4. วิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การแยกราเอนโดไฟท์ จากพืชสกุล *Garcinia*

จากการแยกราเอนโดไฟท์จากพืชสกุล *Garcinia* ทั้งหมด 5 species รวมทั้งหมดจำนวน 10 ต้น ได้ราเอนโดไฟท์ทั้งหมด 1,979 isolates จากจำนวนตัวอย่างพืช 660 ชิ้น เมื่อคำนวณอัตราการแยกราเอนโดไฟท์ (isolation rate) ซึ่งจะเป็นค่าที่บอกถึงจำนวนของเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้ ต่อหนึ่งหน่วยของตัวอย่างพืช โดยคำนวณจากสูตร (Jordaan *et al*., 2006)

อัตราการแยกราเอนโดไฟท์ = จำนวนราเอนโดไฟท์ที่แยกได้/
จำนวนชิ้นของตัวอย่างพืชที่นำมาแยก

พบว่า ราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากพืชสกุล *Garcinia* มีอัตราการแยกราเอนโดไฟท์ เท่ากับ 3.00 isolates/ตัวอย่างพืช สูงกว่าราเอนโดไฟท์จากต้นสน *Pinus monticola* จำนวน 2,019 isolates จากตัวอย่างพืชจำนวน 1,550 ตัวอย่าง (1.3 isolates/ตัวอย่างพืช) (Ganley and Newcombe, 2006) และราเอนโดไฟท์จากพืช *Colophospermum mopane* จำนวน 721 isolates จากตัวอย่างพืชจำนวน 1,470 ตัวอย่าง (0.49 isolates/ตัวอย่างพืช) (Jordaan *et al*., 2006) ราเอนโดไฟท์ที่แยกจากพืช *Azadirachta indica* จำนวน 70 isolates จากจำนวนตัวอย่างพืช 200 ชิ้น (0.35 isolates/ตัวอย่างพืช) (Mahesh *et al*., 2005) และราเอนโดไฟท์จากพืช *Crataeva magna* จำนวน 96 isolates จากตัวอย่างพืชจำนวน 800 ชิ้น (0.086 isolates/ตัวอย่างพืช) (Nalini *et al*., 2005) ทั้งนี้อาจมีความแปรผันเกิดขึ้นบางส่วนในการเปรียบเทียบ เนื่องจากเป็นการแยกราเอนโดไฟท์จากส่วนที่แตกต่างกันของพืช ซึ่งอาจมีผลต่อจำนวนเชื้อที่ได้ ตลอดจนความถี่ในการแยกเชื้อ และกลุ่มเชื้อที่แต่ละรายงานเลือกศึกษา และแม้ว่ายังไม่มีรายงานที่ชัดเจนถึงจำนวนราเอนโดไฟท์ ว่ามีจำนวนมากน้อยเพียงใด ที่อาศัยอยู่ในพืช (Lebrón *et al*., 2001) แต่จากอัตราการแยกราเอนโดไฟท์ดังกล่าวข้างต้น จะเห็นได้ว่า พืชสกุล *Garcinia* เป็นแหล่งสำคัญของราเอนโดไฟท์ เพราะสามารถแยกเชื้อราเอนโดไฟท์ได้จำนวนมากกว่าพืชชนิดอื่นๆ

ในการวิจัยครั้งนี้ได้ทำการแยกราเอนโดไฟท์ จากพืชสกุล *Garcinia* เพียงสกุลเดียวเป็นจำนวน 5 species ชนิดละ 1-3 ต้น โดยทำการแยกราเอนโดไฟท์ภายในวันเดียวกันที่ทำการเก็บตัวอย่างพืช และแยกโดยใช้อาหาร corn meal agar (CMA) พบว่าได้จำนวนราเอนโดไฟท์จำนวนสูง

มาก (1,979 isolates) เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานของ Wiyakrutta *et al*. (2004) ที่ทำการแยกราเอนโดไฟท์จากพืชสมุนไพรไทยจำนวน 81 สกุล จำนวนสกุลละ 1 species ซึ่งเก็บรักษาตัวอย่างพืชไว้ในตู้เย็นก่อน แล้วจึงทำการแยกราเอนโดไฟท์ในภายหลัง และใช้อาหาร water agar (WA) ซึ่งมีสารอาหารน้อยกว่า ในการแยกราเอนโดไฟท์ จึงทำให้แยกได้ราเอนโดไฟท์ได้เพียง 582 isolates ในการแต่อย่างไรก็ตามพบว่าราเอนโดไฟท์จากพืชสกุล *Garcinia* มีความหลากหลายไม่สูงนัก เมื่อพิจารณาจากลักษณะ colony จึงคัดเลือกเพื่อไปทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ได้เพียง 377 isolates (19.05%) ต่างจากราเอนโดไฟท์ที่แยกจากพืชสมุนไพรไทยหลายชนิด ทำให้ได้ราเอนโดไฟท์ที่มีความหลากหลายสูงด้วย สามารถคัดเลือกราเอนโดไฟท์ที่แตกต่างได้ 360 isolates (61.85%)

การศึกษาในครั้งนี้ ทำการแยกราเอนโดไฟท์จากทั้งส่วนใบ ก้านใบ และส่วนกิ่ง สามารถตรวจพบราเอนโดไฟท์จากทุกส่วน อาจเนื่องจากว่า ในบริเวณดังกล่าว มีเนื้อเยื่อสำคัญคือส่วนของ xylem และ phloem ซึ่งเป็นท่อส่งสารอาหาร และน้ำตามลำดับ Bishop (2002) ศึกษาถึงความสัมพันธ์ของข้าวสาลีกับราเอนโดไฟท์ *Fusarium proliferatum* พบว่าราเอนโดไฟท์อาศัยอยู่บริเวณเนื้อเยื่อของพืช ได้แก่ epidermis, vascular bundle sheath และ xylem ของพืชอาศัย ซึ่งสอดคล้องกับ Mengoni *et al*. (2003) รายงานการพบแบคทีเรียเอนโดไฟท์จำนวนมากบริเวณ phloem บริเวณรากและกิ่งของต้น *Ulmas* sp. บริเวณเนื้อเยื่อดังกล่าวมีความอุดมสมบูรณ์ของอาหารและสภาวะแวดล้อม จึงสามารถพบราเอนโดไฟท์ได้เป็นจำนวนมาก การเก็บตัวอย่างพืชสกุล *Garcinia* ในครั้งนี้ ทำการเก็บตัวอย่างจากบริเวณที่มีความเหมาะสม คือ 1) พืชอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่มีลักษณะเฉพาะ 2) พืชที่เก็บตัวอย่าง มีการใช้เป็นสมุนไพร มาเป็นเวลายาวนาน 3) เป็นพื้นท้องถิ่น และ 4) พืชเจริญอยู่ในบริเวณที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง (Strobel and Daisy, 2003) Strobel (2003) กล่าวว่าพืชยืนต้นในเขตร้อน เป็นพืชอาศัยของราเอนโดไฟท์ที่มีความหลากหลายมากกว่าพืชที่เจริญในบริเวณที่มีอากาศแห้งและเย็น ซึ่งมีความหลากหลายของพืชน้อยกว่าด้วย ทำให้มีโอกาสตรวจพบเชื้อที่มีศักยภาพในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากพืชเขตร้อนได้สูงด้วย

4.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

เป็นที่ทราบกันดีว่า เชื้อราเป็นแหล่งของสารต้านจุลินทรีย์ ตั้งแต่มีการค้นพบยาเพนิซิลินยารักษาโรคที่มีใช้อยู่ในปัจจุบันนั้น 6 ใน 20 ชนิดมาจากเชื้อรา (Gloer, 1997) โดยรายงานการศึกษาสารปฏิชีวนะส่วนใหญ่มาจากเชื้อราในกลุ่ม *Trichoderma*, *Penicillium* และ *Aspergillus* ที่แยกได้จากดิน (Dix and Webster, 1995) จนกระทั่งมีการพบราเอนโดไฟท์ ทำให้มีผู้หันมาสนใจรากลุ่มนี้

มากขึ้น เนื่องจากยังมีรายงานการศึกษาถึงฤทธิ์ทางชีวภาพโดยเฉพาะฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์น้อย (Schulz *et al*., 2002) และจากการที่ราเอนโดไฟท์อาศัยอยู่ในพืชอาศัยอาจช่วยสร้างสารต้านจุลินทรีย์ เพื่อป้องกันโรคพืช (Strobel, 2003) ซึ่ง Tan and Zou (2001) เชื่อว่าราเอนโดไฟท์สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และสารเคมีชนิดเดียวกันกับพืชได้ อาจเนื่องมาจากการแลกเปลี่ยนของสารพันธุกรรม (horizontal genetic transfer) ระหว่างราเอนโดไฟท์และพืชอาศัย การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการแยกราเอนโดไฟท์จากพืชสกุล *Garcinia* 5 ชนิด ที่พบในภาคใต้ของไทย เนื่องจากพืชเหล่านี้มีสรรพคุณทางยาที่สำคัญ และมีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพส่วนใหญ่เป็น secondary metabolite ที่เชื้อราสร้างออกมาภายนอกเซลล์ ดังนั้นในการคัดกรองหาเชื้อราที่สร้างสารต้านจุลินทรีย์จึงนิยมนำน้ำเลี้ยงเชื้อรามาทดสอบ และเพื่อเพิ่มโอกาสสำหรับการคัดกรองหาสารต้านจุลินทรีย์ ทำการเก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟท์ ในช่วงอายุ 2 และ 3 สัปดาห์ เนื่องจากสันนิษฐานว่าสารต้านจุลินทรีย์อาจจะมีระยะเวลาการสร้างใกล้เคียงกับสาร taxol ที่เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ โดยสร้างจากราเอนโดไฟท์ *Pestalotiopsis microspora* ที่มีสภาวะเหมาะสมในการสร้าง taxol อยู่ในช่วงอายุ 2-3 สัปดาห์ (Strobel *et al*., 1996)

ผลการทดสอบพบว่า น้ำเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟท์ ที่แยกจากพืชสกุล *Garcinia* ทุกชนิดสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทดสอบได้อย่างน้อย 1 ชนิด ราเอนโดไฟท์จากมังคุด มีความสามารถในการยับยั้งมากที่สุด รองลงมาคือ ราเอนโดไฟท์จากส้มแขกและมะพูด ตามลำดับ ส่วนราเอนโดไฟท์จากชะมวง และ *G. scortechinii* แสดงความสามารถในการยับยั้งได้น้อย อาจเนื่องจากต้นมังคุด ส้มแขก และมะพูด เป็นพืชที่พบได้ทั่วไปในหลายบริเวณของภาคใต้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งมังคุด โดยทำการเก็บตัวอย่างพืชจากบริเวณแปลงเพาะปลูกแบบพืชเดี่ยว (monoculture) ดังนั้นพืชกลุ่มนี้ มีโอกาสโดนรบกวน จากศัตรูธรรมชาติ เช่น เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค แมลงศัตรูพืช ไส้เดือนฝอย ฯลฯ ซึ่งอาจมีผลกระตุ้นให้ราเอนโดไฟท์และพืชอาศัย มีความสามารถในการสร้างสารเคมีบางชนิดขึ้นมาเพื่อปกป้องพืชจากการเข้าทำลายดังกล่าว แต่ในทางกลับกันต้นชะมวงและต้น *G. scortechinii* ซึ่งเก็บตัวอย่างพืชจากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าโตนงาช้าง จังหวัดสงขลา ซึ่งในบริเวณดังกล่าวมีความอุดมสมบูรณ์มากกว่า และมีพืชหลายชนิดปะปนกัน พืชมีความแข็งแรง ทำให้โอกาสตรวจพบราเอนโดไฟท์ที่สร้างสารต้านจุลินทรีย์จากพืชอาศัย 2 ชนิดนี้ต่ำ

น้ำเลี้ยงเชื้อและสารสกัดจากจากราเอนโดไฟท์จากพืชสกุล *Garcinia* มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *S. aureus* ATCC25923 และ MRSA ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Horn *et al*. (1995) ที่พบว่าสาร phomosichasin สารในกลุ่ม cytochalasin ที่ผลิตจากราเอนโดไฟท์ *Phomopsis* sp. ก็มีผลในการ

ยับยั้ง *S. aureus* ด้วยเช่นกัน นอกจากนี้ Kim *et al*. (2004) ยังพบว่าสารกลุ่ม diterpenes สร้างขึ้นจากราเอนโดไฟท์ *Periconia* sp. จากต้น *Taxus cuspidata* มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียได้หลายชนิด รวมถึง *S. aureus* ATCC6538p

ราเอนโดไฟท์จากพืชสกุล *Garcinia* ทุก isolates ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียกรัมลบที่นำมาทดสอบได้แก่ *E. coli* ATCC29522 และ *P. aeruginosa* ATCC27853 อาจเนื่องจากเชื้อแบคทีเรียกลุ่มนี้มีความต้านทานต่อสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้มากกว่าแบคทีเรียกรัมบวก จึงหาสารมายับยั้งได้ยากกว่า รายงานการศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารธรรมชาติ ส่วนใหญ่จะพบว่ามีผลต่อแบคทีเรียกรัมบวกมากกว่าแบคทีเรียกรัมลบเช่นกัน (Boudjella *et al*., 2005; Wyrzykiewicz *et al*., 2005; McCann *et al*., 2006) ถ้าสารมีฤทธิ์ต่อแบคทีเรียกรัมลบ มักพบว่าต้องใช้ความเข้มข้นสูง เช่น สารกลุ่ม polyketide ซึ่งโดยทั่วไปมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียกรัมบวกได้ดี (Anzai *et al*., 2003) แต่สำหรับอนุพันธ์ของ polyketide บางชนิด ได้แก่ citrinin, emodin และ janthinone แม้ว่าใช้สารดังกล่าวในความเข้มข้นสูงๆ (500 mg/ml) ก็พบว่าสารส่วนใหญ่มีผลยับยั้ง *P. aeruginosa* เพียงปานกลาง และมีผลต่ำในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* (Marinho *et al*., 2005) ในทำนองเดียวกัน diterpene มีผลปานกลางในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ATCC25922 (Kim *et al*., 2004)

ราเอนโดไฟท์จากพืชสกุล *Garcinia* มีฤทธิ์ต้านยีสต์ *C. albicans* ATCC90028 ได้ไม่ดีนัก โดยพบเพียง 3 isolates จาก 377 isolates (0.79%) เมื่อนำเลี้ยงเชื้อราดังกล่าวไปสกัดทางเคมีเพื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารพบว่า ถึงแม้สารสกัดจะไม่สามารถยับยั้งยีสต์ได้อย่างสมบูรณ์ โดยไม่มี inhibition zone ที่ชัดเจน แต่เมื่อนำไปหาค่า MIC สารสกัดจากราเอนโดไฟท์สามารถให้ค่า MIC ได้ในระดับกลางประมาณ 200 µg/ml มีรายงานการศึกษาฤทธิ์ต้าน *C. albicans* ของราเอนโดไฟท์อย่างกว้างขวาง Jumpathong *et al*. (2004) ทดสอบราเอนโดไฟท์ทั้งหมด 92 isolates พบว่ามีราเอนโดไฟท์เพียง 3 isolates เท่านั้น (3.2%) ที่แสดงผลยับยั้งยีสต์ *C. albicans* Lu *et al*. (2000) รายงานถึงสารใหม่หลายชนิด ในกลุ่มของสาร ergosterol และสาร metabolite จากราเอนโดไฟท์ *Colletotrichum* sp. แต่ก็มีผลยับยั้งยีสต์ *C. albicans* ได้เพียงปานกลาง โดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง 50-100 µg/ml สาร metabolite ชนิดใหม่คือ asperfumoid และ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ จากราเอนโดไฟท์ *Aspergillus fumigatus* CY108 มีฤทธิ์ยับยั้งปานกลางด้วยเช่นกัน โดยให้ค่า MIC อยู่ในช่วง 31.5-125 µg/ml (Liu *et al*., 2004) Brady and Clardy (2000) รายงานว่าสารกลุ่ม pentaketide จากราเอนโดไฟท์ *Fusarium* sp. มีสารประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งยีสต์ *C. albicans* ได้ สามารถทำให้เกิด inhibition zone ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ในช่วง 20-24 mm และยังพบว่าสาร cryptocandin ที่สร้างจากราเอนโดไฟท์ *Cryptosporiopsis* cf. *quercina* สามารถยับยั้ง *C. albicans* โดยให้ค่า MIC

เท่ากับ 0.03 μg/ml ใกล้เคียงกับยาต้านรามาตรฐาน amphotericin B (Strobel *et al*., 1999) ในการศึกษาครั้งนี้พบว่ามีราเอนโดไฟท์หลาย isolates แสดงผลในการยับยั้งเชื้อยีสต์ *C. neoformans* ATCC90012 ได้ บางส่วนเป็นการยับยั้งที่ไม่สมบูรณ์ อาจเนื่องจากว่าการทดสอบเบื้องต้นนั้นใช้น้ำเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟท์ ซึ่งในน้ำเลี้ยงเชื้อดังกล่าว สารออกฤทธิ์ที่ละลายอยู่ในน้ำเลี้ยงเชื้ออาจมีปริมาณน้อยมาก ทำให้เจือจาง หรือสารออกฤทธิ์ต้าน *C. neoformans* ATCC90012 อาจมีคุณสมบัติในการละลายน้ำได้ไม่ดี ดังนั้นเมื่อทำการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ โดยวิธี agar well diffusion จึงเห็นการยับยั้งไม่สมบูรณ์ แต่เมื่อนำไปสกัดทางเคมี ทำให้สารออกฤทธิ์มีความเข้มข้นมากขึ้น พบว่าสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟท์บางชนิด มีฤทธิ์ในการยับยั้งดีมาก โดยมี inhibition zone ที่กว้างและชัดเจน มีขนาดอยู่ในช่วง 8.08-19.08 mm และยังให้ค่า MIC อยู่ในระดับปานกลาง เท่ากับ 64 μg/ml หากมีการแยกให้ได้สารบริสุทธิ์ อาจทำให้ค่า MIC ที่ได้ต่ำลงไปอีก

ในการทดสอบฤทธิ์ต้านรา *M. gypseum* แม้ว่าในการทดสอบเบื้องต้น น้ำเลี้ยงเชื้อจากราเอนโดไฟท์ทุก isolates ไม่สามารถยับยั้งรา *M. gypseum* ได้เลย แต่พบว่าเมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อไปสกัดทางเคมี แล้วนำสารสกัดที่ได้กลับมาทดสอบกับรา *M. gypseum* พบว่า สารสกัดบางสารสามารถยับยั้ง *M. gypseum* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง 2-32 μg/ml ใกล้เคียงกับยาต้านรามาตรฐานคือ miconazole ซึ่งให้ค่า MIC เท่ากับ 1 μg/ml จึงควรทำการแยกสารบริสุทธิ์และนำมาทดสอบต่อไปในอนาคต ซึ่งอาจทำให้ได้สารต้าน *M. gypseum* ที่มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับยาต้านรามาตรฐาน และพัฒนาเป็นยาได้ Rojas *et al*. (2004) รายงานว่าสารสกัดส่วนน้ำของพืช *Gentianella nitida* จากประเทศเปรู ไม่มีผลยับยั้งรา *M. gypseum* แต่สารที่สกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ได้แก่ 95% ethanol, ethylacetate และ methanol มีผลยับยั้งรา *M. gypseum* ได้เป็นอย่างดี อาจเนื่องจากสารออกฤทธิ์เป็นสารขั้วต่ำ ไม่ละลายในน้ำ จึงเห็นได้ว่าชนิดและความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ มีผลอย่างเห็นได้ชัดต่อความสามารถในการออกฤทธิ์ของสารสกัดที่ได้

การศึกษาวิจัยครั้งนี้พบว่าสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟท์ D44 (*Eutypella scorparia* PSU-D44) มีผลยับยั้งต่อแบคทีเรีย S. *aureus* ATCC29523 และ MRSA น้อยมาก โดยมีค่า MIC เท่ากับ 500 μg/ml และไม่มีผลยับยั้งเชื้อรา *M. gypseum* เลย แต่เมื่อทำการแยกสารสกัดหยาบจนได้สารบริสุทธิ์ พบสารชนิดใหม่ และสารดังกล่าวมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *S. aurues* ATCC29523 และ MRSA มีค่า MIC เท่ากับ 64 และ 128 μg/ml ตามลำดับ และสารใหม่อีกชนิดหนึ่งมีค่า MIC ต่อเชื้อรา *M. gypseum* เท่ากับ 16 μg/ml (Pongchareon *et al*., 2006) ซึ่งสอดคล้องกับ Miller *et al*. (1998) ซึ่งพบว่าสาร ecomycin ที่แยกได้จากแบคทีเรียเอนโดไฟท์ *Pseudomonas viridiflava* มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อยีสต์ *C. neoformans* ATCC90012 และ *C. neoformans* ATCC90013 โดยสาร

ecomycins กึ่งบริสุทธิ์ (semi-purified ecomycins) ให้ค่า MIC เท่ากับ 19 μg/ml แต่เมื่อแยกจนได้สาร ecomycin บริสุทธิ์ พบว่าสารดังกล่าวให้ค่า MIC ต่ำลงเท่ากับ 4 μg/ml ใกล้เคียงกับยาต้านรามาตรฐานคือ amphotericin B ที่ให้ค่า MIC เท่ากับ 0.1 μg/ml

ในการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์เบื้องต้นของน้ำเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟท์ ใช้วิธี agar well diffusion test เนื่องจากพบว่าสารออกฤทธิ์ในน้ำเลี้ยงเชื้อมีความเจือจาง ซึ่งวิธีนี้มีข้อดีกว่าคือเมื่อทำการทดสอบสามารถใส่น้ำเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟท์ลงในแต่ละหลุมได้ในปริมาณมากกว่า วิธี agar disc diffusion test หลังจากพบว่าราเอนโดไฟท์ isolate ใดสามารถสร้างสารต้านจุลินทรีย์ได้ จึงทำการสกัดสาร เพื่อให้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่อยู่ในน้ำเลี้ยงเชื้อมีความเข้มข้นมากขึ้น แล้วจึงทดสอบด้วยวิธี agar disc diffusion test แต่อย่างไรก็ตามทั้งสองวิธีดังกล่าว เป็นการทดสอบเพื่อหาฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นเท่านั้น ซึ่งวิธีนี้จะเหมาะกับสารกลุ่มที่เป็นขั้วสูง ละลายน้ำได้ดี และมีขนาดโมเลกุลเล็ก สามารถทำให้ละลายและแพร่ซึมผ่านอาหารเลี้ยงเชื้อได้ดี ทำให้เกิดการยับยั้งที่ชัดเจน แต่อย่างไรก็ตามมีสารออกฤทธิ์บางชนิด ที่มีความเป็นขั้วต่ำ หรืออาจมีโมเลกุลใหญ่ อาจทำให้เกิด inhibition zone แคบหรือไม่เกิด inhibition zone เลยก็ได้ ทำให้การคัดเลือกราเอนโดไฟท์ผิดพลาดไปได้ แต่วิธี agar diffusion test นี้ทำการทดสอบได้ง่าย เหมาะที่จะใช้ในการคัดกรองสารสกัดจำนวนมาก แต่ค่าที่แสดงถึงผลการยับยั้งอย่างมีนัยสำคัญ และสามารถนำไปเปรียบเทียบกับยามาตรฐานได้คือค่า MIC

4.3 การจัดจำแนกราเอนโดไฟท์ด้วยข้อมูลทางพันธุกรรม

การจัดจำแนกเชื้อราโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาแม้จะสามารถจัดจำแนกได้อย่างละเอียด และถูกต้องมากที่สุด แต่พบว่าต้องใช้เวลาในการจัดจำแนกนาน เนื่องจากต้องเพาะเลี้ยงเชื้อราบนอาหารหลายชนิดเป็นเวลาหลายสัปดาห์ หรือต้องกระตุ้นด้วยปัจจัยบางอย่าง เช่น การเพาะเลี้ยงภายใต้แสง fluorescent การใส่เนื้อเยื่อพืชลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นต้น (Guo *et al*., 1998; Taylor *et al*., 1999) เพื่อเป็นการกระตุ้นให้เชื้อราสร้างโครงสร้างการสืบพันธุ์เพื่อใช้ในการจัดจำแนกได้ งานวิจัยชิ้นนี้เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของราเอนโดไฟท์ที่สร้างสารต้านจุลินทรีย์ และสารที่มี NMR profile น่าสนใจ ทั้งสิ้นจำนวน 22 isolates พบราเอนโดไฟท์ที่สร้างโครงสร้างของการสืบพันธุ์เพียง 6 isolates เท่านั้น ได้แก่ A1, A2, A67, A71, D2 และ M41 ส่วนราเอนโดไฟท์อีก 16 isolates ไม่พบโครงสร้างการสืบพันธุ์ใดๆ และสร้างเพียงเส้นใยเท่านั้น จึงไม่สามารถจัดจำแนกลงไปถึงระดับ genus หรือ species ได้ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Lin *et*

al. (2005) ที่พบว่าราเอนโดไฟท์ที่เลือกมาศึกษาไม่สร้าง spore เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลานานกว่า 2 เดือน จึงเรียกราเอนโดไฟท์กลุ่มดังกล่าวว่า non-sporulating fungi หรือ sterile mycelia ซึ่งต้องใช้วิธีการจัดจำแนกโดยการใช้ข้อมูลทางพันธุกรรมเท่านั้น จึงจะสามารถจัดจำแนกได้ (Guo *et al*., 2000) ดังนั้นการศึกษาราเอนโดไฟท์ในครั้งนี้ จึงใช้ทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยาและข้อมูลทางพันธุกรรมเป็นข้อมูลประกอบกัน เพื่อช่วยในการจัดจำแนกได้ดียิ่งขึ้น

ในการวิจัยราเอนโดไฟท์ครั้งนี้ได้เลือกทำการศึกษาโดยใช้ข้อมูลจากส่วน ITS1-5.8S-ITS2 (ITS) ของยีน rRNA เนื่องจากข้อมูลจากส่วน ITS ซึ่งเป็นส่วนที่มีความแปรผันสูง (high variable region) สามารถใช้เพื่อจัดจำแนกราเอนโดไฟท์จนถึงระดับ genus และ species ได้เป็นอย่างดี มีเพียงราเอนโดไฟท์บาง isolate เท่านั้น ที่จำแนกได้แค่ระดับ order หรือ family โดยไม่สามารถระบุบ่งชี้ได้ว่าเป็น genus หรือ species ใด เนื่องจากข้อมูลลำดับเบส DNA ใกล้เคียงที่นำมาเปรียบเทียบจะเป็นลำดับเบส DNA ของเชื้อราที่ไม่ทราบชื่อ (unknown fungal sequence)

ข้อมูลลำดับเบส DNA ในส่วน ITS สามารถใช้เพื่อตรวจหา และจัดจำแนกราเอนโดไฟท์ได้ในหลายชนิดทั้งจากราเอนโดไฟท์ที่แยกจากพืชจนได้เชื้อราบริสุทธิ์ (Davis *et al*., 2003; Schwarz *et al*., 2004) และราเอนโดไฟท์จากเนื้อเยื่อพืชโดยตรงที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ (unculturable fungi) โดยไม่ต้องทำการแยกจนได้ราเอนโดไฟท์บริสุทธิ์ (Guo *et al*., 2001; Gao *et al*., 2005) นอกจากนี้สามารถใช้ส่วน ITS เพื่อตรวจหาและจัดจำแนกเชื้อราในกลุ่มอื่นได้อย่างถูกต้องและรวดเร็ว เช่นเชื้อราทางการแพทย์ (Hinrikson *et al*., 2005; Pryce *et al*., 2006) เชื้อรา mycorrhiza (Chamber *et al*., 1999) จะเห็นได้ว่าข้อมูลทางพันธุกรรม มีความสำคัญและจำเป็นเมื่อต้องการจัดจำแนกเชื้อราที่ลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายกัน แต่อาจไม่มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (convergent evolution) หรือเชื้อราที่ลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางอย่างถูกลดหายไป (Blackwell *et al*., 2005) ซึ่งการจัดจำแนกโดยใช้ข้อมูลทางพันธุกรรมมีข้อดีคือ ใช้จัดจำแนกเชื้อราได้หลายชนิด วิเคราะห์ได้อย่างรวดเร็ว และสามารถใช้ได้กับเชื้อราที่โตช้าหรือเพาะเลี้ยงได้ยาก และราเอนโดไฟท์ที่ไม่สร้างโครงสร้างการสืบพันธุ์ใดๆ (Gao *et al*., 2005)

ในการศึกษาครั้งนี้ ใช้การวิเคราะห์ข้อมูลทาง phylogeny ทั้งสิ้น 3 วิธีได้แก่ maximum parsimony, maximum likelihood และ neighbor joining พบว่า topology ของทั้ง 3 วิธี มีความคล้ายคลึงกัน แตกต่างกันเพียงเล็กน้อยบริเวณตำแหน่งของ subclade เท่านั้น (ข้อมูลไม่ได้แสดงไว้) จึงเลือกนำเสนอผลการวิเคราะห์แบบ maximum parsimony เพียงแบบเดียว ดังนั้น phylogenetic tree ที่แสดงไว้จะเป็น most parsimonious tree เท่านั้น ซึ่งคล้ายกับการศึกษาของ Gentile *et al*. (2005) ที่วิเคราะห์ยีน β-tubulin และ translation elongation factor 1-α ของราเอนโดไฟท์

Neotyphodium sp. และ *Epichloë* sp. โดยทำการวิเคราะห์แบบ maximum parsimony และ maximum likelihood พบว่าผลที่ได้แตกต่างกันเพียงเล็กน้อย จึงเลือกแสดงเฉพาะ maximum likelihood tree เท่านั้น เช่นเดียวกับ Bodensteiner *et al*. (2004) ที่ศึกษาเชื้อรากลุ่ม basidiomycetes พบว่าผลการวิเคราะห์ของ maximum parsimony และ maximum likelihood ที่ได้มีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อยเท่านั้น และในทำนองเดียวกันเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี maximum parsimony และ Bayesian ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ แตกต่างกันเพียงเล็กน้อยเช่นเดียวกัน (Gao *et al*., 2005; Lumbsch *et al*., 2005)

ผลการวิเคราะห์การกระจายตัวของราเอนโดไฟท์ทั้ง 22 isolates ใน order ต่างๆ พบว่าได้ค่า CI ต่ำเพียง 0.386 ขณะที่ RI ปานกลาง 0.683 (ตารางที่ 13, รูปที่ 33) ค่าเหล่านี้บ่งบอกถึงชุดข้อมูล (dataset) ที่มี homoplasy สูง ในทำนองเดียวกันก็มี synapomorphy ที่บ่งบอกถึงลักษณะที่พัฒนามาร่วมกัน (shared derived character) สูงอีกด้วย เนื่องจากข้อมูลที่ใช้วิเคราะห์นั้นเป็นข้อมูลของส่วน ITS ซึ่งมีความหลากหลายสูงเหมาะสำหรับการจำแนกในระดับอนุกรมวิธานต่ำๆ ได้แก่ genus หรือ species เมื่อนำส่วน ITS มาศึกษาถึงอนุกรมวิธานในระดับสูงขึ้นได้แก่ order จึงอาจทำให้ได้ค่า homoplasy สูงไปด้วย แต่ทั้งนี้เป็นเพียงการวิเคราะห์เบื้องต้น เพื่อดูการกระจายตัวของราเอนโดไฟท์ในแต่ละ order อย่างคร่าวๆ เท่านั้น ดังนั้นหากต้องการศึกษาสายสัมพันธ์ในระดับอนุกรมวิธานสูงๆ เช่น order หรือ family ควรเลือกใช้ข้อมูลส่วนที่มีความคงที่ (conserved region) มากกว่านี้ได้แก่ small subunit (18S) หรือ large subunit (28S) rDNA แต่เมื่อทำการศึกษาลึกลงไปในแต่ละ clade ของราเอนโดไฟท์ พบว่าส่วน ITS สามารถใช้จำแนกราเอนโดไฟท์ได้อย่างละเอียด ซึ่งได้แสดงไว้แล้วในผลการทดลองลำดับถัดมา (รูปที่ 34-39)

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาในการวิจัยครั้งนี้ ได้เพาะเลี้ยงราเอนโดไฟท์ด้วยอาหาร PDA เพียงชนิดเดียว จากราเอนโดไฟท์ที่เลือกมาศึกษาทั้งหมด 22 isolates มีเพียง 6 isolates (27.3%) ที่พบว่ามีการสร้าง spore จึงสามารถใช้ลักษณะของการสร้าง spore เพื่อจัดจำแนกราเอนโดไฟท์ได้เบื้องต้น แต่อย่างไรก็ตามพบว่าราเอนโดไฟท์ที่เหลือ 16 isolates (72.3%) นั้นไม่พบการสร้างโครงสร้างการสืบพันธุ์ใดๆ จึงมีความจำเป็นต้องใช้ข้อมูลทางพันธุกรรมเข้ามาช่วยในการจัดจำแนก ปัญหาที่ราเอนโดไฟท์ส่วนใหญ่ไม่สร้าง spore เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้ไม่สามารถจัดจำแนกราเอนโดไฟท์ได้ เป็นปัญหาที่พบมากในการศึกษาวิจัยราเอนโดไฟท์ (Bayman *et al*., 1998; Arnold *et al*., 2000) ทำนองเดียวกับการศึกษาของ Guo *et al*. (2000) ซึ่งรายงานถึงการแยกราเอนโดไฟท์ จากต้นปาล์มชนิด *Livistona chinensis* ได้ราเอนโดไฟท์ทั้งหมดจำนวน 788 isolates แบ่งเป็นราเอนโดไฟท์ที่สามารถจัดจำแนกได้ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

จำนวน 650 isolates (83.5%) และราเอนโดไฟท์ที่ไม่สามารถจัดจำแนกได้จำนวน 128 isolates (16.5%) แต่อย่างไรก็ตามพบว่าในการจัดจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา คณะนักวิจัยต้องกระตุ้นให้มีการสร้าง spore โดยใช้ปัจจัยหลายอย่างได้แก่ ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อหลายชนิดประกอบด้วย potato dextrose agar (PDA), corn meal agar (CMA), tap water agar (TWA) และมีการใส่เนื้อเยื่อของต้น *L. chinensis* ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำไป incubate ในที่ที่มีแสง fluorescent ซึ่งเป็นขั้นตอนที่ซับซ้อน และใช้ระยะเวลานานในการวิจัย

เมื่อพิจารณาถึงความหลากหลายของราเอนโดไฟท์ที่สร้างสารต้านจุลินทรีย์ และสารที่มี NMR profile น่าสนใจ ทั้ง 22 isolates พบว่าสามารถจัดจำแนกได้ 10 genera ได้แก่ *Aspergillus, Botryosphaeria, Curvularia, Phomopsis, Eutypella, Fusarium, Fusicoccum, Guignardia, Penicillium* และ *Xylaria* รวมทั้งราเอนโดไฟท์ที่ไม่สามารถจัดจำแนกได้ถึงระดับ genus 1 isolate โดยกระจายอยู่ใน 6 orders ได้แก่ Diaporthales, Dothideomycetes *et* Chaetothyrio-mycetes *incertae sedis*, Eurotiales, Hypocreales, Pleosporales และ Xylariales (ตารางที่ 14) อย่างไรก็ตามเนื่องจากไม่มีข้อมูลการศึกษาราเอนโดไฟท์ที่แยกจากพืชสกุล *Garcinia* มาก่อน ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงอาจถือได้ว่าเป็นการรายงานครั้งแรกที่พบความหลากหลายของราเอนโดไฟท์จากพืชสกุล *Garcinia* กระจายตัวอยู่ใน order ต่างๆ ทั้งนี้หากทำการจัดจำแนกราเอนโดไฟท์ทั้งหมดที่แยกได้ ก็อาจพบความหลากหลายมากขึ้น

ตัวอย่างการศึกษาในทำนองเดียวกันเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพของราเอนโดไฟท์ที่สร้างสารต้านมะเร็งและต้านเชื้อรา ที่แยกมาจากพืชสมุนไพร 3 ชนิดของประเทศจีน ผลการจัดจำแนกพบว่ากระจายตัวอยู่ใน 14 genera ได้แก่ *Biospora, Cladosporium, Cephalosporium, Dactylium, Fusarium, Geotrichum, Mortierella, Mucor, Ovulariopsis, Paecilomyces, Papulari, Phoma, Trichoderma* และ *Tubercularia* (Huang *et al*., 2001)

โดยทั่วไปราเอนโดไฟท์แบ่งได้เป็นสองกลุ่มคือกลุ่มที่พบได้บ่อย (common endophyte) และกลุ่มที่พบไม่บ่อย (uncommon or rare endophyte) การวิจัยครั้งนี้พบว่าราเอนโดไฟท์ที่พบได้บ่อยในพืชชนิดอื่นๆ และในการวิจัยครั้งนี้ได้แก่ *Xylaria, Botryosphaeria, Guignardia* และ *Phomopsis/Diaporthe* ซึ่งมีรายงานถึงราเอนโดไฟท์ดังกล่าวในงานวิจัยหลายชิ้น (Davis *et al*., 2003; Camatti-Sartori *et al*., 2005; Gao *et al*., 2005; Santamaría and Bayman, 2005) โดยเฉพาะอย่างยิ่งราในกลุ่ม *Xylaria* sp. ที่พบได้บ่อยในลักษณะราเอนโดไฟท์ในพืชหลายชนิด (Dreyfuss and Pertrini, 1984; Rodrigues, 1994; Davis *et al*., 2003) จากการศึกษาครั้งนี้ ผลจากการจัดจำแนกและวิเคราะห์ผลทาง phylogeny พบรากลุ่มที่จัดอยู่ใน order Xylariales มากที่สุด จำนวนทั้งสิ้น 7

isolates (A59, D14, D44, D50, D53, D65 และ N24) โดยสามารถจัดจำแนก A59, D14 และ D65 อยู่ใน genus *Xylaria* sp. (Xylariaceae) เนื่องจากมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับรา *Xylaria* หลายชนิด (รูปที่ 36) แต่ไม่สามารถระบุบ่งชี้ได้ชัดเจนว่าใกล้เคียงกับ *Xylaria* species ใด เนื่องจากไม่มีข้อมูลของลำดับเบส DNA เพียงพอเพื่อใช้ในการเปรียบเทียบจากฐานข้อมูล GenBank

ราเอนโดไฟท์อีก 2 isolates (D50 และ D55) ที่จัดอยู่ใน family Xylariaceae แต่ยังไม่สามารถระบุชัดเจนว่าเป็น genus *Xylaria* หรือไม่ จึงอาจจัดจำแนกราเอนโดไฟท์ทั้งสองชนิดเป็น Xylariaceous fungi ซึ่งหมายถึงราเอนโดไฟท์ที่มีความสัมพันธ์อยู่ใน family Xylariaceae แต่ไม่สามารถระบุได้ว่าเป็น genus หรือ species ใด เมื่อพิจารณา branch length ของ MPTs ที่ได้จากการวิเคราะห์ พบว่าราเอนโดไฟท์ D50 แสดงความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ fungal sp. DQ068353 และ foliar endophyte AY561198 ราเอนโดไฟท์จากต้น *Picea glauca* ในขณะที่แม้ว่า D55 ไม่แสดงความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อราใดๆ แต่ยังกระจายอยู่ใน family Xylariaceae (รูปที่ 36) ซึ่งปัญหาดังกล่าวคล้ายกับการศึกษาของ Guo *et al*. (2003) ที่ศึกษาราเอนโดไฟท์จากต้นสน (*Pinus tabulaeformis*) ราเอนโดไฟท์ที่แยกได้สร้างเพียงเส้นใยสีขาว จึงใช้การจัดจำแนก โดยใช้ข้อมูลทางพันธุกรรมจากส่วน ITS พบว่า จากราเอนโดไฟท์จำนวน 18 isolates ที่เลือกมาศึกษา มี 6 isolates สามารถบ่งชี้ได้เพียงว่าเป็นราเอนโดไฟท์ Xylariaceous fungi

บทบาทของราเอนโดไฟท์ *Xylaria* sp. ในพืชอาศัย คาดว่าเมื่อพืชอยู่ในภาวะสมบูรณ์ ราเอนโดไฟท์จะไม่แสดงการก่อโรคใดๆ แต่เมื่อพืชอาศัยตายลง ราเอนโดไฟท์ซึ่งอาศัยอยู่ในพืชก่อนแล้ว อาจจะทำให้สามารถเริ่มย่อยสลายซากพืชได้ก่อนเชื้อราย่อยสลายทั่วไป (decomposer) (Petrini *et al*., 1995; Whalley, 1996) เนื่องจากรา *Xylaria* sp. สามารถสร้างเอนไซม์ได้หลายชนิด เช่น cellulase, xylanase ทำให้ย่อยสลายพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Wei *et al*., 1992; Pointing *et al*., 2003)

สำหรับราเอนโดไฟท์ D44 แสดงความสัมพันธ์ใกล้ชิดมากที่สุดกับ *Eutypella scoparia* AJ302465 ราเอนโดไฟท์ที่แยกจากต้นไม้ในแถบเมดิเตอร์เรเนียน และ *E. scoparia* AF373064 แต่พบว่าค่า bootstrap value ปานกลาง (66%, รูปที่ 36) และ branch length ยาว จึงอาจจำแนกราเอนโดไฟท์ D44 เป็นรา *Eutypella* sp. ทั้งนี้หากมีข้อมูลลำดับเบส DNA ของ *Eutypella* species ต่างๆ ใช้ในการเปรียบเทียบมากขึ้น ก็อาจทำให้จัดจำแนก D44 ได้ชัดเจนจนถึงระดับ species มากขึ้น โดยทั่วไปรา *Eutypella* sp. มีรายงานว่าเป็นเชื้อราก่อโรคในพืช เช่น *Eutypella parasitica* ก่อโรค canker (Davidson and Lorenz, 1938; Jurc *et al*., 2005) แต่ก็มีรายงานถึงรา *Eutypella* sp. ที่เป็นเอนโดไฟท์ ที่แยกได้จากต้นไม้จากทางตอนเหนือของประเทศอิตาลี (Gennaro *et al*., 2003)

ราเอนโดไฟท์ N24 พบว่ามีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับ subclade ของ fungal endophyte AF413047, AF413048 และ AF413049 ที่ไม่สามารถระบุ genus หรือ species ได้ ซึ่งเป็นราเอนโดไฟท์ที่แยกมาจากแหล่งเดียวกัน โดยมีค่า bootstrap value สูงถึง 100% และมี branch length ที่สั้น บ่งบอกถึงความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิด การจัดจำแนกราเอนโดไฟท์ N24 ไม่สามารถระบุชัดเจนว่าเป็น genus หรือ species ใด เนื่องจากขาดข้อมูลลำดับเบส DNA ในการเปรียบเทียบ ดังนั้นจึงอาจบอกได้เพียงว่าราเอนโดไฟท์ N24 เป็น fungal endophyte ที่อยู่ใน order Xylariales เช่นเดียวกัน

ราเอนโดไฟท์ A1 และ M41 แสดงความสัมพันธ์ใกล้ชิดอย่างยิ่งกับเชื้อรา *Fusarium* sp. AF158302 สังเกตได้จาก branch length ที่สั้น (รูปที่ 34) ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะของ conidia แต่ราเอนโดไฟท์ A1 และ M41 ไม่แสดงความสัมพันธ์กับเชื้อ *Fusarium* ชนิดอื่นๆ โดยส่วนใหญ่จะมีการรายงานถึงเชื้อรา *Fusarium* ในด้านการก่อโรคในพืช เช่นโรคเหี่ยว (*Fusarium* wilt) ในข้าวโพดและกล้วย (Ploetz, 1990; Bacon and Hinton, 1996; Proctor *et al*., 2006) แต่ก็มีรายงานว่ารา *Fusarium* ที่พบในลักษณะเป็นราเอนโดไฟท์ได้ ยกตัวอย่างเช่น *F. moniliforme* และ *F. verticillioides* ที่แยกได้จากต้นข้าวโพด (Bacon *et al*., 2001; Yates *et al*., 2005)

ราเอนโดไฟท์ใน order Diaporthales ได้แก่ D15 และ D53 ซึ่งไม่สร้างโครงสร้างการสืบพันธุ์ใดๆ จึงจำเป็นต้องใช้ข้อมูลของส่วน ITS เพียงอย่างเดียว พบว่าแสดงความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับรา *Phomopsis* sp. และ *Diaporthe* sp. ซึ่งเป็น anamorph-teleomorph กัน (Nevena *et al*., 1997; Kirk *et al*., 2001) จาก branch length ที่สั้นมาก ซึ่งแสดงว่าราเอนโดไฟท์ทั้ง 2 isolates มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันกับ *Phomopsis* และ *Diaporthe* (รูปที่ 35) เนื่องจากราเอนโดไฟท์ทั้ง 2 isolates ไม่สร้าง conidia หรือ ascospore ดังนั้นจึงอาจจัดจำแนกราเอนโดไฟท์ D15 และ D53 ว่าเป็นรา *Phomopsis* sp. Schwarz *et al*. (2004) ได้ทำการศึกษาถึงราเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์ต้านไส้เดือนฝอย ชนิด *Meloidogyne incognita* พบปัญหาในทำนองเดียวกันว่าราเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์ต้านไส้เดือนฝอย เมื่อจัดจำแนกด้วยข้อมูลทางพันธุกรรม จากส่วน ITS, 18S และ 28S rDNA พบว่าเชื้อราที่มีความใกล้เคียงมีทั้งชนิด *Phomopsis* sp. และ *Diaporthe* sp. โดยแสดงความใกล้เคียงที่สุดกับรา *Diaporthe phaseolorum* แต่เมื่อทางคณะผู้วิจัยศึกษาทางด้านสัณฐานวิทยาของราเอนโดไฟท์ดังกล่าว โดยเลี้ยงบนอาหาร Yeast Malt Glucose Agar (YMG) และ Corn Meal Agar (CMA) พบว่าราเอนโดไฟท์สร้างโครงสร้าง β-conidia ซึ่งบ่งชี้ว่าเป็นรา *Phomopsis* sp. ดังนั้นจึงต้องจำแนกราเอนโดไฟท์เป็น *Phomopsis phaselorum* ซึ่งกรณีดังกล่าวอาจเรียกได้ว่าเชื้อราทั้งสองชนิดเป็น species complex (Zhang *et al*., 1998) Rodrigues *et al*. (2000) รายงานถึงราเอนโดไฟท์ *Phomopsis*

sp. ที่แยกจากต้น *Spondias mombin* ว่าสารสกัดจากรา *Phomopsis* sp. มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา *Cladosporium elatum*, *Mycotypha* sp. และ *Saccharomyces cerevisae* สำหรับการรายงานถึงฤทธิ์ทางชีวภาพด้านอื่นๆ ของราเอนโดไฟท์ *Phomopsis* sp. พบว่าสามารถผลิตสาร phomoxanthones A ซึ่งมีผลยับยั้งแบคทีเรีย และเชื้อราก่อโรคพืชได้ (Elsässer *et al*., 2005) และยังพบว่ารา *P. amaranth* สามารถใช้ในการควบคุมหญ้าวัชพืชชนิด *Amaranthus* sp. ได้เป็นอย่างดี (Ortiz-Ribbing, and Williams, 2006)

ราเอนโดไฟท์ D12 แสดงความสัมพันธ์ใกล้ชิดมากที่สุดกับเชื้อรา *Curvularia oryzae* AF163083 แต่อย่างไรก็ตามด้วยค่าความเชื่อมั่น bootstrap value ปานกลาง (66%, รูปที่ 37) และความยาวของ branch length ทำให้ยังไม่สามารถบ่งชี้ได้ชัดเจนว่าราเอนโดไฟท์ D12 เป็นเชื้อรา *Curvularia oryzae* หรือไม่ ดังนั้นจึงอาจจัดจำแนกราเอนโดไฟท์ D12 เป็นเชื้อรา *Curvularia* sp. เนื่องจากราเอนโดไฟท์ D12 ปรากฏอยู่บน clade ที่ประกอบด้วย *Curvularia* หลายชนิด ทั้งนี้เคยมีรายงานการศึกษาถึงเชื้อรา *Curvularia* sp. ที่เป็นราเอนโดไฟท์ ของพืชสมุนไพรจากประเทศอินเดีย (Raviraja, 2005; Teles *et al*., 2005)

สำหรับการจัดจำแนกราเอนโดไฟท์ใน order Eurotiales พบว่าแยกได้เป็นสองกลุ่มคือ ราเอนโดไฟท์ D2 ที่แสดงความสัมพันธ์กับเชื้อรา *Aspergillus* sp. และราเอนโดไฟท์ A2, A67 และ A71 ที่มีความสัมพันธ์กับเชื้อรา *Pencillium* sp.โดยราเอนโดไฟท์ D2 แสดงความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับรา *A. aculeatus* AJ280002, AJ280003 และ AJ280004 (รูปที่ 38) อย่างไรก็ตามเนื่องจากเชื้อ *A. aculeatus* และ *A. japonicus* มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลำดับเบส DNA ของส่วน ITS ที่คล้ายคลึงกันมาก ทำให้เชื้อราทั้ง 2 ชนิดมักจะจับกลุ่มอยู่ด้วยกันบน phylogenetic tree (Pařenicová *et al*., 2001; Jonniaux *et al*., 2002) ดังนั้นจึงอาจจัดจำแนกราเอนโดไฟท์ D2 ว่าเป็น *A. aculeatus* การพบราเอนโดไฟท์ *A. aculeatus* นั้นสอดคล้องกับการรายงานของ Campos *et al*. (2005) ที่ศึกษาสารเคมีจากน้ำเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟท์ *A. aculeatus* ที่แยกได้จากใบของต้น *Melia azedarach*

มีรายงานถึงรา *Aspergillus* spp. ที่เป็นราเอนโดไฟท์ ตัวอย่างเช่น *A. parasiticus* ที่แยกได้จากต้น *Sequoia sempervirens* และสร้างสาร sequoiatones และ sequoiamonascins ซึ่งมีความเป็นพิษต่อเซลล์ และมีฤทธิ์ต้านมะเร็งได้ (Stierle *et al*., 1999; 2003) ราเอนโดไฟท์ *A. niger* ที่แยกได้จากหญ้าแพรก (*Cyndon dactylon*) สามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลายชนิด เช่นมีความเป็นพิษต่อเซลล์ (Shen *et al*., 2006) โดยเฉพาะอย่างยิ่งมีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์หลายชนิดได้แก่ *Bacillus subtilis, Escherichia coli, Pseudomonas fluorescens, Trichophyton rubrum* และ *Candida albicans*

ได้ โดยสารบริสุทธิ์ที่สกัดได้มีค่า MIC ที่ยับยั้งได้ในช่วง 1.9-31.2 µg/ml (Song *et al*., 2004) ซึ่งพบว่ามีความใกล้เคียงกับในการวิจัยครั้งนี้ที่พบว่า สารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟท์ *A. aculeatus* D2 มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus* ATCC25923, MRSA และเชื้อรา *M. gypseum* ซึ่งมีค่า MIC อยู่ในช่วง 16-128 µg/ml

จากการจัดจำแนกด้วยข้อมูลทางพันธุกรรม พบว่าราเอนโดไฟท์ A2 แม้ว่าจะมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อรา *Penicillium* หลายชนิด แต่พบว่าไม่มีชนิดใด ที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดมากที่สุด (รูปที่ 38) ดังนั้นจึงอาจจัดจำแนกราเอนโดไฟท์ A2 ได้เพียงว่าเป็นเชื้อรา *Penicillium* sp. เท่านั้น ทั้งนี้มีรายงานการแยกรา *Penicillium* sp. จากพืชหลายชนิด เช่น แยก *Penicillium* sp. จากพืช *M. azedarach* (dos Santos and Rodrigues-Fo, 2003), *Penicillium coffeae* ซึ่งเป็นราเอนโดไฟท์ชนิดใหม่ ที่แยกได้จากต้นกาแฟ (*Coffea arabica*) (Peterson *et al*., 2005) เป็นต้น สำหรับราเอนโดไฟท์ A67 และ A71 แสดงความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับรา *Pencillium paxilli* AF033426 และ *P. paxilli* AY787847 เมื่อดูจาก branch length ที่สั้น และค่าความเชื่อมั่น bootstrap value ที่สูงทำให้สามารถบ่งชี้ได้ว่าราเอนโดไฟท์ A67 และ A71 น่าจะเป็นรา *Penicillium paxilli* ซึ่งโดยทั่วไปเป็นเชื้อราที่พบอยู่ในดิน (soil fungi) (Yong *et al*., 2001) ดังนั้นจึงอาจจะเป็นการรายงานครั้งแรกถึงรา *P. paxilli* ที่เป็นราเอนโดไฟท์ เนื่องจากยังไม่พบรายงานของรา *P. paxilli* ในลักษณะที่เป็นราเอนโดไฟท์ และจากการนำสารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟท์ทั้ง 2 isolates นี้ไปตรวจวิเคราะห์ NMR profile พบว่ามีความใกล้เคียงกันมากที่สุดคล้ายกับเป็นเชื้อชนิดเดียวกัน ซึ่งสอดคล้องกับการวิเคราะห์โดยใช้ข้อมูลจากลำดับเบสส่วน ITS (ข้อมูลไม่ได้แสดงไว้) การศึกษาเกี่ยวกับรา *P. paxilli* มักเกี่ยวข้องกับสาร paxilline ที่เชื้อราสร้างขึ้น ซึ่งเป็นสารตัวกลาง (intermediate) สำหรับการผลิตสารพิษของเชื้อรา (mycotoxin) (Young *et al*., 2001; Shibayama *et al*., 2002)

สำหรับราเอนโดไฟท์ที่สร้างสารต้านจุลินทรีย์ที่กระจายใน order Dothideomycetes *et* Chaetothyriomycetes *incertae sedis* พบว่ามีจำนวนถึง 6 isolates (A4, A5, D3, D9, D13 และ M76) โดยมี 4 isolates ได้แก่ A4, A5, D3 และ D9 ที่แสดงความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับเชื้อรา *Guignardia* sp. และ *G. mangiferae* (รูปที่ 39) และยังพบว่ามีความใกล้ชิดกับ fungal endophyte AY601899 ซึ่งแยกได้จากใบของต้นกาแฟ (*Coffea arabica*) จากค่า bootstrap value ที่สูง (100%) และ branch length ที่สั้น ทำให้สามารถจัดจำแนกราเอนโดไฟท์ทั้ง 4 isolates คาดว่าจะเป็นรา *G. mangiferae* ซึ่งพบว่า *G. mangiferae* เป็นราเอนโดไฟท์ในพืชหลายชนิด และไม่ก่อให้เกิดโรคใดๆ โดยพบทั้งในยุโรป อเมริกา ประเทศในเขตอบอุ่น และเขตร้อนชื้น (Baayen *et al*., 2002; Suryanarayanan *et al*.,

2004) และยังมีรายงานถึง *Guignardia* sp. อื่นๆ พบว่าเป็นราเอนโดไฟท์ในพืชด้วยเช่นกัน (Okane *et al*., 2001; Glienke-Blanco *et al*., 2002; Gao *et al*., 2005) รายงานของ Rodrigues et al. (2000) พบว่า *Guignardia* sp. ที่แยกจากต้น *Spondias mombin* สามารถยับยั้ง *E. coli, S. aureus, Saccharomyces cerevisiae, Geotrichum sp.* และ *Penicillium canadensis* ได้

ส่วนราเอนโดไฟท์ M76 แสดงความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับ *Botryosphaeria* sp. หลายชนิด และใกล้ชิดกับ *Botryosphaeria mamane* AF246929 และ AF246930 มากที่สุดโดยมี bootstrap value สูงถึง 100% และ branch length สั้น (รูปที่ 39) แต่อย่างไรก็ตามพบว่าค่า %Identity ของลำดับเบส DNA ระหว่างราเอนโดไฟท์ M76 กับเชื้อรา *B. mamane* ทั้งสอง isolates ไม่สูงนัก (99.3%, ตารางที่ 14) ดังนั้นจากการศึกษาครั้งนี้ จึงอาจสามารถจัดจำแนกราเอนโดไฟท์ M76 ว่าเป็นเชื้อรา *Botryosphaeria* sp.

สำหรับราเอนโดไฟท์ D13 แสดงความสัมพันธ์ใกล้ชิดมากที่สุดกับเชื้อรา *Fusicoccum* sp. AY615189 และ AY615190 ซึ่งเป็นเชื้อราที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาทางด้านโรคพืชในมะม่วง (*Mangifera indica*) และยังแสดงความสัมพันธ์รองลงไปกับเชื้อรา *Fusicoccum stromaticum* AY693974 ซึ่งเป็นราที่แยกได้จากต้น *Cassia* และต้นยูคาลิปตัสในประเทศ เวเนซุเอลา ดังนั้นจึงอาจจัดจำแนกราเอนโดไฟท์ D13 ได้ในระดับ genus ว่าเป็นเชื้อรา *Fusicoccum* sp. โดยทั่วไปรา *Fusicoccum* sp. เป็นระยะ anamorph ของรา *Botryosphaeria* sp. (Pennycook and Samuels, 1985; Krik *et al*., 2001; Zhou and Stanosz, 2001) ซึ่งพบว่าเป็นทั้งเชื้อราก่อโรคในพืช ตัวอย่างเช่น เชื้อรา *Fusicoccum amygdali* สามารถสร้างสารพิษที่เป็นสาเหตุของโรคเหี่ยว (wilting toxins) ในต้น peach และ almond ได้ (Barrow and Chain, 1969) และ *F. arbuti* ที่สามารถก่อโรค cankers ในต้น *Arbutus menziesii* (Farr *et al*., 2005) และมีรายงานว่า *F. eucalypti* เป็นราเอนโดไฟท์จากส่วนดอกและผลของต้นยูคาลิปตัส (*Eucalyptus globules*) ในประเทศอุรุกวัย (Lupo *et al*., 2001) ส่วนเชื้อรา *Botryosphaeria* sp. แม้พบว่าเป็นสาเหตุสำคัญของโรค canker และ die-back ของต้นยูคาลิปตัส มะม่วง องุ่น และพืชอื่นๆ อีกหลายชนิด (Denman *et al*., 2003; Slippers *et al*., 2005; Taylor *et al*., 2005) แต่ก็พบเชื้อราชนิดนี้ในลักษณะราเอนโดไฟท์อีกด้วย เช่น รายงานของ Slippers *et al*. (2004) แยกรา *Botryosphaeria* sp. จากต้นยูคาลิปตัส และแยก *B. dothidea* จากต้นยูคาลิปตัส (*Eucalyptus grandis* และ *E. nitens*) ในประเทศแอฟริกาใต้ (Smith *et al*., 1996) อย่างไรก็ตามเนื่องจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อกลุ่มนี้มีความหลากหลายมาก ทำให้การจำแนกทำได้ยาก ดังนั้นจึงใช้ข้อมูลในส่วนของ ITS เพื่อช่วยใช้ในการจัดจำแนก และบ่งชี้ในระดับ species ได้ (Slipper *et al*., 2004; Alves *et al*., 2005)