1. บทนำ

1.1 บทนำต้นเรื่อง

ปัญหาจากเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ (antibiotic-resistant pathogen) เริ่มมีขึ้นและเกิดการระบาดมากว่า 20 ปี แต่เริ่มมีการตระหนักถึงปัญหาดังกล่าวเมื่อประมาณ 5-10 ปีที่ผ่านมา จนปัจจุบันกลายเป็นปัญหาสำคัญในทางสาธารณสุขเนื่องจากไม่มียาปฏิชีวนะที่สามารถควบคุมเชื้อดื้อยาได้ (Walsh and Amyes, 2004) เชื้อดื้อยาสามารถทำให้เกิดการติดเชื้อฉวยโอกาสในผู้ป่วยที่เป็นโรคทางด้านภูมิคุ้มกัน และยังเป็นสาเหตุของการติดเชื้อในโรงพยาบาลได้อีกด้วย เชื้อดื้อยาปฏิชีวนะที่สำคัญได้แก่ vancomycin-resistant *Enterococcus* (VRE) (*E. faecium* และ *E. faecalis*), methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), carbapenem-resistant *Acinetobacter baumanii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* และ *Salmonella typhi* (Dalhoff 1994; Amyes and Thomson, 1995; Brown *et al*., 1996; Hiramatsu *et al*., 1997) จากปัญหาดังกล่าวทำให้ความต้องการสารต้านจุลินทรีย์ และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ๆ เพิ่มสูงขึ้น แหล่งสำคัญของสารดังกล่าวส่วนใหญ่มาจากพืช โดยเฉพาะอย่างยิ่งพืชสมุนไพรที่มีการใช้เพื่อการรักษาโรคติดเชื้อในทุกภูมิภาคทั่วโลกมาเป็นเวลานานกว่า 2,000 ปี (Samuelsson, 2004) มีการใช้สารจากพืชประมาณ 50% ของการผลิตของอุตสาหกรรมยา (Robbers *et al*., 1996) เนื่องจากพืชสมุนไพรส่วนใหญ่มักสามารถผลิตสาร secondary metabolite ขึ้นเพื่อทำหน้าที่ปกป้องพืชจากศัตรูธรรมชาติ เช่น จุลินทรีย์ แมลง และสัตว์กินพืช และยังพบว่าพืชหลายชนิดสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลายชนิด เช่น phenolics, quinone, flavones, tannins, coumarins, terpenoids และ alkaloids (Cowan, 1999)

เชื้อราบางชนิดอาศัยอยู่ในพืช ด้วยภาวะพึ่งพาอาศัยโดยไม่ก่อให้เกิดโรคกับพืชอาศัย เรียกว่าราเอนโดไฟท์ (Bacon and White 2000) มีรายงานการศึกษาพบว่าราเอนโดไฟท์สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลายชนิด เช่น ฤทธิ์ต้านมะเร็ง ต้านจุลินทรีย์ ต้านไวรัส ต้านอนุมูลอิสระ ทำลายแมลงศัตรูพืช (Strobel *et al*., 1993; Findlay *et al*., 1997; Guo *et al*., 2000; Strobel *et al*., 2004) นอกจากนี้ Shivas and Hyde (1997) ประมาณการว่ามีพืชในเขตร้อน อย่างน้อย 200,000 species ที่ทำหน้าที่เป็นแหล่งอาศัยของเชื้อราชนิดใหม่ ซึ่งน่าจะมีจำนวนสูงถึง 270,000 species จะเห็นได้ว่าราเอนโดไฟท์เป็นอีกแหล่งหนึ่งของการผลิตสารที่มีความน่าสนใจ เพื่อศึกษาถึงองค์ความรู้ และขยายผลการศึกษาถึงความหลากหลายทางชีวภาพของราเอนโดไฟท์ ฤทธิ์ต้าน

จุลินทรีย์ และองค์ประกอบทางเคมีที่ราเอนโดไฟท์ผลิตออกมาซึ่งอาจพัฒนาไปเป็นยาต้านจุลินทรีย์ได้ในอนาคต

1.2 บทตรวจเอกสาร

1.2.1 พืชสกุล *Garcinia*

1.2.1.1 อนุกรมวิธานของพืชสกุล *Garcinia* species (USDA, TROPICOS)

Kingdom Plantae

Division Magnoliophyta

Class Magnoliopsida

Order Theales

Family Clusiaceae

Genus *Garcinia* L.

พืชในสกุล *Garcinia* ยังเป็นที่รู้จักกันในชื่ออื่น ซึ่งประกอบไปด้วย

Brindonia Thouars.	*Cambogia* L.	*Clusianthemum* Vieill.
Mangostana Gaertn.	*Oxycarpus* Lour.	*Pentaphalangium* Warb.
Rheedia L.	*Septogarcinia* Kosterm.	*Tripetalum* K.Schum.
Tsimatimia Jum. & H.Perrier	*Verticillaria* Ruiz & Pav.	*Xanthochymus* Roxb.

1.2.1.2 ข้อมูลทั่วไปของพืชสกุล *Garcinia*

มีการรายงานถึงพืชสกุล *Garcinia* ครั้งแรกในปี ค.ศ. 1753 โดย Linnaeus พืชสกุลนี้เป็นพืชสกุลสำคัญ ในวงศ์ (family) Clusiaceae (ชื่อเดิมคือ Guttiferae) โดยพืชสกุล *Garcinia* มีสมาชิกมากถึง 700 ชนิด (species) พบกระจายได้ทั่วไปในทวีปเอเชีย แอฟริกา อเมริกาใต้ และบริเวณหมู่เกาะมหาสมุทรแปซิฟิก (Polynesia) (The Wealth of India, 1956; Waterman, 1986; Forestry Department, 2006; IPNI, 2006) สำหรับในทวีปเอเชีย พืชสกุล *Garcinia* ส่วนใหญ่กระจายตัวอยู่ในบริเวณเอเชียตะวันออก เช่น ญี่ปุ่น และทางตอนใต้ของจีน (Masuda *et al*., 2005) และบริเวณเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น มาเลเซีย อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ อินโดจีน เวียดนาม ไทย และพม่า (Perry and Metzger, 1980; Vo, 1997) โดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณคาบสมุทรมาเลเซีย ซึ่งพืชสกุล *Garcinia* มีความหลากหลายเป็นอย่างยิ่ง มีจำนวนมากถึง 49 species แต่มีเพียงมังคุด (*Garcinia magostana*)

และ *Garcinia* บางชนิดเท่านั้น ที่เป็นที่รู้จักและนำมาใช้ประโยชน์ (Ministry of Science, Environment and Technology, 1998)

1.2.1.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืชสกุล *Garcinia* (จำรัส, 2541; Kearns, 2006)

Garcinia เป็นไม้พุ่ม หรือไม้ต้น เมื่อโตเต็มที่ อาจมีความสูงถึง 20 เมตร และมีเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้นประมาณ 18 นิ้ว เป็นไม้เนื้อแข็ง เนื้อไม้อาจมีสีน้ำตาลแดง แดงเข้ม น้ำตาลอมส้ม ไปจนถึงน้ำตาลเหลือง ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช บริเวณเปลือกมีน้ำยางเหนียว สีเหลืองจนถึงสีแดง ลักษณะใบเป็นแบบเดี่ยว อยู่ตรงข้ามกันเป็นคู่ เนื้อใบหนา เส้นแขนงใบถี่ ดอกเป็นแบบสมบูรณ์เพศ หรือเพศเดียว กลีบเลี้ยงและกลีบดอกจำนวนอย่างละ 4-5 กลีบ เกสรเพศผู้มีจำนวนมาก ดอกมักออกเดี่ยว หรือออกรวมกันเป็นช่อ ติดกันเป็นกลุ่มๆ ผลไม้เป็นจำพวกเมล็ดแข็งมีเยื่อหุ้ม

1.2.1.4 การกระจายตัวและความหลากหลายของพืชสกุล *Garcinia* ในประเทศไทย

มีการรายงานถึงพืชสกุล *Garcinia* ทั่วประเทศไทย ในบริเวณภาคกลาง มีบันทึกของพืช *Garcinia* หลายชนิดได้แก่ *G. dulcis, G. cowa, G. speciusa* และ *G. nervosa* พบที่สวนพฤกษ-ศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิตต์ (AIT, 2005) มีรายงานพบรงทอง (*G. hanburyi*) มังคุด (*G. mangostana*) และมะดัน (*G. schomburgkiana*) (พร้อมจิตร, 2535; ศูนย์บริการเอกสารการวิจัยแห่งประเทศไทย, 2549) พบชะมวง (*G. cowa*) และมะดัน (*G. schomburgkiana*) ที่สวนพฤกษ-ศาสตร์มวกเหล็ก บริเวณจังหวัดสระบุรีและปราจีนบุรี (Trisarasri, 2000) สำหรับบริเวณภาคเหนือแถบจังหวัดเชียงใหม่ มีการรายงานว่าพบมะดะหลวง (*G. xanthochymus*) (Chanmahasathien *et al*., 2003) *G. mckeaniana* และ *G. speciosa* (Burapadaja, 1989)

ในบริเวณทางภาคใต้ มีการพบ *G. costata* Hemsl, *G. speciusa* Wall. และ *G. cowa* Roxb. ในบริเวณอุทยานแห่งชาติบาลาฮาลา จังหวัดยะลา (จำรัส, 2541) และจากการสำรวจพืชในเขตพรรณไม้ บริเวณชายฝั่งตะวันออกของไทย ในเขตจังหวัดนครศรีธรรมราช สงขลา และนราธิวาส พบพืชสกุล *Garcinia* ด้วยเช่นกัน โดยพบชะมวง (*G. cowa* Roxb.) มะพูดป่า (*G. nervosa* Miq.) กะนวล (*G. merguensis* Wight) และพะวาใบใหญ่ (*G. vilersiana* Pierre.) (Sridith and Laongpol, 2003) และพบ *G. scortechinii* และ *G. nigrolineata* ที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าโตนงาช้าง จังหวัดสงขลา (Rukachaisirikul *et al*., 2000; 2003c) ดังนั้นจะเห็นได้ว่า ในประเทศไทย โดยเฉพาะยิ่งบริเวณภาคใต้ มีความหลากหลายของพืชสกุล *Garcinia* สูง โดยพบได้หลายชนิด จึงมีความน่าสนใจ ในการศึกษาถึงลักษณะและฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชในสกุลดังกล่าว

1.2.1.5 ฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชสกุล *Garcinia*

พืชในสกุล *Garcinia* เป็นแหล่งสำคัญของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิด ซึ่งประกอบไปด้วย xanthones, flavonoids, benzophenones, lactones, phenolic acids (Bennett and Lee, 1989; Sordat, *et al*., 1989; Gustafson *et al*., 1992) มีรายงานเกี่ยวกับการวิจัยทางด้านฤทธิ์ทางชีวภาพ ของสารที่แยกได้จากพืชสกุล *Garcinia* ซึ่งได้แก่

สารสกัดจากต้น *G. benthamiana* จากประเทศอินโดนีเซีย มีผลในการทำลายปรสิต *Babesia gibsoni* ซึ่งก่อโรคในสุนัข และสารสกัดดังกล่าวไม่เป็นพิษเมื่อทดสอบกับหนูทดลอง (Subeki *et al*., 2004) ส่วนสารของต้นรงทอง (*G. hanburyi*) มีผลต่อการโต การเพิ่มจำนวน และรูปร่างของเซลล์มะเร็งของหนูทดลอง (Gou *et al*., 2004) สามารถกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์ (apoptosis) (Zhang *et al*., 2004) และยังสามารถยับยั้งเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) (Sukpondma *et al*., 2005) สารกลุ่ม xanthones ที่แยกได้จาก *G. cowa* Roxb. มีผลในการยับยั้ง *S. aureus* (na Pattalung *et al*., 1994) สารสกัดจากต้น *G. virgata* พืชพื้นเมืองของหมู่เกาะแปซิฟิกใต้ มีผลในการต้านอนุมูลอิสระ (Merza *et al*., 2004) สาร garcinol จากต้น *G. indica* มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (Sang *et al*., 2001; Selvi *et al*., 2003)

สารจากต้น *G. huillensis* จากประเทศซาร์อี ทวีปแอฟริกา มีผลในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียรูปร่างกลม ทั้งชนิดกรัมบวกและกรัมลบ เชื้อวัณโรค (mycobacteria) และเชื้อรา แต่ไม่มีผลในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียรูปแท่งชนิดกรัมลบ ยีสต์และไวรัส (Bakana *et al*., 1987) สารจากต้น *G. xanthochymus* Hook. f. ซึ่งเป็นพืชสมุนไพร ในภาคเหนือของประเทศไทยและพม่า มีผลในการเพิ่ม nerve growth factor (NGF) ของเซลล์ชนิด PC12D (Chamahasathien *et al*., 2003) ในขณะที่สารจากใบของต้น *G. intermedia* จากประเทศเม็กซิโก มีผลในการยับยั้งปรสิต *Trypanosoma cruzi* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรค Chagas' disease (American trypanosomiasis) โรคสำคัญในกลุ่มประเทศละตินอเมริกา (Abe *et al*., 2004)

สารอนุพันธ์ของ benzophenone ซึ่งแยกจากต้น *G. purpurea* และ *G. subelliptica* สามารถยับยั้งแบคทีเรีย MRSA ได้ใกล้เคียงกับยา vancomycin ซึ่งเป็นยาต้านจุลินทรีย์มาตรฐาน (Iinuma *et al*., 1996) มีการพบสารใหม่หลายชนิดจากต้น *G. subelliptica* ซึ่งมีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย โดยสามารถทำการยับยั้งการปล่อยเอนไซม์ beta-glucuronidase และ สาร histamine จาก peritoneal mast cells (Weng *et al*., 2004) สาร triterpenes กลุ่มนี้จาก *G. speciosa* สามารถยับยั้งเอนไซม์ HIV-1 reverse transcriptase ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Rukachaisirikul *et al*., 2003a) และมีความเป็นพิษต่อ human cell lines ถึง 3 ชนิด และยังมีผลทำการเกิดเซลล์ตายได้ (Vieira *et al*., 2004)

สาร kolaviron ซึ่งเป็นสารกลุ่ม flavoniods ที่สกัดจากต้น *G. kola* เป็นมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยมีผลต่อ low density lipoproteins (LDL) (Adaramoye, 2003) เมื่อนำสารกลุ่ม garcinoic acid จากต้น *G. kola* จากประเทศไนจีเรียมาสังเคราะห์ พบว่าสารบางตัวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ (Terashima *et al*., 2002) สารสกัดจาก *G. kola* และพืชสมุนไพรอื่นๆ ที่ใช้เคี้ยวเพื่อขัดฟัน ในประเทศไนจีเรีย สามารถยับยั้งแบคทีเรียในช่องปากได้หลายชนิด ประกอบด้วย *S. aureus,* MRSA, vancomycin-resistant *Enterococcus*, multidrug-resistant *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Bacillus subtilis* (Taiwo *et al*., 1999; Ndukwe *et al*., 2005) ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินหายใจที่แยกจากผู้ป่วยที่ คือ *S. aureus, Streptococcus pyogenes, Streptococcus pneumoniae* และ *Haemophilus influenzae* (Akoachere *et al*., 2002) ยับยั้งเชื้อมาเลเรีย *Plasmodium falciparum* (Tona *et al*., 2004) และยังพบว่า เมื่อนำสารสกัดจาก *G. kola* ไปผสมกับยาต้านจุลินทรีย์ ciprofloxacin hydrochloride พบว่ามีผลทั้งเพิ่มและลด ปัจจัยต่างๆ และการทำงานของยา ciprofloxacin hydrochloride แต่อย่างไรก็ตามยังไม่พบกลไกการออกฤทธิ์ที่ชัดเจนของสารชนิดดังกล่าว (Esimone *et al*., 2002)

จะเห็นได้ว่าพืชในสกุล *Garcinia* เป็นแหล่งสำคัญของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ที่มีความหลากหลายอย่างยิ่ง สำหรับทางภาคใต้ของประเทศไทยพบว่ามีพืชสกุล *Garcinia* หลายชนิดและกระจายอยู่ในหลายพื้นที่

1.2.1.6 พืชสกุล *Garcinia* 5 ชนิด จากภาคใต้ของไทย ที่เลือกมาศึกษา

1.2.1.6.1 ส้มแขก (กลุ่มพืชสมุนไพรและเครื่องเทศ, 2543; สถาบันการแพทย์แผนไทย, 2548; สำนักงานเกษตรจังหวัดยะลา, 2548; IPK, 2002)

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Garcinia atroviridis* Griff. Ex T. Anderson

ชื่อพื้นเมือง มะขามแขก ส้มแขก ส้มควาย ส้มมะวน ชะมวงช้าง ส้มพะงุน (ปัตตานี) ส้มมะอ้น (ใต้) ส้มควาย (ตรัง)

แหล่งที่พบ

มีรายงานการค้นพบส้มแขกครั้งแรกโดย Hooker (1874a) พบทั่วไปในอินเดีย มาเลเซีย และทางตอนเหนือของประเทศพม่า สำหรับในประเทศไทยพบในพื้นที่ทางภาคใต้ เช่น ยะลา ปัตตานี สตูล นราธิวาส พังงา ภูเก็ต กระบี่ ชุมพร และระนอง มักพบส้มแขกในบริเวณที่มีฤดูแล้งที่สั้น ในเขตร้อนชื้นที่มีฝนตกชุกในป่าแถบพื้นที่ราบต่ำจนถึงความสูงของภูเขา 600 เมตร

ลักษณะทั่วไปของส้มแขก

ส้มแขกเป็นไม้ยืนต้นขนาดกลาง สูงประมาณ 5–7 เมตร (รูปที่ 1) เปลือกสีน้ำตาลอมดำ เมื่อลำต้นเป็นแผลจะมียางสีเหลืองออกมา เป็นไม้เนื้อแข็ง ใบส้มแขกเป็นใบเดี่ยวออกตรงข้ามเป็นคู่ แผ่นใบเรียง ใบอ่อนสีน้ำตาลอมแดง ใบแคบค่อนข้างยาว ขอบใบเรียบ ปลายใบแหลมมาก มองเห็นได้ชัดเจน ใบยาวประมาณ 10–20 เซนติเมตร กว้างประมาณ 4–5 เซนติเมตร ก้านใบ ยาวประมาณประมาณ 1–2 เซนติเมตร ใบแห้งมีสีน้ำตาล ดอกเป็นดอกแยกเพศ เพศผู้ มีกลีบเลี้ยง 4 กลีบ ด้านนอกสีเขียว ด้านในสีแดง ก้านดอกยาวประมาณ 0.5–1.7 เซนติเมตร มีเกสรเพศผู้เรียงเป็นวงอยู่บนฐานรองดอก ดอกเพศเมีย เป็นดอกเดี่ยว แทงออกมาจากปลายกิ่ง มีขนาดเล็กกว่าดอกตัวผู้ ผลมีลักษณะกลม แต่เปลือกผลเป็นร่องตามแนวขั้วไปยังปลายผล มี 8–10 ร่อง

(ก)

(ข)

รูปที่ 1 ลักษณะทั่วไปของต้นส้มแขก (*G. atroviridis*) (กลุ่มพืชสมุนไพรและเครื่องเทศ, 2548)
(ก) ผลและดอก (ข) ลำต้น

ฤทธิ์ทางชีวภาพของส้มแขก

รายงานการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารจากส้มแขก ส่วนใหญ่เป็นการรายงานถึงผลการศึกษาทางด้านชีวเคมี โดยมีการพบสาร hydroxycitric acid (HCA) จากส้มแขก (Jena *et al*., 2002) โดย HCA มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ATP citrate lyase ซึ่งทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการสร้างไขมัน เมื่อทดสอบกับสัตว์ทดลอง พบว่ามีผลยับยั้งการสร้างไขมัน ลดการดูดซับอาหาร และทำให้น้ำหนักตัวลดลง (Guthrie and Kierstead 1976; Nishida, 1997; Hastings and Brenes, 1997; Okubo, 1999) นอกจากนี้มีรายงานถึงฤทธิ์ทางชีวภาพในด้านอื่นๆ จากประเทศมาเลเซีย โดยพบว่า สารชนิด

ใหม่จากรากของต้นส้มแขก มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง และพบว่าสารบางชนิดมีฤทธิ์ป่านกลางในการยับยั้งแบคทีเรีย *B. cereus* และ *S. aureus* (Permana *et al*., 2001; 2005) สารสกัดหยาบจากส้มแขกสามารถยับยั้งแบคทีเรีย *B. subtilis*, MRSA, *E. coli* และ *P. aeruginosa* และเชื้อรา *Cladosporium herbarum* และสารสกัดยังมีผลในการต้านอนุมูลอิสระ และการต้านมะเร็งด้วย แต่สารสกัดไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ (Mackeen *et al*., 2000; 2002)

1.2.1.6.2 มะพูด (ส่วนพฤกษศาสตร์ป่าไม้, 2542; สถาบันการแพทย์แผนไทย, 2548; IPK, 2002)

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Garcinia dulcis* (Roxb.) Kurz

ชื่อพื้นเมือง มะพูด จำพูด (กลาง, ใต้) ปราโฮด (เขมร-สุรินทร์) ปะหูด (เหนือ) พะวาใบใหญ่ (จันทบุรี ชลบุรี) ส้มม่วง (จันทบุรี) ไข่จรเข้ ตะพูด (จันทบุรี)

แหล่งที่พบ

มีการรายงานถึงมะพูดครั้งแรก โดย Roxb. (1874) พบกระจายทั่วไปในบริเวณป่าดิบชื้น ป่าดงดิบแล้ง และตามชายห้วยในป่าเบญจพรรณ โดยมากพบในประเทศอินเดีย ฟิลิปปินส์ เกาะบอร์เนียว เกาะชวา ของประเทศอินโดนีเซีย มาเลเซีย ไทย ในระยะหลังเริ่มมีการนำไปปลูกในแถบประเทศอเมริกาด้วย

ลักษณะทั่วไป

เป็นไม้ต้น เป็นพุ่ม ขนาดกลาง สูงประมาณ 10 เมตร (รูปที่ 2) ลำต้นเมื่อมีบาดแผล มียางสีขาวแล้วเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ใบขนาดใหญ่ เนื้อหนา มัน รูปร่างใบคล้ายปลายหอก กว้าง ขนาด 9-12 ซม. ยาว 17-25 ซม. เรียงอยู่ตรงกันข้าม ผิวใบด้านล่างมีขนละเอียด ก้านใบสั้น ดอกแยกเพศในต้นเดียวกัน ดอกสีเขียวอมเหลือง ผลใหญ่ขนาดส้มเขียวหวาน ผลดกออกตามกิ่ง ผลดิบมีสีเขียว ผลแก่มีสีเหลือง เนื้อในผลมีสีเหลืองจำปา เนื้อรสชาติเปรี้ยวอมหวาน รับประทานได้

ฤทธิ์ทางชีวภาพของมะพูด

มีการรายงานของศึกษาถึงฤทธิ์ทางชีวภาพของมะพูดไม่มากนัก ได้แก่สารกลุ่ม xanthones ที่แยกได้จากต้นมะพูดมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อมาเลเรียชนิด *P. falciparum* มีค่า IC_{50} อยู่ในระดับกลางอยู่ในช่วง 0.96-3.88 µg/ml (Likhitwitayawuid *et al*., 1998) และมีการพบสาร pyranoxanthones จากใบของมะพูดด้วย (Kosela *et al*., 2000) และสารกลุ่ม phenol จากผลและดอกของต้นมะพูด มีผลในการยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus* ATCC25923 และ MRSA มีฤทธิ์ในการทำลายอนุมูลอิสระ (Deachathai *et al*., 2005; 2006) และยังมีฤทธิ์ลดไขมันในเลือดได้ (Hutadilok-Towatana *et al*., 2003)

(ก)

(ข)

(ค)

รูปที่ 2 ลักษณะทั่วไปของต้นมะพูด (*G. dulcis*) (Digital Flora of Texas, 2006)

(ก) : ผล (ข) : ใบ (ค) : ลำต้น

1.2.1.6.3 ชะมวง (NYBG)

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Garcinia nigrolineata* Planch. Ex T. Anderson

ชื่อพื้นเมือง ชะมวง

แหล่งที่พบ

ค้นพบครั้งแรกโดย Hooker (1874b) พบกระจายอยู่ทั่วไปแถบ มาเลเซีย พม่า (Whitmore, 1973) และภาคใต้ของประเทศไทย มีรายงานการพบที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าโตนงาช้าง จังหวัดสงขลา (Rukachaisirikul *et al*., 2003c)

(ก)

(ข)

รูปที่ 3 ลักษณะทั่วไปของต้นชะมวง (*G. nigrolineata*)

(ก) : กิ่งและใบแห้ง ที่เก็บไว้ใน PSU Herbarium

(ข) : ลำต้น

ฤทธิ์ทางชีวภาพของชะมวง

เนื่องจากมีการศึกษาถึงฤทธิ์ทางชีวภาพของชะมวงไม่มากนัก เมื่อทำการตรวจเอกสาร พบรายงานถึงความสามารถในการออกฤทธิ์ของพืชชนิดนี้ได้แก่ สารกลุ่ม xanthones ที่แยกได้จากชะมวง มีผลในการทำลายเซลล์ (Thierry, 1999) และ xanthones ที่สกัดได้จากใบ กิ่ง และเปลือกของต้นชะมวงมีผลในการยับยั้งเชื้อ MRSA (วรศา, 2545; Rukachaisirikul *et al*., 2003b; 2003c; 2005a)

1.2.1.6.4 *Garcinia scortechinii* King

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Garcinia scortechinii* King

ชื่อพื้นเมือง ไม่พบรายงานถึงชื่อพื้นเมือง

แหล่งที่พบ

มีการค้นพบ *G. scortechinii* ครั้งแรกในบริเวณคาบสมุทรมาเลเซีย (King, 1890) หลังจากนั้นเมื่อทำการสำรวจเพิ่มเติม พบการกระจายทั่วไปในกลุ่มประเทศอินโดจีน ไทย มาเลเซีย และบรูไน (KEW; Thomas, 1997; Rukachaisirikul *et al*., 2000)

ลักษณะทั่วไป

เป็นไม้ต้น ขนาดกลาง เปลือกไม้สีดำเข้ม ลำต้นขรุขระ ถ้าลำต้นมีบาดแผล จะมียางสีเหลือง ใบขนาดใหญ่ เนื้อหนา มัน เรียงอยู่ตรงกันข้าม (รูปที่ 4) ดอกสีเหลืองอ่อนขนาดเล็ก ผลอ่อนมีสีเขียวตองอ่อน ผลดกออกตามกิ่ง

(ก)

(ข)

รูปที่ 4 ลักษณะทั่วไปของต้น *G. scortechinii*

(ก) : กิ่งและใบแห้งที่เก็บไว้ใน PSU Herbarium

(ข) : กิ่งและใบสด

ฤทธิ์ทางชีวภาพของ *G. scortechinii*

การศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชชนิดนี้มีน้อยมาก พบข้อมูลเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์เท่านั้น โดยพบว่าสารกลุ่ม xanthones ที่แยกจากส่วนต่างๆ ได้แก่ กิ่ง ยาง และเปลือกของต้น *G. scortechinii* เป็นสารชนิดใหม่ ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ATCC25923 และ MRSA ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ ใกล้เคียงกับยาต้านจุลินทรีย์มาตรฐาน และยังพบความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างทางเคมีกับความสามารถในการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (structure-antibacterial activity relationship) (Rukachaisirikul *et al*., 2000; 2005b; Sukpondma *et al*., 2005)

1.2.1.6.5 มังคุด (TROPICOS, USDA)

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Garcinia mangostana* L.

ชื่อพื้นเมือง มังคุด

แหล่งที่พบ

ค้นพบครั้งแรกโดย Linnaeus (1753) ในบริเวณหมู่เกาะของประเทศมาเลเซีย สำหรับต้นกำเนิดของมังคุดมีการสันนิษฐานเริ่มพบที่เกาะมะละกา ในคาบสมุทรมาเลเซีย แล้วเริ่มมีการนำไปปลูกเพื่อการเกษตรครั้งแรกในประเทศไทย หรือพม่า หลังจากนั้นจึงเริ่มกระจายไปยังประเทศเพื่อนบ้านได้แก่ กัมพูชา เวียดนาม มาเลเซีย และสิงคโปร์ (Mortan, 1987) ในปัจจุบันพบว่ามีการกระจายตัวในหลายภูมิภาคทั่วโลก ทั้งในบริเวณ ตอนเหนือของออสเตรเลีย อเมริกากลางเช่น จาไมก้า คิวบา ทางตอนใต้ของอินเดีย พม่า อินโดนีเซีย มาเลเซีย ไทย เวียดนาม ศรีลังกา สหรัฐอเมริกา และประเทศเขตร้อนอื่นๆ (Martin, 1980; Mortan, 1987; Nakasone and Paull, 1998) สำหรับในประเทศไทย มีการปลูกกระจายในทั่วทุกภาคของประเทศไทย แต่ส่วนใหญ่ปลูกในภาคใต้และภาคตะวันออก แถบจังหวัดนครศรีธรรมราช ระนอง ชุมพร จันทบุรี (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2549)

ลักษณะทั่วไป (Mortan, 1987; Nakasone and Paull, 1998)

ไม้ยืนต้น โตช้า ลำต้นตั้งตรง สูง 10-12 เมตร ผิวลำต้นเรียบ สีน้ำตาล ทุกส่วนของต้นมียางสีเหลือง ใบเดี่ยวรูปไข่ขนาดใหญ่ ขอบเรียบ เนื้อใบหนา ผิวใบมัน ออกดอกเดี่ยวที่ปลายกิ่ง กลีบเลี้ยงสีเขียวอมเหลือง แข็ง กลีบดอกสีชมพูเข้ม ผลรูปกลม เปลือกหนา ผลอ่อนสีเหลืองอมเขียว ผลแก่เมื่อสุกผิวด้านนอกจะเป็นสีม่วงดำ ด้านในจะเป็นสีชมพูอมม่วง เมื่อสุกเต็มที่เปลือกนิ่ม เนื้อมังคุดสีขาว รสหวาน หรือหวานอมเปรี้ยว เนื้อในมี 5-7 กลีบ มีเมล็ด 0-2 เมล็ด (รูปที่ 5)

(ก)

(ข)

รูปที่ 5 ลักษณะทั่วไปของต้นมังคุด (*G. mangostana*) (Morton, 1987)

(ก) : ใบและผล (ข) : ลำต้น (ขวา)

ฤทธิ์ทางชีวภาพของมังคุด

เริ่มมีการใช้มังคุดในการรักษาโรค มาตั้งแต่ในสมัยโบราณ โดยใช้เปลือกตากแห้ง แล้วบดเป็นผง ใช้รักษาโรคบิด โรคท้องเสียอื่นๆ รักษาแผลพุพอง เป็นหนอง เน่าเปื่อย และกระเพาะปัสสาวะอักเสบ (ก.กุลฑล, 2524; กองวิจัยทางการแพทย์, 2526; วีณา, 2529; Satyavati *et al*., 1976; Mahabusarakum *et al*., 1987)

การศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพของมังคุดเป็นไปอย่างกว้างขวาง ส่วนใหญ่จะสกัดแยกสารจากส่วนเปลือกมังคุด เนื่องจากเปลือกมังคุดมีองค์ประกอบทางเคมีที่หลากหลาย และเป็นแหล่งสำคัญของสารเคมีที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยพบสารกลุ่ม xanthones ที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ kinase ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญในการควบคุมการสร้างโปรตีน (Jinsart *et al*., 1992; Nakatani *et al*., 2004) ยับยั้งเอนไซม์ cAMP phosphodiesterase (Chairungsrilerd *et al*., 1996) สามารถยับยั้งเอนไซม์ cyclooxygenase (COX) ซึ่งทำหน้าที่สร้าง prostaglandin ซึ่งจะพบสูงเมื่อมีอาการอักเสบ (Nakatani *et al*., 2002) และยังพบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ HIV-1 protease (Chen *et al*., 1996)

สารสกัดจากมังคุดยังมีฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ ได้แก่ สาร xanthone และอนุพันธ์ที่แยกได้ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Yoshikawa *et al*., 1994; Williams *et al*., 1995) และสามารถกระตุ้นให้เซลล์ตายได้ (Sato *et al*., 2004) และมีฤทธิ์หลายชนิดในทางเภสัชวิทยาเมื่อทดสอบในสัตว์ทดลองชนิดต่างๆ เช่น มีฤทธิ์กดการทำงานของประสาทส่วนกลาง (central nervous system, CNS) ทำให้มีการเคลื่อนที่ช้าลง ลดความตึงเครียด ไปจนถึงอาจทำให้เกิดการหลับ หรือสลบได้ และในขณะที่สารบางชนิด มีผลต้านการอักเสบ (Shankaranarayan *et al*., 1979)

การศึกษาและวิจัยที่พบมากที่สุดเป็นด้านเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ เนื่องจากพบว่าสารสกัดจากมังคุดมีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ได้หลายชนิด โดยสามารถยับยั้งเชื้อราโรคพืช ซึ่งประกอบด้วย *Fusarium oxysporum, Alternaria tenuis* และ *Dreschlera oryzae* (Gopalakrishman *et al*., 1997) แบคทีเรียก่อโรคบิด ได้แก่ *Shigella dysenteriae, Shigella* sonnei และ *Shigella boydii* (Praserdsook and Sukchotiratana, 1986) ยับยั้งเชื้อวัณโรค *Mycobacterium tuberculosis* (Suksamrarn *et al*., 2003) และสามารถยับยั้งเชื้อ *Enterococci* ที่ดื้อต่อยา vacomycin (vacomycin resistant *Entercocci*; VRE) และเมื่อผสมสารจากมังคุดกับยาปฏิชีวนะมาตรฐาน ทำให้มีผลเสริมฤทธิ์การทำงานของยาปฏิชีวนะด้วย (Sakagami *et al*., 2005) ยับยั้งเชื้อสาเหตุการเกิดสิว ได้แก่ *Propionibacterium acnes* และ *Staphylococcus epidermidis* (Chomnawang *et al*., 2005) สารสกัดจากมังคุดยังสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุการเกิดหนอง *S. aureus* ได้ ทั้งสายพันธุ์ปกติและสายพันธุ์ที่แยกจากผู้ป่วย ที่ดื้อต่อยา methicillin (MRSA) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่เป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุข เกี่ยวกับการติดเชื้อในโรงพยาบาล (Mahabusarakam *et al*., 1983; Phongpaichit *et al*., 1994; Iinuma *et al*., 1996; Sakagami *et al*., 2005; Voravuthikunchai and Kitpipit, 2005)

พืชสกุล *Garcinia* มีความสำคัญ และความน่าสนใจในด้านการศึกษาฤทธิ์ด้านชีวภาพเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญทั้งทางการแพทย์และทางอุตสาหกรรม ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้ จึงได้ทำการศึกษาถึงเชื้อราเอนโดไฟท์ที่อาศัยอยู่ในพืชสกุล *Garcinia* เพื่อประเมินถึงความสามารถของเชื้อราเอนโดไฟท์ในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยเฉพาะอย่างยิ่งฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ และเพิ่มองค์ความรู้ของพืชสกุล *Garcinia* ต่อไป

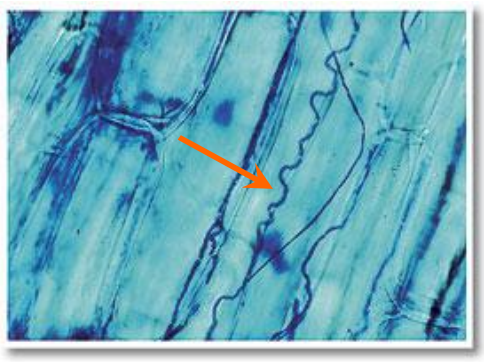
1.2.2 เอนโดไฟท์ (endophyte)

เอนโดไฟท์ คือ สิ่งมีชีวิตที่ในช่วงหนึ่งหรือตลอดวงจรชีวิต สามารถอาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อของพืชได้ (Azevedo, 2000) อาจจะเป็นกลุ่มของแบคทีเรีย แอคทิโนมัยซีต เชื้อรา และปรสิตของพืช ซึ่งสิ่งมีชีวิตดังกล่าวจะพบอยู่ในเนื้อเยื่อที่มีชีวิตของพืช สามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนภายในเนื้อเยื่อโดยไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อพืชอาศัย (Kirk *et al*., 2001)

1.2.2.1 ราเอนโดไฟท์ (endophytic fungi)

ราเอนโดไฟท์ คือเชื้อราที่อาศัยอยู่ในช่องว่างภายในเซลล์ของลำต้น ก้านใบ ราก และใบของพืชที่มีความสมบูรณ์ โดยไม่ก่อให้เกิดอาการของโรคใดๆ กับพืชอาศัย โดยราเอนโดไฟท์สามารถพบได้ในทุกส่วนของพืช (Petrini and Petrini, 1985; Dix and Webster, 1995; Saikkonen *et al*., 1998) เนื้อเยื่อของพืชที่มีราเอนโดไฟท์ ยังสามารถทำงานได้อย่างปกติ โดยราเอนโดไฟท์อาจ

อาศัยอยู่ในภาวะเกื้อกูล (mutuality) หรืออิงอาศัย (symbiotic) (Redlin and Carris, 1985) ซึ่งในปัจจุบัน พบว่าราเอนโดไฟท์เป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ที่สำคัญทางด้านการแพทย์ การเกษตร และทางอุตสาหกรรม (Azevedo *et al*., 2000; Lu *et al*., 2000; Huang *et al*., 2001; Strobel, 2002; Strobel and Daisy, 2003; Ma *et al*., 2004)



รูปที่ 6 ราเอนโดไฟท์ที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืช (Bouton, 2002)

1.2.2.2 ลักษณะเฉพาะของราเอนโดไฟท์

ราเอนโดไฟท์ มีความแตกต่างอย่างเห็นได้ชัดจากราอีพิไฟท์ (epiphytic fungi) เพราะราอีพิไฟท์จะอาศัยอยู่บนพื้นผิวของพืชเท่านั้น ส่วนราก่อโรคพืช (phytopathogenic fungi) ก็จะทำให้พืชที่ติดเชื้อมีการทำงานผิดปกติ และตายในที่สุด สำหรับ mycorrhizae ซึ่งเป็นเชื้อราที่อาศัยอยู่ในรากของพืช ก็อาจจัดเป็นราเอนโดไฟท์ได้เช่นกัน แต่รา mycorrhizae จะมีความแตกต่างจากราเอนโดไฟท์ที่อาศัยอยู่ในรากของพืช เพราะเชื้อรา mycorrhizae จะสร้างโครงสร้างของ hypha ออกมานอกรากของพืชอาศัย (Azevedo *et al*., 2000; Hoff *et al*., 2004) อย่างไรก็ตาม ลักษณะของราเอนโดไฟท์ มีบางส่วนใกล้เคียงกับเชื้อฉวยโอกาสที่เป็น latent pathogen ซึ่งอาจก่อโรคได้ในบางสภาวะ และเชื้อราย่อยสลายที่เป็น latent saprobe ซึ่งจะก่อโรคเฉพาะกับซากของพืชที่ตายแล้วเท่านั้น โดยทั้งสองแบบเป็นการติดเชื้อแฝงโดยไม่แสดงอาการ (symptomless infection) ซึ่งยากต่อการอธิบายถึงบทบาทของเชื้อราต่อพืชอาศัย (Krik *et al*., 2001; Strobel and Daisy, 2003)

1.2.2.3 การแพร่กระจายของราเอนโดไฟท์

รูปแบบการแพร่กระจายตัวของราเอนโดไฟท์จากพืชต้นหนึ่ง ไปยังพืชอีกต้นหนึ่ง ขึ้นอยู่กับระยะการสืบพันธุ์ของราเอนโดไฟท์ ถ้าราเอนโดไฟท์อยู่ในช่วงสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (asexual endophyte) จะสามารถถ่ายทอดผ่านทางเมล็ดซึ่งผลิตขึ้นจากต้นพืชที่มีราเอนโดไฟท์อยู่

เมื่อเมล็ดงอกเป็นต้นอ่อน ราเอนโดไฟท์ก็จะเข้าไปอาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อของพืชนั้นๆ ต่อไป เรียกกระบวนการนี้ว่า vertical transmission แต่ถ้าเชื้อราอยู่ในช่วงสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (sexual endophyte) จะสามารถถ่ายทอดได้ โดยกระจายจากต้นที่มีราเอนโดไฟท์ ไปยังต้นข้างเคียง เรียกกระบวนการดังกล่าวว่า horizontal transmission (Schardl and Phillips, 1997; Clay, 2004)

1.2.2.4 บทบาททางชีวภาพของราเอนโดไฟท์ ที่มีต่อพืชอาศัย

การศึกษาและวิจัยเกี่ยวกับราเอนโดไฟท์ มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาถึงความสัมพันธ์ และหน้าที่ของราเอนโดไฟท์ที่มีต่อพืชอาศัย และประสิทธิภาพของราเอนโดไฟท์ในทางชีวภาพ ซึ่งพบว่า ราเอนโดไฟท์บางชนิดอาจก่อโรคได้ ถ้าพืชอาศัยอยู่ในภาวะที่ไม่เหมาะสม และบางชนิดทำหน้าที่สร้างสารพิษที่ช่วยปกป้องพืช จากสัตว์กินพืช ซึ่งสามารถแบ่งกลุ่มราเอนโดไฟท์ตามบทบาททางชีวภาพดังนี้

1.2.2.4.1 ผู้ย่อยสลายตามธรรมชาติ (decomposer)

ราเอนโดไฟท์มีผลต่อการย่อยสลายสารอินทรีย์ตามธรรมชาติ โดยมีผลต่อกระบวนการย่อยสลาย มีสมมุติฐานว่าราเอนโดไฟท์กลุ่ม Xylariaceae ที่อาศัยอยู่ในพืช น่าจะมีบทบาทเพื่อรอที่จะย่อยสลาย เซลลูโลส และลิกนินในซากพืช หลังจากที่พืชตาย (Pertrini *et al*., 1995) ซึ่งราเอนโดไฟท์ที่อยู่ภายในเนื้อเยื่อของพืชจะสามารถเข้ายึดครอง และเริ่มกระบวนการย่อยสลายได้ก่อนเชื้อกลุ่ม saprophyte ที่มาจากสิ่งแวดล้อมภายนอก (Davis *et al*., 2003) และเมื่อราเอนโดไฟท์เริ่มกระบวนการย่อยสลายในพืชที่ตายแล้ว จะทำให้เกิดการการหมุนเวียนของวัฏจักรแร่ธาตุและสารอาหาร (Storbel, 2002)

ซากหญ้า *Lolium arundinaceum* ที่มีการติดราเอนโดไฟท์ *Neotyphodium coenophialum* จะมีอัตราการย่อยสลายช้ากว่าแบบที่ไม่มีการติดราเอนโดไฟท์ ซึ่งอาจมีผลมาจากการที่ราเอนโดไฟท์สร้างสารพิษจำพวก alkaloids ซึ่งสารดังกล่าวเป็นพิษต่อ เชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ ที่ทำหน้าที่ย่อยสลาย จึงทำให้อัตราการย่อยสลายช้าลง (Lemons *et al*., 2005) และในทำนองเดียวกันพบว่าซากหญ้า *Lolium multiflorum* ที่ติดราเอนโดไฟท์ *Neotyphodium* sp. จะมีอัตราการย่อยสลายต่ำกว่าหญ้าที่ไม่มีการติดเชื้อ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าราเอนโดไฟท์มีผลต่อสิ่งมีชีวิตและกระบวนการในระบบนิเวศวิทยา (Omacini *et al*., 2004)

1.2.2.4.2 ราเอนโดไฟท์กระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช (endophytic fungi as plant promoting microbe)

การศึกษาถึงบทบาทของราเอนโดไฟท์ ที่ทำหน้าที่กระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช ยังมีไม่มากนักเนื่องจากการศึกษาส่วนใหญ่ จะเกี่ยวกับรา mycorrhiza แต่ถึงแม้จะพบรา mycorrhiza ในรากพืช มากกว่า 80% ของพืช แต่เชื้อราชนิดนี้จะต้องอาศัยอยู่กับพืชอาศัยเท่านั้น ไม่สามารถนำมาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการได้ (Dix and Webster, 1995)

ราเอนโดไฟท์ *Piriformospora indica* ซึ่งอาศัยอยู่ในรากของพืช มีผลในการเพิ่มน้ำหนักของรากและยอดของพืชหลายชนิด (Varma *et al*., 1999; Waller *et al*., 2005) หญ้าชนิด *Lolium perenne* เมื่อถูกทำให้ติดราเอนโดไฟท์ชนิด *Epichloë typhina* ทำให้พืชมีน้ำหนักน้อยลง แต่เมื่อติดราเอนโดไฟท์ชนิด *Neotyphodium lolii* จะมีผลทำให้พืชมีน้ำหนักเพิ่มขึ้น (Müller, 2003) ผลของการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช อาจเนื่องจากสารที่ได้จากราเอนโดไฟท์มีผลในการยับยั้งเชื้อก่อโรคพืชหลายๆ ชนิด (Singh *et al*., 2000)

1.2.2.4.3 ราเอนโดไฟท์เป็นแหล่งของเอนไซม์ (endophytic fungi as source of enzymes)

มีการศึกษาถึงความสามารถของราเอนโดไฟท์ ที่สร้างเอนไซม์ได้หลายชนิด โดยราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากต้นพิกุล (*Mimusops elengi*) สามารถผลิตเอนไซม์ phytase ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญของอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ และราเอนโดไฟท์ชนิดนี้ยังสามารถผลิตเอนไซม์อื่นๆ ได้แก่ amylase, xylanase, endogluconase และ acid phosphatase (Sopalun, 2004) มีการรายงานเป็นครั้งแรกถึงความสามารถของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Monotospora* sp. ที่แยกจากหญ้าแพรก (*Cynodon dactyon*) สร้างเอนไซม์ laccase ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Wang *et al*., 2006) ส่วนราเอนโดไฟท์ *P. indica* นอกจากจะสามารถเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตของพืชแล้ว ยังสามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ nitrate reductase และ glucan-water dikinase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายแป้ง (Sherameti *et al*., 2005) ส่วนราเอนโดไฟท์ *Colletotrichum* spp. ก็สามารถหลั่งเอนไซม์หลายชนิด ได้แก่ amylase, cellulase, lipase, pectinase และ protease ในสภาวะ pH ที่แตกต่างกัน (Maccheroni Jr. *et al*., 2004)

1.2.2.4.4 ราเอนโดไฟท์ทำหน้าที่เป็นจุลินทรีย์คุ้มครองพืช (endophytic fungi as plant protector)

มีการศึกษามากมาย เกี่ยวกับบทบาทของราเอนโดไฟท์ในฐานะจุลินทรีย์ที่ทำหน้าที่ในการคุ้มครองพืชอาศัย โดยเป็นผลมาจากสารพิษจำพวก alkaloids ที่เชื้อราสร้างขึ้น ซึ่งสามารถแบ่งได้

เป็น 4 กลุ่มคือ 1) ergot alkaloids, 2) indolediterpenes, 3) pyrrolopyrazine และ 4) saturated aminopyrrolizidines หรือ lolines สำหรับสาร alkaloid ชนิดที่ 1-3 นั้นราเอนโดไฟท์สามารถผลิตได้แม้จะนำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ และพบว่าสาร alkaloid ทั้ง 4 กลุ่ม มีความเป็นพิษต่อแมลง และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Schardl and Phillips, 1997) ดังนั้นหญ้าที่มีราเอนโดไฟท์ จะมีสารกลุ่ม alkaloid อยู่ จึงทำให้มีความต้านทาน ต่อแมลงจำพวกที่กินใบ และสัตว์เคี้ยวเอื้อง (herbivore) (University of Rhode Island, 2005) ราเอนโดไฟท์สามารถป้องกันการเกิดโรคในต้นกล้วย โดยมีผลลดการเข้าทำลายของตัวอ่อนด้วงชนิด *Cosmopolites sordidus* และไส้เดือนฝอยชนิด *Radopholus similis* ซึ่งเป็นศัตรูพืชที่สำคัญของต้นกล้วย (Niere *et al*., 2004) และราเอนโดไฟท์ *Phomopsis phaseoli* และ *Melaconium betulinum* สามารถสร้างสารเพื่อทำลายไส้เดือนฝอย *Meloidogyne incognita* ซึ่งก่อโรคในพืช (Schwarz *et al*., 2004)

ราเอนโดไฟท์มีผลทางกายภาพ สามารถเพิ่มความทนทานให้กับสาหร่ายที่พบอยู่บริเวณชายฝั่ง ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ น้ำ และแสง (Selosse and Tacon, 1998) และนอกจากนี้ยังช่วยให้พืชอาศัยมีอัตราการรอดชีวิตมากขึ้น หญ้าชนิด *Dichanthelium lanuginosum* ที่เจริญในบริเวณที่มีอุณหภูมิอยู่ในช่วงระหว่าง 20-50 ^{0}C พบว่าพืช จะตายถ้าอุณหภูมิสูงกว่า 40 ^{0}C แต่ถ้าพืชถูกทำให้ติดราเอนโดไฟท์ *Curvularia* sp. พบว่าทำให้ทนอุณหภูมิสูงได้ถึง 65 ^{0}C (Redman *et al*., 2002)

1.2.2.4.5 ราเอนโดไฟท์ช่วยป้องกันราก่อโรคพืช (endophytic fungi as plant pathogen antagonist)

ราเอนโดไฟท์หลายชนิด มีบทบาทในการป้องกันพืชอาศัย ปกป้องพืชจากเชื้อราก่อโรคอื่นๆ โดยทำการยับยั้ง หรือทำลายเชื้อราก่อโรค ไม่ให้เข้าทำลายพืชอาศัยได้ โดยพบว่า เมื่อทำการถ่ายราเอนโดไฟท์ ลงไปในต้นโกโก้ (*Theobroma cacao*) สามารถปกป้องพืชจากการเข้าทำลายของเชื้อรา *Phytophthora* spp. ที่เป็นสาเหตุของโรคจุดดำ (black pod disease) (Arnold *et al*., 2003) และราเอนโดไฟท์ *Gliocladium catenulatum* แสดงผลอย่างดีในการยับยั้งเชื้อรา *Crinipellis perniciosa* ซึ่งเป็นเชื้อราสาเหตุของโรค witches's broom disease ที่ก่อความเสียหายอย่างมากต่อการปลูกต้นโกโก้ (Rubini *et al*., 2005) สำหรับเชื้อรา *Colletotrichum magna* ซึ่งเป็นเชื้อราก่อโรคเน่า (necrotic pathogen) พบว่าสายพันธุ์ที่มีการผ่าเหล่า (mutant strain) มีผลช่วยป้องกันพืชอาศัยจากเชื้อราก่อโรคชนิดอื่นๆ ได้ (Freeman and Rodriguez, 1993)

1.2.2.4.6 ราเอนโดไฟท์ที่สร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

สาร taxol เป็นสารกลุ่ม diterpenoid ซึ่งสร้างขึ้นจากต้น yew (*Taxus* sp.) เป็นสารที่มีประสิทธิภาพในการรักษาโรคมะเร็งได้เป็นอย่างดี แต่สารที่ได้มีปริมาณน้อย เนื่องจากต้นไม้ชนิดนี้มีอัตราการเจริญเติบโตช้ามาก (Schiff and Horowitz, 1980; Suffness, 1995) ต่อมาได้มีการแยกราเอนโดไฟท์ *Taxomyces andreanae* ได้จากต้น Pacific yew (*Taxus brevifolia*) ซึ่งรา *T. andreanae* สามารถผลิตสาร taxol ได้เช่นเดียวกับพืชอาศัย (Stierle *et al*., 1993; Strobel *et al*., 1993) การศึกษาต่อๆ มาพบว่าราเอนโดไฟท์ชนิดอื่นๆ จากพืชหลายชนิด ก็สามารถผลิต taxol ได้เช่นกัน (Strobel *et al*., 1996; Li *et al*., 1998; Wang *et al*., 2000; Ge *et al*., 2004) จากการค้นพบนี้ ทำให้สามารถผลิตสาร taxol ได้ในปริมาณมากและเร็วขึ้น จนสามารถนำไปผลิตเพื่อใช้ในทางการแพทย์ได้อย่างพอเพียง นอกจากนี้ยังมีการค้นพบสารอื่นๆ จากราเอนโดไฟท์ ที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง พบสาร torreyanic acid ซึ่งสร้างจากราเอนโดไฟท์ *Pestalotiopsis microspora* มีฤทธิ์เป็นพิษ และทำให้เซลล์ตาย (Lee *et al*., 1996) และสารกลุ่ม cytochalasins ซึ่งผลิตจากราเอนโดไฟท์หลายชนิด ซึ่งมีฤทธิ์ต้านมะเร็ง และต้านจุลินทรีย์ (Wagenaar *et al*., 2000)

มีการศึกษาถึงฤทธิ์ทางชีวภาพด้านอื่นๆ ของราเอนโดไฟท์ พบว่าสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟท์ *P. microspora* มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Strobel *et al*., 2002) ส่วนสารจากราเอนโดไฟท์ *Pseudomassaria* sp. ที่แยกจากต้นไม้จากประเทศคองโก มีฤทธิ์คล้ายกับสารอินซูลิน ซึ่งมีความน่าสนใจพัฒนาสารดังกล่าวเป็นยาต่อไป (Zhang *et al*., 1999) สารจากน้ำเลี้ยงเชื้อรา *Cytonaema* sp. ทำหน้าที่ยับยั้งเอนไซม์ protease ของ human cytomegalovirus (Guo *et al*., 2000) และสารจากราเอนโดไฟท์มีฤทธิ์ในการทำลายตัวอ่อนและหนอน (Findley *et al*., 1997)

1.2.2.4.7 ราเอนโดไฟท์ที่สร้างสารต้านจุลินทรีย์

มีการรายงานถึงความสามารถของราเอนโดไฟท์ที่สามารถสร้างสารต้านจุลินทรีย์ได้หลายชนิด สารส่วนใหญ่จากราเอนโดไฟท์ มีผลยับยั้งเชื้อราโรคพืช แบคทีเรีย ไวรัส ปรสิต แต่ไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์และสัตว์ (Strobel and Daisy, 2003) มีรายงานถึงสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอนโดไฟท์ ที่แยกจากสมุนไพรไทย โดยเมื่อน้ำเลี้ยงเชื้อราไปสกัดทางเคมี แล้วนำสารสกัดที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่าสารหลายชนิดมีฤทธิ์ต้านมาเลเรีย ต้านวัณโรค และต้านเชื้อราได้ (Wiyakrutta *et al*., 2004) มีรายงานพบสารใหม่ 2 สาร ที่สกัดแยกได้จากน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์ *Diaporthe* sp. BCC 6140 สารดังล่าวมีผลยับยั้งเชื้อวัณโรค *Mycobacterium tuberculosis* (Dettrakul *et al*., 2003) สาร 3-nitropropionic acid จากน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์หลายสายพันธุ์ มีผลยับยั้งเชื้อวัณโรค (Chomcheon *et al*., 2005) และสารกลุ่ม cytochalasins จากราเอนโดไฟท์ *Phomopsis* sp. มี

ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis*, *Salmonella enterica* serovar Gallinarum และ *S. aureus* และยังมีผลยับยั้งปานกลางต่อเชื้อยีสต์ *C. tropicalis* (Horn *et al*., 1995) *Fusarium* sp. ซึ่งเป็นราเอนโดไฟท์ ที่แยกได้จากต้น *Selaginella pallescens* จากประเทศคอสตาริกา มีผลในการยับยั้งเชื้อยีสต์*C. albicans* (Brady and Clardy, 2000) ราเอนโดไฟท์ *Gliocladium* sp. จากต้น *Eucryphia cordifolia* สามารถผลิตสารจำพวก volatile organic compounds (VOC's) ซึ่งมีผลในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคในพืช ได้แก่ *Pythium ultimum* และ *Verticillum dahliae* (Stinson *et al*., 2003)

มีการค้นพบราเอนโดไฟท์ *Muscodor albus* ที่แยกจากพืชในประเทศเขตร้อน ซึ่งมีความสำคัญทางการออกฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นอย่างยิ่ง เพราะสามารถผลิตสารจำพวกสารระเหยอินทรีย์ VOCs เมื่อวิเคราะห์ทางเคมีแล้วพบว่ามีสารอินทรีย์หลายชนิดผสมกันอยู่ โดยพบว่าสาร VOCs จากเชื้อรา *M. albus* มีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ได้หลายชนิด โดยยับยั้งเชื้อรา *Pythium ultimum, Pythium aphanidermatum, Phytophthora erythroseptica, Phytophthora cinnamomi, Aphanomyces cochliodiodes, Aspergillus fumigatus, Aspergillus ochraceus, Rhizoctonia solani, Glomerella cingulata, Sclerotinia sclerotiorum, Verticillum dahliae, Colletotrichum coccodes, Stachybotrys chartarum* ต้านเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* และ *Candida albicans* และยับยั้งแบคทีเรีย *E. coli* และ *B. subtilis* (Strobel *et al*. 2001; Ezra *et al*., 2004; Atmosukarto *et al*., 2005) และเมื่อนำ *M. albus* ไปเพาะเลี้ยงร่วมกับพืช พบว่าสามารถลดการเกิดโรคจากเชื้อรา *R. solani* และ *Phytophthora capsici* สาเหตุของโรคแคระแกรน (damping-off) และ โรครากปม (root rot) ได้ตามลำดับ (Mercier and Manker, 2005) และ *M. albus* ยังมีผลยับยั้ง potato tubuer moth (*Phtorimaea operculella*) แมลงที่เป็นศัตรูธรรมชาติของมันฝรั่งได้อีกด้วย (Lacey and Neven, 2006)

ต้น *Palicourea longiflora* และ *Strychnos cogens* ซึ่งเป็นพืชที่มีพิษจากแถบอะเมซอนและอินเดีย ตามลำดับ เป็นแหล่งของราเอนโดไฟท์ ได้แก่ *Colletotrichum* sp., *Guignardia* sp., *Aspergillus niger*, *Glomerella* sp., *Phomopsis* sp., *Xylaria* sp. และ *Trichoderma* sp. พบว่าราเอนโดไฟท์บางส่วน สามารยับยั้งเชื้อราก่อโรคในคนและในพืชได้ (Souza *et al*., 2004) น้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์ที่แยกจากพืชสมุนไพรจีน มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง และมีผลยับยั้งเชื้อรา *Neurospora* sp., *Trichoderma* sp. และ *Fusarium* sp. ซึ่งจากราเอนโดไฟท์ทั้งหมดที่แยกได้ เชื้อรา *Paecilomyces* sp. เป็นราเอนโดไฟท์ที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด (Huang *et al*., 2001) สาร Ambuic acid ที่สร้างโดยราเอนโดไฟท์ *Pestalotiopsis* spp. และ *Monocheatia* sp. ที่แยกจากต้นไม้ในพื้นที่เขตร้อนชื้น สามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคซึ่งประกอบด้วย *Fusarium solani, F. cubense, Helminthosporium sativum, Diplodia natelensis, Cephalosporium gramineum* และ *Pythium*

ultinum ซึ่งสารดังกล่าวอาจมีบทบาทในการคุ้มครองพืช จากการเข้าทำลายของเชื้อราก่อโรค (Li *et al*, 2001) เชื้อรา *Aspergillus fumigatus* ราเอนโดไฟท์จากใบของหญ้าแพรก (*Cynodon dactylon*) สามารถผลิตสารชนิดใหม่ และสารสำคัญได้หลายชนิด และมีผลยับยั้งเชื้อรา *C. albicans* ได้ (Liu *et al*., 2004) สารกลุ่ม diterpenes ชนิดใหม่ ที่ผลิตจากราเอนโดไฟท์ *Periconia* sp. มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้หลายชนิดได้แก่ *B. subtilis, S. aureus, S. epidermidis, Micrococcus luteus, Klebsiella pneumoniae, Proteus vulgaris* และ *S. typhimurium* (Kim *et al*., 2004) ราเอนโดไฟท์ *Penicillium janthinellum* ที่แยกจากต้น *Melia azedarach* มีผลยับยั้งแบคทีเรีย *P. aeruginosa* และ *B. subtilis* และปรสิต *Leishmania mexicana* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Marinho *et al*., 2005)

สำหรับราเอนโดไฟท์จากพืชสกุล *Garcinia* ซึ่งพืชสกุลนี้มีองค์ประกอบทางเคมี และฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจหลายด้าน มีรายงานการศึกษาน้อย พบเพียงรายงานของ Wiyakrutta *et al.* (2004) โดยพบว่าราเอนโดไฟท์ที่แยกจาก *Garcinia thorelii* มีฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิด วิทยา และคณะ (2542) ทำการแยกเชื้อรา เอนโดไฟท์จากพืชสมุนไพรไทย 7 ชนิด แยกเชื้อได้จำนวน 39 สายพันธุ์ พบว่าราบางสายพันธุ์สามารถยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรีย *S. aureus, Entercoccus faecalis*, *B. subtilis*, *Escherichia coli* และ *P. aeruginosa* รา *C. albicans* และ *Trichophyton mentagrophytes* พรทิพย์ (2546) ทำการแยกราเอนโดไฟท์จากใบและกิ่งมังคุด พบว่าเชื้อราที่ได้มีผลยับยั้งจุลินทรีย์ได้หลายชนิด ดังนั้นจึงมีความน่าสนใจในการศึกษาถึงราเอนโดไฟท์ในพืชสกุล *Garcinia* ชนิดอื่นๆ ต่อไป เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานและประยุกต์ใช้ในการศึกษาต่อไปในอนาคต

1.2.3 การจัดจำแนกเชื้อราโดยใช้ข้อมูลทางพันธุกรรม

โดยทั่วไป การจัดจำแนกเชื้อราจะใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นหลัก แต่ปัญหาสำคัญของการจัดจำแนกราเอนโดไฟท์ พบว่าเกิดจากการที่ราเอนโดไฟท์ส่วนใหญ่ไม่สร้างโครงสร้างการสืบพันธุ์ และไม่สร้าง spore ดังนั้นจึงไม่สามารถจำแนกด้วยวิธีทางสัณฐานวิทยาได้ (Bayman *et al*., 1998; Chatmala *et al*., 2003) แต่ในปัจจุบัน ด้วยความก้าวหน้าของวิธีการทางชีวโมเลกุล จึงมีการประยุกต์วิธีต่างๆ เพื่อใช้ศึกษาถึงสารพันธุกรรม แล้วนำข้อมูลดังกล่าวมาใช้ในการจัดจำแนกเชื้อรา (Kurtzman, 1989) เพื่อส่งเสริมการจัดจำแนกจากเดิมที่ใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียว การศึกษาทางชีวโมเลกุลส่วนใหญ่จะวิเคราะห์ถึงโครโมโซม ยีน และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากยีน เช่น โปรตีนต่างๆ

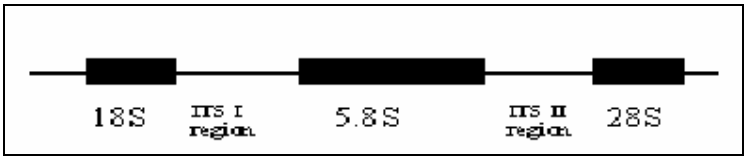
การใช้ข้อมูลทางพันธุกรรมในการจัดจำแนกเชื้อรามีหลายวิธี โดยอาจศึกษาปริมาณของเบส Guanine กับ Cytosine (GC content) ซึ่งปริมาณดังกล่าวจะเกี่ยวข้องกับอุณหภูมิที่ทำให้สาย DNA แยกออกจากกันได้ (Guarro *et al*., 1999) ดังนั้นสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกัน ก็จะมีปริมาณของเบส

ดังกล่าวในสัดส่วนที่แตกต่างกัน วิธีการต่อๆ มาที่ทำการศึกษาได้แก่ DNA-DNA hybridization ซึ่งใช้ศึกษาความคล้ายคลึงของชนิดสิ่งมีชีวิต โดยวัดอุณหภูมิที่สามารถทำให้ DNA ลูกผสม (DNA hybrid) ระหว่างสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกันออกจากกันได้ (Bruns *et al*., 1991), Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLPs) ใช้ประเมินความแตกต่างของ DNA sequences บนบริเวณจำเพาะที่ต้องการศึกษา ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme), Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) วิธีนี้ใช้ประเมินความแตกต่างของ DNA sequence โดยการทำ PCR ด้วย random primer ทำให้ได้ PCR product ที่มีขนาดแตกต่างกัน (Williams *et al*., 1990) และ Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) เป็นเทคนิคการสร้างลายพิมพ์ DNA (DNA fingerprints) โดยตัด genomic DNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แล้วใช้ PCR เพิ่มปริมาณ DNA บางชุดเท่านั้น (Vos *et al*., 1995) วิธีต่างๆ เหล่านี้แสดงผลในรูปของแถบของชิ้นส่วน DNA ที่มีขนาดแตกต่างกัน สามารถใช้แสดงถึงความแตกต่างของลำดับเบส DNA ซึ่งใช้ในการแยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตได้ในระดับ genus, species, subspecies, races, strain ไปจนกระทั่งถึงระดับ clone (Guarro *et al*., 1999) วิธีการทางชีวโมเลกุลดังกล่าวมีข้อดีคือสามารถหาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการและความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) ของสิ่งมีชีวิต โดยไม่จำเป็นต้องรู้ลำดับเบสของ DNA (White *et al*., 2001) อย่างไรก็ตามในปัจจุบัน วิธีการวิเคราะห์ด้วยการใช้ข้อมูลของลำดับเบส DNA (DNA sequencing method) เป็นที่นิยมและมีความถูกต้องมากกว่า เนื่องจากมีข้อมูลลำดับเบส DNA ในฐานข้อมูลต่างๆ มากมาย เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบ และสามารถบอกความสัมพันธ์และความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตแต่ละระดับขั้นอนุกรมวิธานได้มากกว่า (Mazzaglia *et al*., 2001) มีลักษณะ (character) ที่ใช้ในการจัดจำแนกมากทำให้มีข้อมูลในการวิเคราะห์ได้มากกว่า (Bruns *et al*., 1990) และยังแสดงถึงความสัมพันธ์ของเชื้อราที่เป็น teleomorph และ anamorph ได้ด้วย (Chang *et al*., 1991; Lobuglio *et al*., 1996)

1.2.3.1 ส่วน Internal Transcribed Spacers (ITS1-5.8S-ITS2, ITS) บนยีน ribosomal RNA (rDNA)

ยีนส่วน ribosomal RNA เป็นยีนที่นิยมศึกษากันอย่างกว้างขวาง ในการศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ เนื่องจากยีนดังกล่าวทำหน้าที่สร้าง ribosomal RNA ซึ่งพบได้ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด (Hillis and Dixon, 1991; Hibbett, 1992; Landvik *et al*., 1996) ยีน rRNA ของเชื้อราประกอบด้วย small subunit (SSU หรือ 18S) (รูปที่ 7) ซึ่งสามารถใช้ในการจัดจำแนกในระดับอนุกรมวิธานสูงๆ ได้แก่ phylum, class, order และ family (Spatafora and Blackwell, 1993; Landvik *et al.,* 1996; Jansen *et al.,* 1998) large subunit (LSU หรือ 28S) ใช้สำหรับการจัดจำแนกในระดับอนุกรมวิธาน

ต่ำๆ ได้แก่ family, genus และ species (Ellis *et al*., 1998; Hopple Jr. and Vilgalys, 1999; Artjariyasripong *et al*., 2001) และส่วน internal transcribed spacer (ITS) (Drenth, 2001) ซึ่งมีความแปรผันมากที่สุด (highly variable region) จึงเหมาะสมสำหรับใช้ในการจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตในระดับ species หรือ ระหว่าง species (Takamatsu, 1998; Gardes *et al*., 1991; Gardes and Bruns, 1993; Moncalvo and Vilgalys, 1998) ซึ่งโดยทั่วไปส่วน ITS จะมีขนาดประมาณ 540-670 bp (Sen *et al*., 1999; da Wet *et al*., 2000) ในการศึกษาครั้งนี้ จึงได้เลือกศึกษาส่วน ITS ของราเอนโดไฟท์ เพื่อนำข้อมูลทางพันธุกรรมที่ได้ ไปใช้ในการจัดจำแนกราเอนโดไฟท์ในระดับ genus และ/หรือ species ต่อไป



รูปที่ 7 ตำแหน่งของส่วน ITS ที่อยู่ในยีน ribosomal RNA ของเชื้อรา (Collinge, 1998)

1.2.3.2 การศึกษาสารพันธุกรรมของเชื้อราโดยใช้ยีนอื่นๆ

แม้ว่าจะมีการศึกษาและใช้ยีน ribosomal RNA เป็นส่วนใหญ่ในการจัดจำแนก แต่พบว่า rRNA เป็นเพียงส่วนเล็ก เมื่อเทียบกับสายพันธุกรรมทั้งหมดของเซลล์ (Selfert *et al*., 1995) ดังนั้นจึงมีการศึกษาและใช้ยีนส่วนอื่นๆ ร่วมในการจัดจำแนกด้วย (O'Donnell, 1996) เพื่อให้มีข้อมูลทางพันธุกรรมมากเพียงพอที่จะใช้จัดจำแนกได้อย่างถูกต้องมากที่สุด ยีนส่วนอื่นๆ ที่ทำการศึกษา เช่น mitochondrial rRNA (Pine *et al*., 1999), β-tubulin (Thon and Royse, 1999), RNA polymerase II subunit (Liu *et al*., 1999), cytochrome oxidase II (COX2) (Martin, 2000) และ elongation factor 1α (O'Donnell, 2000)

1.2.3.3 การวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis) จากข้อมูลทางพันธุกรรม

การวิเคราะห์โดยใช้สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ จะต้องทำการสร้าง phylogenetic tree โดยอาศัยข้อมูลจากสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต ซึ่งสามารถศึกษาได้ทั้งโปรตีนและ DNA ประกอบด้วยขั้นตอนคร่าวๆ ดังต่อไปนี้ 1) ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างโดยวิธีการทางชีวโมเลกุล เช่น PCR, DNA sequencing 2) จัดเรียงลำดับเบส DNA หรือโปรตีน (sequence alignment) 3) นำข้อมูลที่ได้มาสร้าง phylogenetic tree โดยการคำนวณที่เหมาะสม กับวัตถุประสงค์การทดลอง ขนาด และชนิดของ

ข้อมูล โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ และ 4) ประเมินค่าความเชื่อมั่นและแปลผลจาก phylogenetic tree ที่ได้ (ศิราวุธ, 2544)

1.2.3.4 วิธีการวิเคราะห์และสร้าง phylogenetic tree (เจษฎา, 2545; ต่อศักดิ์, 2545ก; 2545ข)

1.2.3.4.1 การวิเคราะห์แบบ Maximum Parsimony (MP)

Camin and Sokal (1965) สร้างการวิเคราะห์แบบ maximum parsimony เพื่อสร้าง phylogenetic tree โดยอาศัยหลักการสร้าง tree จากจำนวนการแทนที่ (substitution) หรือการเปลี่ยนแปลง (character state change) ที่น้อยที่สุด เพื่ออธิบายความสัมพันธ์ และความแตกต่างของกลุ่มสิ่งมีชีวิต phylogenetic tree ที่ได้จากการวิเคราะห์ดังกล่าวจึงเรียกว่า most parsimonious tree (MPT) โดยทำการเลือก MPT ที่เหมาะสมที่สุดโดยใช้วิธีทางสถิติที่เรียกว่า K-H test (Kishino and Hasegawa, 1989) การแทนที่หรือการเปลี่ยนแปลง อาจเป็นลักษณะของลำดับเบสของสาย DNA หรือลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนก็ได้

การวิเคราะห์แบบ maximum parsimony มีข้อดีได้แก่ 1) เป็นวิธีการวิเคราะห์จากลักษณะที่พัฒนามาร่วมกัน (shared and derived character) 2) สามารถให้ข้อมูลเกี่ยวกับบรรพบุรุษ (ancestral sequence) และ 3) ไม่ลดทอนข้อมูลในการวิเคราะห์ แต่อย่างไรก็ตามวิธีการดังกล่าวมีข้อเสียได้แก่ 1) ใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน เมื่อเทียบกับวิธีอื่น เช่น แบบ Distance 2) ใช้ข้อมูลจาก informative character เท่านั้นและ 3) ถ้าพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงสูงมาก อาจมีการวิเคราะห์ไม่ถูกต้อง

1.2.3.4.2 การวิเคราะห์แบบ Maximum Likelihood (ML)

เป็นการวิเคราะห์ที่ได้รับการพัฒนาจาก Felsenstein (1985) วิธีนี้มีหลักการคล้ายกับวิธี 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)

1.2.3.4.3 การวิเคราะห์แบบ Distance

หลักการของวิธีนี้คือการวิเคราะห์โดยใช้ค่าความต่าง และความเหมือนทางพันธุกรรม (genetic distance or similarity) ของสิ่งมีชีวิต วิธีวิเคราะห์แบบนี้มักไม่นิยมใช้ในการวิเคราะห์สาย

สัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการมากนัก เมื่อเทียบกับวิธี maximum parsimony และ maximum likelihood เนื่องจากมีข้อจำกัดคือ 1) การเปลี่ยนแปลงข้อมูลไปเป็นค่าความเหมือนหรือความต่าง ทำให้รายละเอียดของข้อมูลหายไป 2) ข้อมูลในการวิเคราะห์ ซึ่งเป็นค่าความเหมือนหรือความต่างนี้ ไม่อาจนำไปวิเคราะห์ร่วมกับวิธีแบบอื่นๆ ได้ และ 3) ไม่สามารถเลือกศึกษาเฉพาะส่วนได้ ต้องศึกษาลักษณะทั้งหมด แต่อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้เป็นเพียงวิธีเดียวที่ใช้ในการวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของข้อมูลบางประเภทเช่น DNA-DNA hybridization, RFLP, AFLP, RAPD และ DNA fingerprints

1.2.3.5 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 แสดงว่ามีความเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นมาก

Tree length

ผลรวมทั้งหมด ที่ได้จากความยาวของแขน phylogenetic tree

Topology

ลักษณะและรูปแบบของ tree ที่เกิดจากการจัดเรียงตัวของกลุ่มสิ่งมีชีวิต หลังจากผ่านการจัดจำแนก โดยเชื่อมโยงกันจากจุดเชื่อมต่อ (node) และแขนของ tree (branch)

Monophyletic group

กลุ่มของสิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะบางอย่างร่วมกัน หรือเกิดจากการมีบรรพบุรุษร่วมกัน

Polyphyletic group

กลุ่มของสิ่งมีชีวิต ที่มีลักษณะบางอย่างแตกต่างกัน จึงทำให้กระจายตัวอยู่ใน clade ที่ต่างกันและไม่มีบรรพบุรุษร่วมกัน

Clade

กลุ่มของสิ่งมีชีวิตที่แสดงความใกล้ชิดกัน เนื่องจากมีความสัมพันธ์ร่วมกัน หรืออาจมีบรรพบุรุษเดียวกัน หรืออาจเรียกได้ว่า monophyletic group

Homoplasy

การที่สิ่งมีชีวิต มีลักษณะทางพันธุกรรม (genotype) แตกต่างกัน แต่กลับมีลักษณะแสดงออก (phenotype) เหมือนกัน

Synapomorphy

การที่สิ่งมีชีวิต มีลักษณะที่พัฒนามาร่วมกัน ในกลุ่มเดียวกัน หรือเหมือนกับบรรพบุรุษ

Apomorphy

การที่สิ่งมีชีวิตมีลักษณะที่พัฒนาใหม่ (derived character) หรือมีลักษณะแตกต่างออกไปจากพี่น้อง (sister clade) และบรรพบุรุษ (ancient)

Ingroup

Taxa ของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการวิเคราะห์ถึงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

Outgroup

Taxa ของสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ที่นำมาใช้เป็นตัวเปรียบเทียบกับ ingroup และเป็นกลุ่มที่คาดว่ามีวิวัฒนาการมาก่อน ingroup

Most parsimonious tree (MPT)

เป็น phylogenetic tree ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี maximum parsimony ซึ่งอาจมีจำนวนมากกว่า 1 tree ที่แสดงถึงความเปลี่ยนแปลงทางวิวัฒนาการน้อยที่สุด

Kishino-Hasekawa Test (K-H test)

การวิเคราะห์ทางสถิติ ที่ใช้ในการเลือก tree ที่มี topology เหมาะสมที่สุด (best tree)

Total character

ลักษณะรวมทั้งหมด เมื่อทำการวิเคราะห์ทางสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ประกอบด้วย 3 ลักษณะคือ

1) Constant character

ลักษณะของ character ที่มีความเหมือนกัน ไม่มีการเปลี่ยนแปลง

2) Parsimony informative character

ลักษณะของ character ที่มีความแตกต่างกัน ในชุดข้อมูลอย่างน้อย 2 characters จึงทำให้นำไปวิเคราะห์ถึงสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการโดยวิธี maximum parsimony

3) Parsimony ininformative character

ลักษณะของ character ที่แตกต่างกัน ในชุดข้อมูลและไม่นำมาวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการโดยวิธี maximum parsimony

Consistency index (CI)

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

CI = minimum possible tree length/tree length

Retention index (RI)

ดัชนีที่ใช้บอกสัดส่วนของ synapomorphy ที่พบบน phylogenetic tree โดยมีค่าตั้งแต่ 0-1 ซึ่ง 1 หมายถึงไม่มี homoplasy ดัชนีสามารถคำนวณได้จาก

RI = (maximum possible tree length-tree length)/
(maximum possible tree length-minimum possible tree length)

ค่าความเชื่อมั่น bootstrap (Bootstrapping value)

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

1.3 วัตถุประสงค์

1) เพื่อแยกเชื้อและคัดเลือกราเอนโดไฟท์จากพืชสกุล *Garcinia* 5 ชนิด ที่สามารถสร้างสารต้านจุลินทรีย์
2) ทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของราเอนโดไฟท์ โดยทดสอบจากน้ำเลี้ยงเชื้อและสารสกัดหยาบของราเอนโดไฟท์
3) จัดจำแนกชนิดของราเอนโดไฟท์ที่มีศักยภาพในการผลิตสารที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด ด้วยข้อมูลทางพันธุกรรม