i>	ฝาดดอกแดง	midrib	เกาะยอ จ. สงขลา
62	SFTP4	PMA62	<i>Lumnitzera littorea</i>	ฝาดดอกแดง	petiole	เกาะยอ จ. สงขลา
63	SSB2	PMA63	<i>Avicennia alba</i>	แสมขาว	branch	เกาะยอ จ. สงขลา
64	LL2	PMA64	<i>Sonneratia caseolaris</i>	ลำพู	leaf	เกาะตะรุเตา จ. สตูล
65	FP1/1	PMA65	<i>Lumnitzera littorea</i>	ฝาดดอกแดง	petiole	เกาะตะรุเตา จ. สตูล
66	SGP1	PMA66	<i>Rhizophora apiculata</i>	โกงกางใบเล็ก	midrib	เกาะยอ จ. สงขลา
67	SFM3/1	PMA67	<i>Lumnitzera littorea</i>	ฝาดดอกแดง	midrib	เกาะยอ จ. สงขลา
68	SFM2	PMA68	<i>Lumnitzera littorea</i>	ฝาดดอกแดง	branch	เกาะยอ จ. สงขลา
69	SGB5/1	PMA69	<i>Lumnitzera littorea</i>	โกงกางใบเล็ก	branch	เกาะยอ จ. สงขลา
70	SFTB3	PMA70	<i>Lumnitzera littorea</i>	ฝาดดอกแดง	branch	เกาะยอ จ. สงขลา
71	SFTB2	PMA71	<i>Lumnitzera littorea</i>	ฝาดดอกแดง	branch	เกาะยอ จ. สงขลา
72	SFLB2	PMA72	<i>Lumnitzera littorea</i>	ฝาดดอกแดง	branch	เกาะยอ จ. สงขลา

ตารางที่ 2ค รายละเอียดของเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกจากพืชป่าชายเลน โดย
น.ส.ประไพพิศ เชาวลิต

No.	Code	New code	แยกจากพืชสกุล	ชื่อภาษาไทย	แยกจาก ส่วน	สถานที่เก็บตัวอย่าง
73	TAB2	PMA73	<i>Bruguiera cylindrica</i>	ถั่วขาว	branch	เกาะตะรุเตา จ. สตูล
74	SSB1	PMA74	<i>Avicennia alba</i>	แสมขาว	branch	เกาะยอ จ. สงขลา
75	LEB3	PMA75	<i>Aegiceras coniculatum</i>	เล็บบมีอนาง	branch	เกาะตะรุเตา จ. สตูล
76	SSB2/1	PMA76	<i>Avicennia alba</i>	แสมขาว	branch	เกาะยอ จ. สงขลา

ตารางที่ 3ค ผลการทดสอบเอนไซม์ cellulase เมื่อเลี้ยงราเอนโดไฟท์ในอาหารเหลวและอาหารแข็งโดยมีฟางข้าว และฟางข้าวผสมไบพิชปายเลน อัตราส่วน 3:2 เป็นสับสเตรท

Sample	วันที่ทดสอบ	Activity ในอาหารแข็ง (ฟางข้าว)(U/ml)	Activity ในอาหารแข็ง (ฟางข้าว+ไบพิชปายเลน) (U/ml)	Activity ในอาหารเหลว (U/ml)	น้ำหนักแห้งจากที่เลี้ยงในอาหารเหลว (g)
MA150	4	0.44	0.18	0.15	0.45
	6	0.69	0.75	0.21	0.71
	8	1.93	0.86	0.17	0.75
	10	1.41	2.7	0.11	0.79
	12	0.7	1.88	0.13	0.72
MA130	4	0.28	0.82	0.08	0.32
	6	0.63	1.21	0.17	0.65
	8	1.81	1.22	0.16	0.62
	10	1.41	1.34	0.1	0.76
	12	0.63	1.12	0.12	0.74
MA145	4	0.2	0.48	0.21	0.61
	6	0.1	0.84	0.25	1.18
	8	0.69	0.98	0.16	0.98
	10	0.8	1.14	0.2	1.07
	12	0.68	0.72	0.21	1.20
<i>Aspergillus</i> sp. (control)	4	1.68	0.7	1.23	1.83
	5	1.73	2.55	1.78	1.96
	6	2.44	2.95	2.35	2.92
	7	1.29	1.68	2.04	3.00
	8	1.48	1.55	2.02	2.92
	9	1.21	1.26	2	2.95

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวประไพพิศ เชาวลิต	
รหัสประจำตัวนักศึกษา	5010220073	
วุฒิการศึกษา		
วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2549

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการการศึกษา)

ทุนผู้ช่วยสอน ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
 ทุนสถาบันบัณฑิตวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีไทย (TGIST) เลขที่ TGIST 01-50-022
 ศูนย์การพัฒนากำลังคน สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Chaowalit, P., Dissara, Y., Phongpaichit, S. and Sakayaroj, J. 2009. Screening of endophytic fungi for the production of lipase, cellulase, amylase or protease form mangrove plants. Proceeding of the 2th Graduate Research Conference. King Mongkut' s Institute of Technology Ladkrabang, April 23-24, 2009. pp.76-82.