สัณฐานวิทยา คุณสมบัติการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับระบุเชื้อรา *Ophiocordyceps sobolifera* (Hill ex Watson) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora (Ophiocordycipitaceae)

วิทยานิพนธ์

ของ

ศศิธร ธงชัย

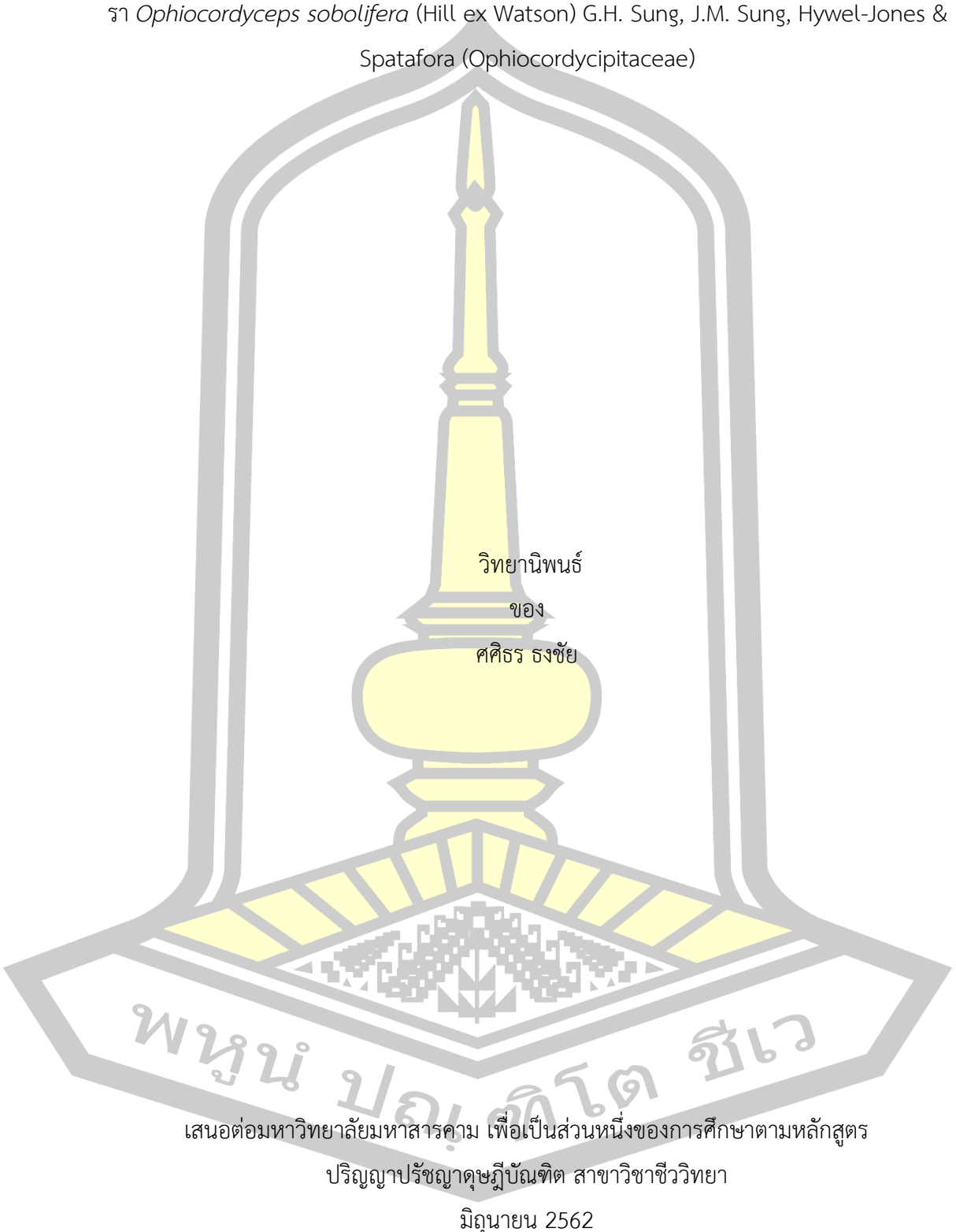
เสนอต่อมหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

มิถุนายน 2562

สงวนลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

สัณฐานวิทยา คุณสมบัติการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับระบุเชื้อรา *Ophiocordyceps sobolifera* (Hill ex Watson) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora (Ophiocordycipitaceae)



วิทยานิพนธ์

ของ

ศศิธร ธงชัย

เสนอต่อมหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

มิถุนายน 2562

สงวนลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

Morphological, Antibacterial Properties and Development of Molecular Marker for Identification of *Ophiocordyceps sobolifera* (Hill ex Watson) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora (Ophiocordycipitaceae)

Sasithorn Thongchai

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of Requirements

for Doctor of Philosophy (Biology)

June 2019

Copyright of Mahasarakham University

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ของนางสาวศศิธร ธงชัย แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา ของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผศ. ดร. วิยะดา มงคลธนารักษ์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รศ. ดร. อภิเดช แสงดี)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผศ. ดร. กุสาวดี แสงดี)

.....กรรมการ
(รศ. ดร. ขนิษฐา สมตระกูล)

.....กรรมการ
(รศ. ดร. ขวัญเรือน นาคสุวรรณ์กุล)

มหาวิทยาลัยอนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา ของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

.....
(ศ. ดร. ไพโรจน์ ประมวล)
คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

.....
(ผศ. ดร. กริสน์ ชัยมูล)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อเรื่อง สัณฐานวิทยา คุณสมบัติการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับระบุเชื้อรา *Ophiocordyceps sobolifera* (Hill ex Watson) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora (Ophiocordycipitaceae)

ผู้วิจัย ศศิธร ธงชัย

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร. อภิเดช แสงดี

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กุสาวดี แสงดี

ปริญญา ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต **สาขาวิชา** ชีววิทยา

มหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหาสารคาม **ปีที่พิมพ์** 2562

บทคัดย่อ

Ophiocordyceps sobolifera (*O. sobolifera*) จัดเป็นเชื้อราแมลงที่เข้าทำลายตัวอ่อนจักจั่นที่สามารถพบได้ในหลายพื้นที่ของประเทศไทย แต่ยังมีข้อมูลในการศึกษาการใช้ประโยชน์ของเชื้อราชนิดดังกล่าวเพื่อประโยชน์ทางการแพทย์และการเกษตรในวงจำกัด ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสัณฐานวิทยา ศึกษาคุณสมบัติการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับระบุชนิดเชื้อรา *O. sobolifera* โดยในการทดลองได้คัดแยกเชื้อราจากตัวอ่อนจักจั่นและระบุชนิดเป็นเชื้อรา *O. sobolifera* จำนวน 42 ไอโซเลท โดยการใช้ข้อมูลจากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ITS เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่า เชื้อรา *O. sobolifera* มีสโตรมาสีน้ำตาลอมชมพู รูปร่างทรงกระบองยาว (cylindric) ส่วนปลายพองออกเป็นกระเปาะรูปร่างค่อนข้างกลม (subglobose) โผล่งอกออกมาจากส่วนหัวของโฮสต์ เพอริทีเชียมีรูปไข่หรือคล้ายหยดน้ำ ฝังตัวอยู่ภายในสโตรมาทั้งหมด (immersed perithecia) ถุงหุ้มสปอร์ (ascus) รูปร่างทรงกระบอกยาว ใสไม่มีสี มีผนังชั้นเดียว (unitunicate) ส่วนปลายของถุงหุ้มสปอร์พบช่องเปิด (asci apex หรือ asci cap) พบโคนิเดียรูปร่างรีคล้ายเม็ดข้าวสาร ขนาดประมาณ 1.5-2 x 2-4 ไมโครเมตร และเมื่อศึกษาลักษณะของโคโลนีบนอาหารสังเคราะห์ พบว่า โคโลนีของเชื้อราที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) มีการเจริญช้า โคโลนีสีชมพู-ขาว อัดแน่นคล้ายกำมะหยี่ เมื่อแก่พบการสร้าง spore mass สีน้ำตาลเข้มบริเวณกึ่งกลางโคโลนี เมื่อทำการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี agar well diffusion พบว่า สารสกัดเส้นใยและสารสกัดโปรตีนจากเชื้อรา *O. sobolifera* จำนวน 16 ไอโซเลท สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีที่สุด โดยเฉพาะ

แบคทีเรียในกลุ่มแกรมบวก (gram positive bacteria) ได้แก่ *Staphylococcus aureus* ทั้งสายพันธุ์ที่ไวและดื้อต่อยาเมธิซิลิน รวมทั้งแบคทีเรีย *Bacillus cereus* อย่างไรก็ตามพบว่า ไอโซเลทที่ให้ผลการยับยั้งดีที่สุดคือ เชื้อรา *O. sobolifera* ไอโซเลท Cod-NB1302 และเมื่อนำโปรตีนจากเชื้อรา *O. sobolifera* มาวิเคราะห์ด้วยวิธี SDS-PAGE พบความแตกต่างแถบโปรตีนของเชื้อรา *O. sobolifera* ในกลุ่มที่มีฤทธิ์ยับยั้งและไม่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย โดยพบแถบโปรตีนขนาด 30 kDa เฉพาะในกลุ่มเชื้อที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย จึงได้นำแถบโปรตีนดังกล่าวจากเชื้อรา *O. sobolifera* ไอโซเลท Cod-NB1302 มาระบุชนิดและวิเคราะห์หาลำดับกรดอะมิโน พบว่า ลำดับกรดอะมิโนที่ได้มีความคล้ายคลึงกับเอนไซม์ superoxide dismutase -1 (SOD1) และเมื่อทำการออกแบบเครื่องหมายโมเลกุลในการระบุชนิดของเชื้อรา *O. sobolifera* ด้วยวิธี RAPD พบว่า ไพรเมอร์ OPT13 สามารถสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างระหว่างเชื้อรา *O. sobolifera* และเชื้อราชนิดอื่นๆ ที่คัดแยกได้จากตัวอ่อนจักจั่น จากนั้นทำการคัดเลือกแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างดังกล่าวจำนวน 2 ขนาด คือ แถบดีเอ็นเอขนาด 153 bp (lower band) และแถบดีเอ็นเอขนาด 373 bp (upper band) สำหรับนำมาออกแบบพัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรมชนิด RAPD-SCAR primer ผลการศึกษาพบว่า สามารถออกแบบไพรเมอร์ได้จำนวน 4 คู่ แต่มีไพร์เมอร์ SpsoL_f01 และ SpsoL_r01 เพียงคู่เดียวที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อรา *O. sobolifera* ได้อย่างจำเพาะและไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อราชนิดอื่นๆ และเมื่อนำมาทดสอบความไวในการตรวจหาเชื้อรา *O. sobolifera* พบว่า ปริมาณดีเอ็นเอที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจพบได้มีค่าเท่ากับ 5.84 พิโคกรัม และยังพบว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบขึ้นสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับเชื้อรา *O. sobolifera* ได้ทุกตัวอย่างที่นำมาทดสอบ

คำสำคัญ : เครื่องหมายโมเลกุล, ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย, Ophiocordyceps sobolifera, Staphylococcus aureus

พหุน ปณฺฑิโต ชีเว

TITLE Morphological, Antibacterial Properties and Development of Molecular Marker for Identification of *Ophiocordyceps sobolifera* (Hill ex Watson) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora (Ophiocordycipitaceae)

AUTHOR Sasithorn Thongchai

ADVISORS Associate Professor Aphidech Sangdee , Ph.D.

Assistant Professor Kusavadee Sangdee , Ph.D.

DEGREE Doctor of Philosophy **MAJOR** Biology

UNIVERSITY Mahasarakham University **YEAR** 2019

ABSTRACT

Ophiocordyceps sobolifera is an entomopathogenic fungus that infected of dead cicada nymphs has been found from various location in Thailand, however, the available information on bioactivities in medical and agricultural benefits are limited. Therefore, the objective of this study was to study on its morphological characters, to evaluate of antibacterial activity and to development of molecular marker for identification of *O. sobolifera*. In this study, forty-two isolates of an entomopathogenic fungus were isolated and identified as *O. sobolifera* based on ITS gene sequencing. The morphological observation found that the fungus *O. sobolifera* has pink-brownish, cylindrical and subglobose shape of stroma that grows arising from head regions of insect host. Perithecia has oval-shaped and completely immersed in stroma. Ascus has long cylindrical shape with a unitunicate wall, hyaline and found ascus cap at tip. Conidia has long eliliosoidal approximately 1.5-2 x 2-4 μm in size. The colony characteristics on potato dextrose agar (PDA) were extremely slow-growing, colonies white to pink at beginning and becoming brown-black with spore mass. The antibacterial activity of this fungus was investigated by agar well diffusion method. The results showed that mycelial extract and crude protein extracted from 16 isolates of *O. sobolifera* had good inhibitory effect against Gram-positive bacteria including

Bacillus cereus and both of methicillin resistant- and susceptible *Staphylococcus aureus*. Among them, the isolate Cod-NB1302 had the highest inhibitory effect. The protein pattern of these isolates were also determined using SDS-PAGE. The different protein patterns were observed between the active and non-active strains. The extra-protein band approximately size at 30 kDa was observed in the active strains. Therefore, the 30 kDa protein band of the isolate Cod-NB1302 was chosen for protein identification by amino acid sequencing. Based on the novel amino acid sequence performed, it was identified as superoxide dismutase -1 (SOD1). In addition, the molecular marker for identification of the fungus *O. sobolifera* was also developed by RAPD method. The results showed that the OPT13 random primer able to generate different DNA fingerprints of *O. sobolifera*, compared with other fungal strains that also isolated from cicada nymphs. A 153 bp (lower band) and 373 bp (upper band) bands that dominated in DNA fingerprinting of *O. sobolifera* were used for development of the specific primer by RAPD-SCAR primer. Four specific primers were designed; however, only SpsoL_f01/SpsoL_r01 primer could generate the target amplicon of *O. sobolifera* approximately size at 118 bp without non-specific bands after applied to other tested species. Moreover, this primer showed high sensitivity to detect the genomic DNA of *O. sobolifera* at lowest concentration as 5.84 pg and able to apply in all tests strains of *O. sobolifera*.

Keyword : Molecular marker, Antibacterial activity, Ophiocordyceps sobolifera, Staphylococcus aureus

พหุน ปณ ฑิโต ชีเว

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยความกรุณาและความช่วยเหลืออย่างสูงจากรองศาสตราจารย์ ดร.อภิเดช แสงดี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กุสาวดี แสงดี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้โอกาสในการเรียนรู้ การทำงานวิจัยด้านเชื้อราและชีวโมเลกุลทางด้านเชื้อรา พร้อมทั้งประสิทธิประสาทความรู้ ให้คำแนะนำในการวิจัย ช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ และให้กำลังใจด้วยดีตลอดระยะเวลาการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิยะดา มงคลธนารักษ์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประธานกรรมการ (ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก) รองศาสตราจารย์ ดร.ขนิษฐา สมตระกูล และรองศาสตราจารย์ ดร.ขวัญเรือน นาคสุวรรณ์กุล กรรมการระดับบัณฑิตศึกษา ที่ให้คำแนะนำในการวิจัย ช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ และให้กำลังใจเป็นอย่างดีตลอดมา

ขอขอบพระคุณอธิการบดีมหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี ที่ให้ทุนพัฒนาบุคลากรเพื่อศึกษาต่อในระดับปริญญาเอก คณบดีคณะวิทยาศาสตร์ ประธานกรรมการบริหารหลักสูตร และคณาจารย์สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี ที่ให้ความช่วยเหลือ สนับสนุน ให้คำแนะนำในการลาศึกษาต่อและการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการปรีคลินิก (SC2-202) คณะแพทยศาสตร์ ห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุล (SC2-203) และห้องปฏิบัติการวิจัยเฉพาะทาง (SC2-408/5) ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ในการอำนวยความสะดวกในการทำวิทยานิพนธ์

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อสุรพงษ์ ธงชัย คุณแม่คนิดา ธงชัย และครอบครัวธงชัย ที่เสียสละสนับสนุนทุนด้านการศึกษา ให้คำแนะนำและให้กำลังใจตลอดระยะเวลาการศึกษาต่อในระดับปริญญาเอก

ความดีทั้งหลายแห่งวิทยานิพนธ์นี้ ขอมอบแด่ บิดา-มารดา ครู อาจารย์ทุกท่าน ที่อบรมสั่งสอนประสิทธิ์ประสาทความรู้และวิชาการแก่ผู้วิจัยตลอดระยะเวลาการศึกษาในระดับปริญญาเอก

ศศิธร ธงชัย

พหูน ปณฺฑิโต ชีเว

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ฉ

กิตติกรรมประกาศ ..... ซ

สารบัญ ..... ฌ

สารบัญตาราง ..... ฏ

สารบัญภาพ ..... ฑ

บทที่ 1 1

บทนำ 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของการวิจัย 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 4

1.3 ขอบเขตของการวิจัย 4

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 5

บทที่ 2 6

ปริทัศน์เอกสารข้อมูล 6

2.1 อนุกรมวิธานเชื้อรา *Ophiocordyceps sobolifera* (*O. sobolifera*) 6

2.2 ลักษณะทั่วไปและวงจรชีวิตของเชื้อราในสกุล *Ophiocordyceps* 7

2.3 ชีววิทยาของเชื้อรา *O. sobolifera* 11

2.4 ประโยชน์และความสำคัญของเชื้อรา *O. sobolifera* 12

2.5 การจำแนกชนิดเชื้อราในสกุล *Ophiocordyceps* 15

2.6 เครื่องหมายโมเลกุลสำหรับจำแนกชนิดเชื้อรา 17

2.7 การระบุชนิดเชื้อรา *Ophiocordyceps* sp. โดยอาศัยเทคนิคเครื่องหมายโมเลกุล 20

บทที่ 3 22
วิธีดำเนินการวิจัย 22
3.1 ตัวอย่างเชื้อราที่ใช้ในการศึกษา 22
3.2 การระบุชนิดของเชื้อรา 22
3.3 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญบนอาหารสูตรสังเคราะห์ 23
3.4 การทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี agar well diffusion 24
3.5 การวิเคราะห์ขนาดและชนิดของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE และ GC-MS/MS 28
3.6 การออกแบบเครื่องหมายโมเลกุลด้วยวิธี random amplified polymorphic DNA-sequence characterized amplified region (RAPD-SCAR) 29
3.7 การทดสอบความจำเพาะของเครื่องหมายโมเลกุล RAPD-SCAR (specificity of primer) 33
3.8 การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่องหมายโมเลกุล RAPD-SCAR (validation of primer) 33
3.9 การทดสอบความไวของเครื่องหมายโมเลกุล RAPD-SCAR (sensitivity of primer) 34
3.10 การนำเครื่องหมายโมเลกุล RAPD-SCAR ไปใช้ในการระบุชนิดของเชื้อรา *O. sobolifera* 35
3.11 การวิเคราะห์ข้อมูล 35
บทที่ 4 36
ผลการวิจัย 36
4.1 การแยกเชื้อราและระบุชนิดเชื้อรา *O. sobolifera* จากตัวอย่างจักจั่น 36
4.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *O. sobolifera* 39
4.3 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากเชื้อรา *O. sobolifera* 49
4.4 ระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (minimum inhibitory concentration: MIC) และระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (minimum bactericidal concentration: MBC) ของสารสกัดจากเชื้อรา *O. sobolifera* 64
4.5 การวิเคราะห์ขนาดและชนิดของโปรตีนจากเชื้อรา *O. sobolifera* 69
4.6 การออกแบบเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับระบุชนิดของเชื้อรา *O. sobolifera* 71

4.7 การทดสอบความจำเพาะของเครื่องหมายโมเลกุล RAPD-SCAR ที่ออกแบบขึ้น (specificity of primer) 84
4.8 การหาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่องหมายโมเลกุล RAPD-SCAR ที่ออกแบบขึ้น (validation of primer) 85
4.9 การทดสอบความไวของเครื่องหมายโมเลกุล RAPD-SCAR ที่ออกแบบขึ้น (sensitivity of primer) 88
4.10 การนำเครื่องหมายโมเลกุล RAPD-SCAR ที่ออกแบบขึ้นไปใช้ในการระบุชนิดเชื้อรา *O. sobolifera* 89
บทที่ 5 92
อภิปราย สรุป และข้อเสนอแนะ 92
5.1 อภิปรายผลการทดลอง 92
5.2 สรุปผลการทดลอง 96
5.3 ข้อเสนอแนะ 99
บรรณานุกรม 100
ภาคผนวก 111
ประวัติผู้เขียน 150

พหูน ปณ ฑิโต ชีเว

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 แสดงชื่อและลำดับเบสของไพร์เมอร์แบบสุ่มที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี RAPD 30

ตารางที่ 2 แสดงรหัสไอโซเลทและจำนวนเชื้อราที่คัดแยกได้จากพื้นที่จังหวัดขอนแก่น 36

ตารางที่ 3 การจัดกลุ่มลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Potato dextrose agar (PDA)... 42

ตารางที่ 4 การจัดกลุ่มลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Sabouraud dextrose agar (SDA) 43

ตารางที่ 5 การจัดกลุ่มลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Malt extract agar (MEA)..... 44

ตารางที่ 6 การจัดกลุ่มลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Yeast malt agar (YMA)..... 45

ตารางที่ 7 การจัดกลุ่มลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Czapek Dox agar (CDA) 46

ตารางที่ 8 การจัดกลุ่มลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Oat meal agar (OMA)..... 47

ตารางที่ 9 การจัดกลุ่มลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Homogenized died cricket glucose agar (HCGA) 48

ตารางที่ 10 ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคของสารสกัดเส้นใย (mycelial extract) เชื้อรา O. sobolifera ด้วยวิธี agar well diffusion 51

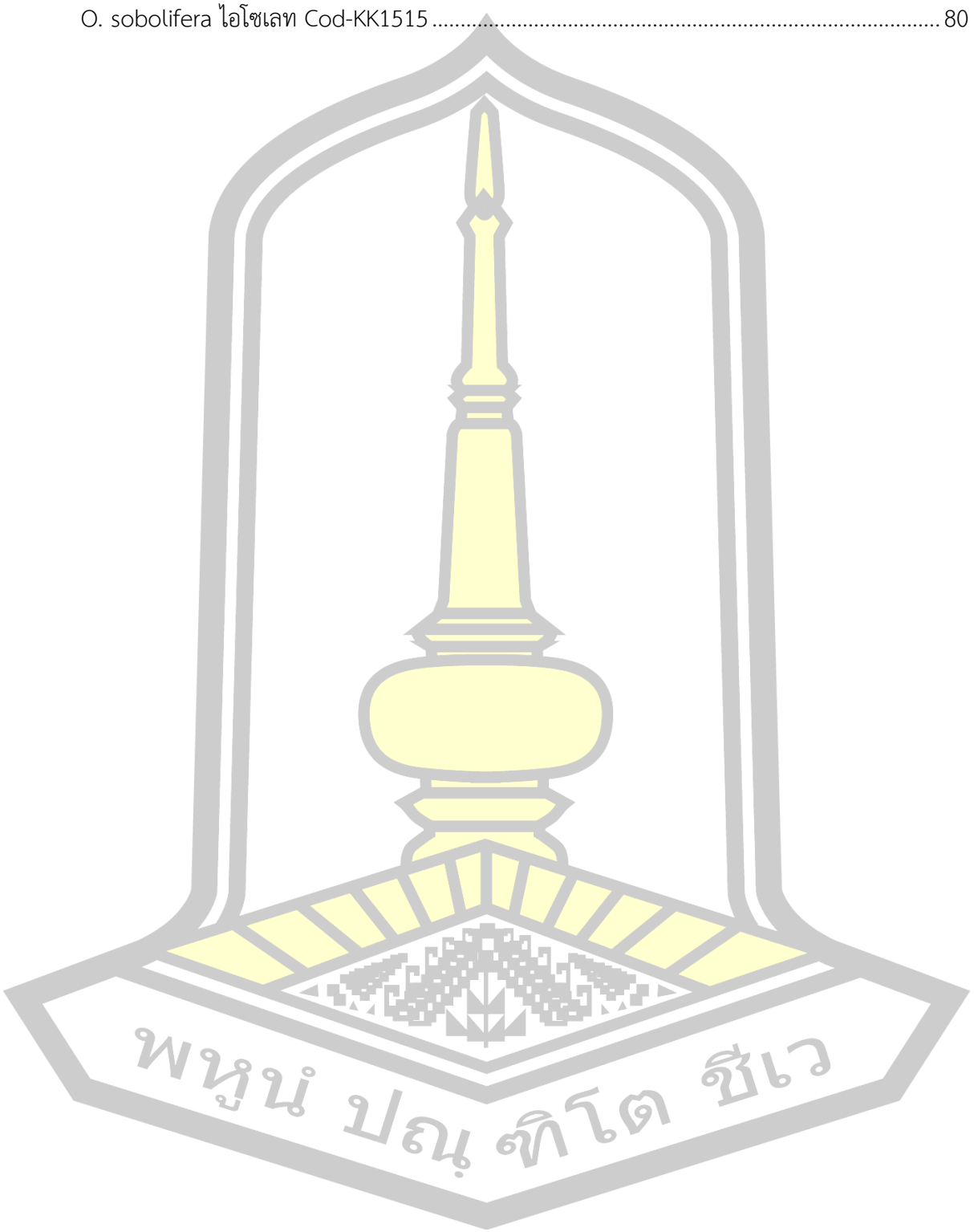
ตารางที่ 11 ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดโปรตีน (crude protein) จากเชื้อรา O. sobolifera ด้วยวิธี agar well diffusion 56

ตารางที่ 12 เปรียบเทียบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดเส้นใยและสารสกัดโปรตีนของเชื้อรา O. sobolifera ด้วยวิธี agar well diffusion 57

ตารางที่ 13 ระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (MIC) ของสารสกัดเส้นใยและสารสกัดโปรตีนจากเชื้อรา O. soobolifera..... 66

ตารางที่ 14 ระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC) ของสารสกัดเส้นใยและสารสกัดโปรตีนจากเชื้อรา O. sobolifera 68

ตารางที่ 15 รายละเอียด RAPD-SCAR primer ที่ออกแบบขึ้นจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อรา O. sobolifera ไอโซเลท Cod-KK1515 80



สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 ลักษณะโครงสร้างของเชื้อราสกุล Ohiocordyceps 8

ภาพที่ 2 ลักษณะโครงสร้างภายในของเชื้อราสกุล Ohiocordyceps 8

ภาพที่ 3 ลักษณะส่วนสโตรมาของเชื้อราสกุล Ophiocordyceps ที่พบบนโฮสต์แต่ละชนิด..... 10

ภาพที่ 4 วงชีวิตโดยทั่วไปของเชื้อราสกุล Ophiocordyceps ในโฮสต์จักจั่น..... 11

ภาพที่ 5 โครงสร้างของเชื้อรา O. sobolifera..... 12

ภาพที่ 6 ตัวอย่างสัณฐานวิทยาของเชื้อรา O. septa..... 15

ภาพที่ 7 บริเวณตำแหน่งของยีนที่ใช้ในการจำแนกสิ่งมีชีวิตในแต่ละลำดับอนุกรมวิธาน..... 17

ภาพที่ 8 โครงสร้างยีนส่วน nuclear ribosomal DNA และชนิดไพรเมอร์ที่ใช้ในการระบุชนิดเชื้อรา 17

ภาพที่ 9 สายสัมพันธ์วิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ของเชื้อราที่แยกได้จากตัวอ่อนจักจั่น 38

ภาพที่ 10 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกของเชื้อรา O. sobolifera..... 39

ภาพที่ 11 ลักษณะความแปรผันของโครงสร้างส่วนสโตรมาที่พบในเชื้อรา O. sobolifera 40

ภาพที่ 12 ลักษณะของเชื้อรา O. sobolifera ไอโซเลท Cod-KK1528 41

ภาพที่ 13 ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา O. sobolifera เมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร PDA เป็นเวลา 20 วัน 43

ภาพที่ 14 ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา O. sobolifera เมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร SDA เป็นเวลา 20 วัน 44

ภาพที่ 15 ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา O. sobolifera เมื่อเลี้ยงบนอาหาร MEA เป็นเวลา 20 วัน..... 45

ภาพที่ 16 ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา O. sobolifera เมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร YMA เป็นเวลา 20 วัน 46

ภาพที่ 17 ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา O. sobolifera เมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร CDA เป็นเวลา 20 วัน 47

ภาพที่ 18 ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา O. sobolifera เมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร OMA เป็นเวลา 20 วัน 48

ภาพที่ 19 ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา O. sobolifera เมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร HCGA เป็นเวลา 20 วัน 49

ภาพที่ 20 บริเวณการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย B. cereus ATCC11778 ของสารสกัดเส้นใยเชื้อรา 50

ภาพที่ 21 บริเวณการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย S. aureus MRSA DMST20651 ของสารสกัดเส้นใย..... 51

ภาพที่ 22 บริเวณการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย B. cereus ATCC11778 ของสารสกัดโปรตีนจากเชื้อรา 59

ภาพที่ 23 บริเวณการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย S. aureus MRSA DMST4783 ของสารสกัดโปรตีนจาก 59

ภาพที่ 24 แถบโปรตีนที่แยกได้จากสารสกัดโปรตีนของเชื้อรา O. sobolifera ด้วยวิธี SDS-PAGE 70

ภาพที่ 25 ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอของเชื้อรา O. sobolifera ไอโซเลท Cod-KK1519 จาก. 72

ภาพที่ 26 ลักษณะแถบดีเอ็นเอของเชื้อรา O. sobolifera แต่ละไอโซเลทจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพร์เมอร์ OPE20 โดยเทคนิค RAPD 56

ภาพที่ 27 ลักษณะแถบดีเอ็นเอของเชื้อรา O. sobolifera แต่ละไอโซเลทจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพร์เมอร์ OPH03 โดยเทคนิค RAPD 56

ภาพที่ 28 ลักษณะแถบดีเอ็นเอของเชื้อรา O. sobolifera แต่ละไอโซเลทจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพร์เมอร์ OPT13 โดยเทคนิค RAPD 56

ภาพที่ 29 ลักษณะแถบดีเอ็นเอของเชื้อรา O. sobolifera แต่ละไอโซเลทจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพร์เมอร์ OPT14 โดยเทคนิค RAPD 56

ภาพที่ 30 ลักษณะแถบดีเอ็นเอของเชื้อรา O. sobolifera แต่ละไอโซเลทจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพร์เมอร์ OPT17 โดยเทคนิค RAPD 56

ภาพที่ 31 แถบดีเอ็นเอจากการเพิ่มปริมาณจีโนมิกดีเอ็นเอของเชื้อรา O. sobolifera ด้วยวิธี RAPD 79

ภาพที่ 32 ตำแหน่งการจับของไพร์เมอร์ RAPD-SCAR ชนิด SpsoU_f01/ SpsoU_r01 81

ภาพที่ 33 ตำแหน่งการจับของไพร์เมอร์ RAPD-SCAR ชนิด SpsoU_f02/ SpsoU_r01 81

ภาพที่ 34 ตำแหน่งการจับของไพร์เมอร์ RAPD-SCAR ชนิด SpsoL_f01/ SpsoL_r01 82

ภาพที่ 35 ตำแหน่งการจับของไพร์เมอร์ RAPD-SCAR ชนิด SpsoL_f01/ SpsoL_r02 82

ภาพที่ 36 การทดสอบเบื้องต้นในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไพร์เมอร์ที่ออกแบบขึ้นทั้ง 4 คู่..... 83
ภาพที่ 37 การทดสอบความจำเพาะของเครื่องหมายโมเลกุล RAPD-SCAR..... 85
ภาพที่ 38 การทดสอบช่วงอุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อรา.. 86
ภาพที่ 39 การทดสอบหาปริมาณไพร์เมอร์ที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อรา 87
ภาพที่ 40 การหาปริมาณความเข้มข้นของ $MgCl_2$ เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อรา 88
ภาพที่ 41 การทดสอบความไวของเครื่องหมาย RAPD-SCAR ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อรา89
ภาพที่ 42 การทดสอบประสิทธิภาพการนำเครื่องหมายโมเลกุล RAPD-SCAR marker 91

พหุน ปณ ฑิโต ชีเว

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของการวิจัย

เชื้อราจัดเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีความสำคัญต่อระบบนิเวศอย่างมากโดยเฉพาะมีบทบาทเป็นผู้ย่อยสลายสารอินทรีย์ในดินเพื่อนำแร่ธาตุกลับคืนสู่สิ่งแวดล้อมและให้สิ่งมีชีวิตอื่นๆ ได้นำไปใช้ประโยชน์ต่อไป แต่ในขณะเดียวกันเชื้อราก็มีบทบาทเข้าทำลายและก่อโรคในสิ่งมีชีวิตบางชนิดโดยเฉพาะกลุ่มแมลง (ผึ้ง มด ต่อ ด้วง แมลงวัน) และแมงมุม จึงมักเรียกรากลุ่มนี้ว่า “ราก่อโรคในแมลง (insect pathogenic fungi)” (J. Luangsa-ard, Tasanathai, Mongkolsamrit, & Hywel-Jones, 2007; Janet Jennifer Luangsa- ard, Tasanathai, Mongkolsamrit, & Hywel- Jones, 2009; Mongkolsamrit, Luangsa-Ard, Tasanathai, & Sivichai, 2010; Tasanathai, Luangsa-ard, Mongkolsamrit, & Hywel-Jones, 2010) เชื้อรากลุ่มนี้ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม Ascomycetes มีลักษณะสำคัญคือ มีแอสคัส (ascus) ลักษณะคล้ายถุง ภายในมีสปอร์จำนวน 8 สปอร์บรรจุอยู่ เรียกสปอร์ของรากลุ่มนี้ว่า แอสโคสปอร์ (ascospore) วงชีวิตพบมีระยะการเจริญ 2 ระยะ คือ ระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (sexual หรือ teleomorph stage) และระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (asexual หรือ anamorph stage) โครงสร้างทั่วไปของราก่อโรคในแมลงจะประกอบด้วยส่วนของสโตรมา (stroma) หรือที่เรียกว่า ฟรุตติ้งบอดี้ (fruiting body) และส่วนสเคลอโรเตียม (sclerotium) ซึ่งเป็นส่วนเส้นใยที่อัดตัวแน่นอยู่ภายในตัวอ่อนของโฮสต์ที่เชื้อราเข้าไปอาศัยอยู่ ในสภาพธรรมชาติเมื่อแมลงที่อยู่ในระยะการเจริญโดยเฉพาะระยะการลอกคราบ ได้รับหรือสัมผัสสปอร์ของเชื้อราที่ปนเปื้อนอยู่ในดินหรือสิ่งแวดล้อม สปอร์เชื้อราจะเกิดการงอกโครงสร้างส่วนของเส้นใยและท่องอก (germ tube) แทงผ่านชั้นผิวด้านนอกของแมลง โดยเส้นใยราจะเจริญและเพิ่มจำนวนอยู่ภายในช่อง hemocoel ของแมลง หลังจากแมลงเกิดการตาย เส้นใยราจะรวมตัวกันแน่นกลายเป็นสเคลอโรเตียม ซึ่งในช่วงนี้แมลงที่เชื้อราเข้าไปอาศัยอยู่จะมีลักษณะคล้ายมัมมี่คือ พบเพียงเปลือกหุ้มชั้นนอกฝังอยู่ใต้ผิวดินเท่านั้น เมื่อสภาพแวดล้อมมีความเหมาะสมต่อการเจริญ สเคลอโรเตียมของเชื้อราจะเจริญและพัฒนากลายเป็นส่วนสโตรมา เจริญแทงออกมาบนผิวหรือข้อต่อของแมลงที่เป็นโฮสต์และงอกพ้นพื้นดินในช่วงฤดูฝน เมื่อสโตรมาเจริญเต็มที่และส่วนของสปอร์ถูกปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อม จะเกิดการสลายของส่วนสโตรมาไปและซากแมลงที่เหลืออยู่จะมีการสร้างสโตรมาขึ้นมาใหม่ในช่วงฤดูกาลต่อไป (Avise, 2012; Clarkson & Charnley, 1996; Holliday & Cleaver, 2008; Fernando E Vega, 2008; Fernando E Vega et al., 2009; Xing & Guo, 2008) ในประเทศไทยสามารถพบราก่อโรคในแมลงที่สำคัญ ประกอบด้วย 3 วงศ์ ได้แก่ Cordycipitaceae Ophiocordycipitaceae และ

Clavicipitaceae ซึ่งสกุลที่พบมากที่สุดได้แก่ *Cordyceps* *Ophiocordyceps* และ *Aschersonia* ตามลำดับ ซึ่งราดังกล่าวได้ถูกนำมาใช้ในการศึกษาและวิจัยเกี่ยวกับสัณฐานวิทยา การจัดจำแนกชนิด ความสัมพันธ์ระหว่างโฮสต์และเชื้อรา รวมถึงการศึกษาสารสำคัญเพื่อนำสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญมาใช้ในการพัฒนาเป็นยารักษาโรคในปัจจุบัน

เชื้อราในสกุล *Ophiocordyceps* จัดอยู่ในลำดับ (Order) Hypocreales (Ascomycota) และอยู่ในวงศ์ (Family) Ophiocordycipitaceae เดิมเชื้อรากลุ่มนี้ถูกจัดอยู่ในสกุล (Genus) *Cordyceps* แต่เมื่อมีการศึกษาในระดับยีนและลำดับสายวิวัฒนาการ จึงได้มีการจัดแยกให้เชื้อราในสกุล *Ophiocordyceps* ถูกแยกเป็นอีกหนึ่งสกุล (Sung et al., 2007; Sung, Sung, Hywel-Jones, & Spatafora, 2007) และเมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพื่อใช้ในการจัดจำแนกเชื้อราทั้งสองสกุลพบว่า มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่มีความคล้ายคลึงกัน โดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั่วไปของเชื้อราสกุล *Cordyceps* จะพบลักษณะของส่วนสโตรมามีรูปร่างคล้ายกระบอง มีสีส้มหรือเหลืองอ่อน มักพบฝังอยู่ภายในตัวอ่อนของโฮสต์ที่ฝังอยู่ใต้ดิน พบระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ตัวอย่างเชื้อรากลุ่มนี้ได้แก่ เชื้อรา *Lecanicilium* sp. *Isaria* sp. *Beaveria* sp. และ *Gibelular* sp. ในขณะที่เชื้อราสกุล *Ophiocordyceps* มีลักษณะสโตรมาคล้ายแท่งเรียวยาว มีสีน้ำตาลอ่อนถึงเข้ม มักพบเจริญอยู่บนตัวโฮสต์ที่อาศัยอยู่บนดิน และมีระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ตัวอย่างเชื้อรากลุ่มนี้ได้แก่ เชื้อรา Hymenostilbe sp. และ Hirsutella sp. (Kepler et al., 2013; Yosio Kobayasi, 1981; Y Kobayasi, 1982; Z. Liu, Liang, Whalley, Liu, & Yao, 2001; Nilsson, Kristiansson, Ryberg, Hallenberg, & Larsson, 2008) ดังนั้น การระบุชนิดของเชื้อราดังกล่าวจึงต้องอาศัยความรู้ทางด้านดีเอ็นเอ (DNA) มาใช้ในการระบุชนิดร่วมด้วย (Artjariyasripong, Mitchell, Hywel-Jones, & Jones, 2001; Jianshan, 2007) ตัวอย่างสปีชีส์ของเชื้อราในสกุล *Ophiocordyceps* ที่มีความสำคัญและนำมาใช้ประโยชน์ได้แก่ *O. nutans* และ *O. sinensis* ซึ่งถือเป็นสปีชีส์ที่พบในแถบประเทศจีน ญี่ปุ่น เนปาล ทิเบต อินเดียและเกาหลี ซึ่งถูกนำมาพัฒนาใช้เป็นยารักษาโรคต่างๆ โดยเฉพาะ *O. sinensis* ได้พัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่เป็นการค้าในปัจจุบัน ซึ่งมีสรรพคุณช่วยบำรุงปอดและไต กระตุ้นระบบไหลเวียนเลือด และควบคุมสมดุลภายในร่างกาย (Jang et al., 2015; Rathor et al., 2014; Ren & Yao, 2013; Fernando E Vega, 2008; Yue, Ye, Lin, & Zhou, 2013) นอกจากนี้ยังมีเชื้อราอีกหนึ่งสปีชีส์ที่น่าสนใจและสามารถพบได้ในประเทศไทย คือ *O. sobolifera* (ชื่อเดิม= *Cordyceps sobolifera Clavaria sobolifera Sphaeria sobolifera* และ *Torrubia sobolifera*) (Sung, Hywel-Jones, et al., 2007) ซึ่งถือเป็นเชื้อราที่มีประโยชน์ทางการแพทย์เป็นอย่างมาก โดยพบสารสำคัญหลายชนิด เช่น cordycepin ergosterol polysaccharide รวมทั้ง peptide และสาร cordysobin ที่สามารถรักษาอาการอักเสบ ลดระดับน้ำตาลในเลือด (hypoglycemic) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ยับยั้งเซลล์มะเร็ง ต้านเชื้อไวรัส HIV-1

ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราก่อโรคในคน (D. Cheng, Ding, Lin, Pan, & Chen, 2006; Chiu et al., 2014; Holliday & Cleaver, 2008; Imtiaj & Lee, 2007; Lin et al., 2018; H. Liu, Li, Zhao, Zhang, & Wang, 2011; Lu, Gu, Hao, Jin, & Wang, 2016; J Jennifer Luangsa-Ard, Ridkaew, Tasanathai, Thanakitpipattana, & Hywel-Jones, 2011; A. Sangdee, Sangdee, Buranrat, & Thammawat, 2018; K. Sangdee, Buranrat, Jaihan, Thongchai, & Sangdee, 2018; Thammawat, Sangdee, & Sangdee, 2017; S.-X. Wang et al., 2012; Wu et al., 2011) รวมถึงสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการควบคุมเชื้อราโรคพืช *Colletotrichum* spp. ซึ่งเป็นสาเหตุโรคแอนแทรคโนสในพริกได้ (Jaihan, Sangdee, & Sangdee, 2016, 2018) ดังนั้น การจัดจำแนกหรือระบุชนิดของเชื้อราในสกุลดังกล่าวซึ่งเป็นเชื้อราอีกสกุลหนึ่งที่มีลักษณะความแปรผันของชนิดเชื้อราที่สูง โดยพบความแปรผันขึ้นกับชนิดของโฮสต์ สภาวะแวดล้อม รวมทั้งสานพันธุ์ของเชื้อราเอง ทำให้การใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกเพียงอย่างเดียวอาจไม่เพียงพอในการระบุชนิดของเชื้อรา เพื่อนำเอาชนิดตัวอย่างเชื้อราและข้อมูลต่างๆไปใช้ประโยชน์ต่อในอนาคต จึงจำเป็นต้องระบุชนิดและชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องโดยอาศัยทั้งข้อมูลในส่วนสัณฐานวิทยาภายนอกและข้อมูลเทคนิคทางด้านโมเลกุลช่วยในการระบุชนิดที่ถูกต้อง ซึ่งในอดีตการระบุชนิดจะอาศัยลักษณะสัณฐานวิทยา (morphology) ที่แตกต่างกันเป็นเครื่องหมายหรือลักษณะสำคัญในการระบุชนิดเพียงอย่างเดียว ซึ่งส่งผลทำให้มีข้อจำกัดหลายประการ ดังนั้นการนำเครื่องหมายระดับโมเลกุล (molecular marker) มาประยุกต์ใช้ร่วมกับการศึกษาทางด้านสัณฐานวิทยาจึงเป็นการเพิ่มข้อได้เปรียบในการศึกษาการจัดจำแนกระบุชื่อสิ่งมีชีวิต รวมถึงศึกษาด้านวิวัฒนาการ และความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต เนื่องจากสามารถทำได้รวดเร็วมีความแม่นยำ และน่าเชื่อถือมากกว่าการอาศัยลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกเพียงอย่างเดียว ปัจจุบันจึงมีการนำเอาเครื่องหมายโมเลกุลทางด้านดีเอ็นเอ (DNA marker) มาใช้มากขึ้นโดยอาศัยเทคนิคหลายชนิดมาใช้ในการช่วยจัดจำแนกระบุความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตที่เกิดความแปรผันในลำดับดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น เช่น การจัดจำแนกสิ่งมีชีวิต การสร้างแผนที่โครโมโซม ซึ่งเทคนิคที่ใช้เพื่อการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลในปัจจุบันมีหลายชนิด โดยส่วนใหญ่จำเป็นต้องอาศัยหลักการพื้นฐานของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (polymerase chain reaction: PCR) และการตัดลำดับดีเอ็นเอ (DNA digestion) ตัวอย่างเทคนิคที่นิยมใช้ในปัจจุบันเช่น (1) เทคนิค restriction fragment length polymorphism (RFLP) เป็นเทคนิควิเคราะห์ความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) (2) เทคนิค random amplified polymorphic DNA (RAPD) เป็นวิธีวิเคราะห์ความแตกต่างของดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ (primer) ที่มีลำดับเบสที่แตกต่างกันในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอแบบสุ่ม (3) เทคนิค amplified fragment length polymorphism (AFLP) เป็นวิธีการวิเคราะห์ความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอโดยเป็นวิธีที่ประยุกต์มาจากวิธี RFLP และ RAPD และ (4) เทคนิค single-strand conformation

polymorphism (SSCP) ซึ่งวิเคราะห์จากความแตกต่างของลำดับเบสเพียง 1 เบส เป็นต้น ซึ่งเทคนิคที่เกี่ยวข้องกับเครื่องหมายโมเลกุลมีข้อดีที่แตกต่างกันไป ดังนั้นการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลจำเป็นต้องเลือกใช้ให้เหมาะสมต่อสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษา (Avise, 2012; Chan, Ling, Chiu, Shaw, & But, 2011; C.-S. Chen, Hseu, & Huang, 2011; Y.-Q. Chen, Wang, Qu, Li, & Zhang, 2001; Y. Chen, Zhang, Yang, & Yang, 1999; K.-T. Cheng, Su, Chang, & Huang, 1998; H.-C. Kuo, Su, Yang, & Chen, 2005; Lam et al., 2015; Mueller & Wolfenbarger, 1999; Rasmussen, 2012; A. Sangdee, Sangdee, Seephonkai, Jaihan, & Kanyaphum, 2017; X. L. Wang, Yang, & Yao, 2011; Yao et al., 2014) ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงได้มีความสนใจในการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *O. sobolifera* ที่คัดแยกได้จากตัวอ่อนจักจั่น ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค และออกแบบเครื่องหมายโมเลกุลที่เหมาะสมในการใช้ระบุชนิดของเชื้อรา *O. sobolifera*

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาสัณฐานวิทยาและจัดจำแนกเชื้อรา *O. sobolifera*

1.2.2 เพื่อศึกษาคุณสมบัติการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคของสารสกัดจากเชื้อรา *O. sobolifera*

1.2.3 เพื่อออกแบบเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับระบุชนิดเชื้อรา *O. sobolifera*

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

คัดแยกเชื้อรา *O. sobolifera* จากตัวอ่อนจักจั่นในเขตพื้นที่จังหวัดขอนแก่นด้วยวิธี tissue transplanting ทำการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาทั้งภายในและภายนอกของเชื้อราที่คัดแยกได้ เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการจัดจำแนกชนิดและยืนยันชนิดของเชื้อรา *O. sobolifera* โดยใช้ยีนส่วน internal transcribe spacer (ITS) นำตัวอย่างเชื้อราที่ระบุชนิดเป็นเชื้อรา *O. sobolifera* มาศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อรา *O. sobolifera* โดยทำการเลี้ยงเส้นใยและทำการสกัดสารสกัดเส้นใย (mycelial extract) และสารสกัดโปรตีน (crude protein) นำมาทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยเทคนิค agar well diffusion เลือกตัวอย่างเชื้อรา *O. sobolifera* ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ดีที่สุดนำมาหาขนาดของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE และวิเคราะห์หาลำดับกรดอะมิโนด้วยวิธี GC- MS /MS เปรียบเทียบชนิดของโปรตีนจากตัวอย่างเชื้อรา *O. sobolifera* กับฐานข้อมูล เพื่อหาชนิดโปรตีนที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากเชื้อรา *O. sobolifera* ทำการสกัดดีเอ็นเอจากเส้นใย

เชื้อรา *O. sobolifera* เพื่อนำมาทำการศึกษาและออกแบบเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับระบุชนิดเชื้อราด้วยเทคนิค random amplified polymorphic DNA-sequence characterized amplified region (RAPD-SCAR)

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ได้ข้อมูลเกี่ยวกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *O. sobolifera*

1.4.2 ทราบชนิดและความสามารถของเชื้อรา *O. sobolifera* ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค

1.4.3 ได้เครื่องหมายโมเลกุลสำหรับเชื้อรา *O. sobolifera* เพื่อใช้ในการระบุชนิด

พหูน ปณ ฑิโต ชีเว

บทที่ 2
ปริทัศน์เอกสารข้อมูล

2.1 อนุกรมวิธานเชื้อรา *Ophiocordyceps sobolifera* (*O. sobolifera*)

เชื้อรา *Ophiocordyceps sobolifera* (Hill ex Watson) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora (*O. sobolifera*) (ชื่อเดิมคือ *Cordyceps sobolifera Clavaria sobolifera Sphaeria sobolifera* และ *Torrubia sobolifera*) จัดเป็นเชื้อราชนิดก่อโรคในแมลง (entomopathogenic fungi) ซึ่งอยู่ในวงศ์ Ophiocordycipitaceae เดิมเชื้อราดังกล่าวถูกจัดอยู่ในวงศ์ Clavicipitacea สกุล *Cordyceps* โดยอาศัยข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น เพอริทีเชีย (perithecia) สโตรมา (stroma) ถุงหุ้มสปอร์ (ascus) รูปร่างของแอสโคสปอร์ (ascospore) รวมถึงชนิดของโฮสต์ (host) และอาศัยข้อมูลการศึกษาทางด้านโมเลกุลมาใช้ในการจัดจำแนกชนิดของเชื้อรา ในปัจจุบันได้มีการศึกษายีนเพื่อใช้เป็นข้อมูลในการจัดจำแนกชนิดของเชื้อราดังกล่าวเพิ่มเติม ประมาณ 5-7 ยีน ได้แก่ ยีน nuclear ribosomal small และ large subunit DNA (nrSSU และ nrLSU), ยีน β-tubulin, ยีน elongation factor 1a (EF-1a), ยีน largest และ second largest subunits of RNA polymerase II (RPB1 และ RPB2) และยีน mitochondrial ATP synthase subunit 6 (mtATP6) พบว่า *O. sobolifera* มีลักษณะที่แตกต่างจากเชื้อราในสกุล *Cordyceps* จึงทำให้มีการจัดจำแนกเชื้อราดังกล่าวในสกุล *Cordyceps* ไปจัดอยู่ในสกุลใหม่คือ สกุล *Ophiocordyceps* แทนสกุลเดิม และมีการเปลี่ยนชื่อเชื้อราบางชนิดให้เป็นไปตามระบบ “one fungus-one name (1F1N) ” ตัวอย่างเช่น เชื้อรา *C. sinensis* ถูกเปลี่ยนชื่อเป็น *O. sinensis* ส่วนเชื้อรา *C. nutans* ถูกเปลี่ยนชื่อเป็น *O. nutans* และเชื้อรา *C. sobolifera* จึงถูกเปลี่ยนชื่อเป็น *O. sobolifera* ด้วยเช่นเดียวกัน (Spatafora et al., 2015; Sung, Hywel-Jones, et al., 2007; Sung, Sung, et al., 2007) ลำดับอนุกรมวิธานของเชื้อรา *O. sobolifera* จัดลำดับได้ดังนี้

Kingdom Funugi
Phylum Ascomycota
Class Sordariomycetes
Order Hypocreales
Family Ophiocordycipitaceae
Genus *Ophiocordyceps*
Species *O. sobolifera*

2.2 ลักษณะทั่วไปและวงจรชีวิตของเชื้อราในสกุล *Ophiocordyceps*

Ophiocordyceps sp. เป็นเชื้อราก่อโรคในแมลงที่พบเจริญอยู่บนแมลงหลายกลุ่ม โดยเฉพาะแมลงในกลุ่มแมลงปากดูด (Order Hemiptera) กลุ่มด้วง แมลงปีกแข็ง (Order Coleoptera) กลุ่มแมลง 2 ปีก (Order Diptera) กลุ่มมด ผึ้ง ต่อแตน (Order Hymenoptera) กลุ่มผีเสื้อ (Order Lepidoptera) และกลุ่มแมงมุม (Order Arachidae) โดยเชื้อราจะเข้าไปทำลายแมลงที่เป็นโฮสต์เหล่านี้ซึ่งส่วนใหญ่จะอยู่ในระยะการเจริญระยะที่เป็นตัวอ่อน (insect larva) จากการสัมผัสสปอร์ของเชื้อราที่กระจายอยู่ทั่วไปในสภาพแวดล้อม เช่น บริเวณดิน ใบไม้ หรือบนส่วนของต้นไม้ หลังจากนั้นเชื้อราจะเจริญพัฒนาอยู่ภายในตัวโฮสต์ซึ่งจะมีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว (yeast-like from) และกลายเป็นโครงสร้างส่วนเส้นใย (thread-like hyphae from) แทงทะลุตัวโฮสต์และโผล่พ้นดิน (Buenz, Bauer, Osmundson, & Motley, 2005)

โครงสร้างทั่วไปของเชื้อราสกุล *Ophiocordyceps* ประกอบด้วยส่วนต่างๆ ดังนี้

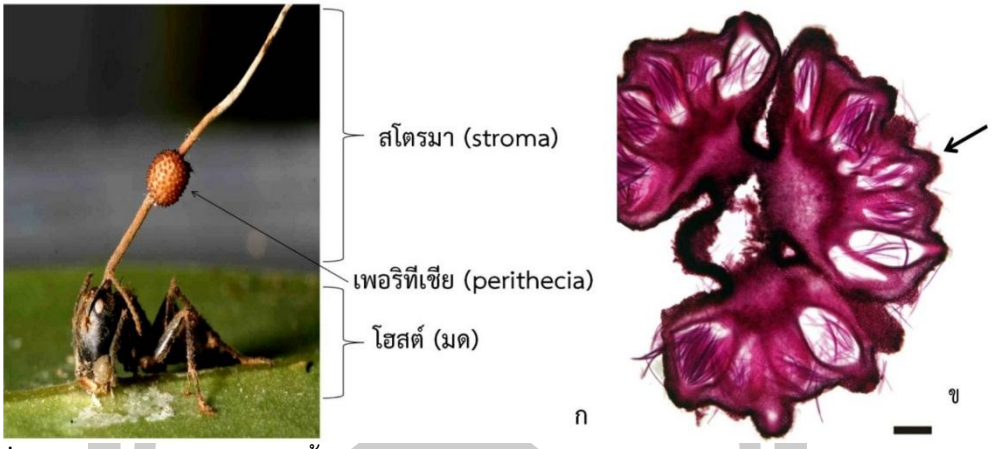
(1) สโตรมา เป็นส่วนโครงสร้างที่เกิดจากการรวมตัวของเส้นใย เจริญออกมานอกตัวโฮสต์ อาจมีอันเดียวหรือหลายอันก็ได้ มีลักษณะอ่อนนุ่ม และมีรูปร่างได้หลายแบบ เช่น คล้ายกระบอง (clavate) ทรงกระบอกตรง (cylindric) ทรงกระบอกปลายป่อง (capitates) เรียวปลายแหลม (filiform) หรือลักษณะคล้ายเส้นใย (fibrous) ส่วนของสโตรมาส่วนใหญ่บริเวณก้าน (stalk) มักจะตั้งตรงหรือโค้งงอ พบมีการแตกแขนงในบางสปีชีส์ พบบริเวณส่วนที่ใช้ในการสืบพันธุ์มีลักษณะพองออกเป็นกระเปาะขนาดใหญ่กว่าบริเวณก้าน เป็นที่เกิดของเพอริทีเชียที่มักพบการสร้างเพอริทีเชียบริเวณตรงกลางจนถึงเกือบปลายสุดของสโตรมา ผิวสโตรมามักมีลักษณะผิวหยาบหรือเป็นปุ่มขนาดเล็กยื่นออกมาจำนวนมาก มีสีแตกต่างกันไปตั้งแต่ สีขาว เหลือง ส้ม แดง น้ำตาล จนถึงดำ ซึ่งส่วนใหญ่มักพบเป็นสีดำหรือน้ำตาลเข้ม โดยการสร้างเม็ดสีขึ้นอยู่กับชนิดและขนาดของโฮสต์ที่เชื้อราอาศัยอยู่ (ภาพที่ 1 ก) (Bhushan Shrestha & Sung, 2005; Sung, Hywel-Jones, et al., 2007)

(2) เพอริทีเชีย มักพบอยู่บนส่วนของสโตรมา การจัดเรียงตัวพบได้ทั้งแบบที่ฝังอยู่ในสโตรมาทั้งหมด (immersed perithecia) หรือฝังเพียงบางส่วน (superficial perithecia) (N. L. Hywel-Jones, 1994) ลักษณะรูปร่างของเพอริทีเชียมีรูปร่างคล้ายคนโทหรือคล้ายหยดน้ำ รูปไข่ หรือเกือบกลม ภายในเพอริทีเชียเป็นบริเวณที่อยู่ของถุงหุ้มสปอร์ ด้านบนมีช่องเปิดที่เรียกว่า ออสติโอล (ostioles) ซึ่งเป็นรูสำหรับปล่อยแอสโคสปอร์ (ภาพที่ 1 ข)

(3) ถุงหุ้มสปอร์ เป็นโครงสร้างที่ทำหน้าที่บรรจุสปอร์ มีลักษณะเป็นถุงยาวคล้ายกระบองหรือทรงกระบอกยาว ผิวเรียบ ใสไม่มีสี มีผนังชั้นเดียว (unitunicate) ภายในถุงหุ้มสปอร์มีสปอร์ที่เรียกว่าแอสโคสปอร์ บรรจุอยู่จำนวน 8 แอสโคสปอร์ เรียงตัวขนานตามความยาวของถุงหุ้มสปอร์ พบบริเวณส่วนปลายพองออกคล้ายกระเปาะเรียก asci apex มีรูปร่างกลมหรือค่อนข้างกลม และมี

ช่องเปิดสำหรับเป็นทางออกของสปอร์ (apical pore) (ภาพที่ 2 ก) (N. Hywel-Jones, 1995; N. L. Hywel-Jones, 1996)

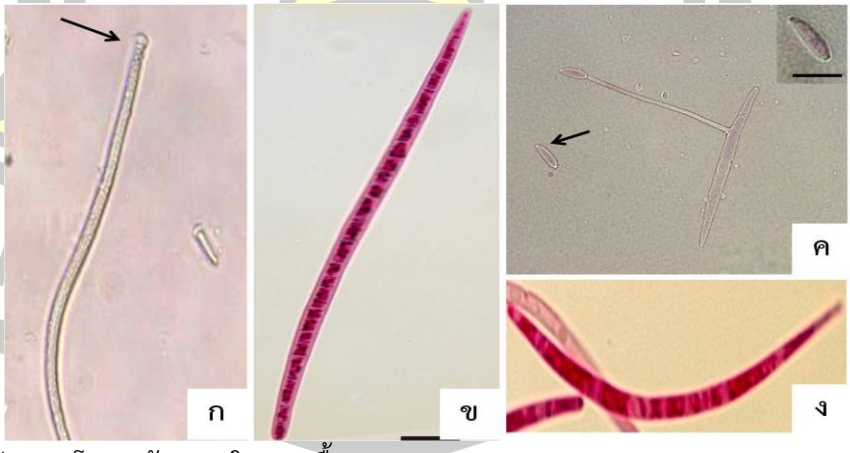
(4) แอสโคสปอร์ จะบรรจุอยู่ภายในถุงหุ้มสปอร์ มีลักษณะยาวคล้ายเส้นด้าย ผิวเรียบ ใสไม่มีสี เมื่อส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์มักพบมีผนังกั้นหลายอัน (multiseptate) รูปร่างและขนาดของสปอร์ในเชื้อราแต่ละชนิดมักมีความแตกต่างกัน (N. Hywel-Jones, 1995; N. L. Hywel-Jones, 1996) (ภาพที่ 2 ข-ง)



ภาพที่ 1 ลักษณะโครงสร้างของเชื้อราสกุล *Ohiocordyceps*

(ก) โครงสร้างภายนอก (ข) โครงสร้างภายในแสดงส่วนเพอริทีเชียในสโตรมา (บริเวณลูกศรชี้)

ที่มา: http://insider.si.edu/2015/02/science-zombies-already-walk-among-us/ [สืบค้นเมื่อวันที่ 31 มีนาคม 2559]



ภาพที่ 2 ลักษณะโครงสร้างภายในของเชื้อราสกุล *Ohiocordyceps*

(ก) ถุงหุ้มสปอร์ และ (ข-ง) รูปร่างของแอสโคสปอร์ของเชื้อราแต่ละชนิด

ที่มา: Hywel-Jones (1995; 1996)

โครงสร้างลักษณะของเชื้อราสกุล *Ophiocordyceps* จะมีความแตกต่างในแต่ละชนิดของเชื้อราและมีความแตกต่างตามลักษณะโฮสต์ที่อาศัย ได้แก่

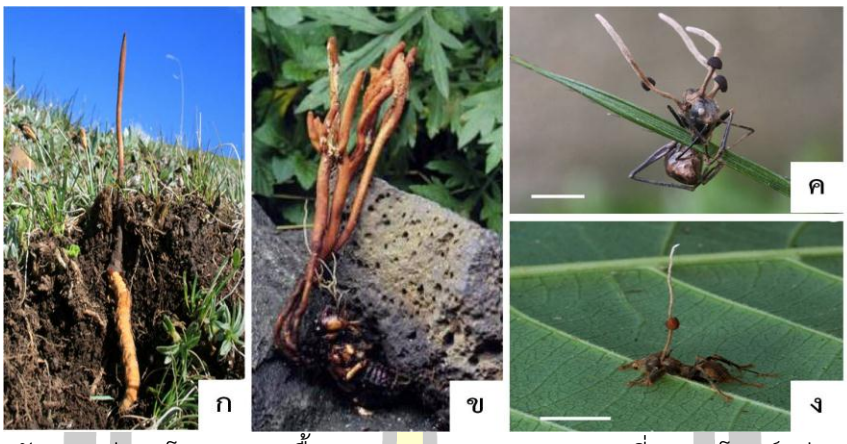
(1) เชื้อรา *O. sinensis* พบสโตรมาเจริญอยู่บนตัวอ่อนของผีเสื้อในระยะตัวหนอน มีลักษณะของส่วนสโตรมาเจริญออกมาบริเวณส่วนหัวของตัวหนอน ลักษณะแท่งยาวขนาดประมาณ 4-10 เซนติเมตร มีสีน้ำตาลเข้มหรือดำ พบเพอริทีเชียแบบฝังอยู่ในสโตรมาทั้งหมด รูปร่างรีหรือคล้ายรูปไข่ สีน้ำตาล เมื่อยังสดจะมีสีเหลือง ถุงหุ้มสปอร์มีรูปร่างทรงกระบอก ใสไม่มีสี ภายในมีแอสโคสปอร์บรรจุอยู่ ซึ่งแอสโคสปอร์ใส ไม่มีสี รูปร่างเรียวยาว (filiform) มีผนังกั้นตามขวางแบบ multiseptate ขนาดแอสโคสปอร์ประมาณ 5-12 ไมโครเมตร (ภาพที่ 3 ก) (Zhou, Li, & Tian, 2014)

(2) เชื้อรา *O. longissima* พบสโตรมาเจริญงอกอยู่บนตัวอ่อนของจักจั่น ซึ่งในบริเวณส่วนหัวหรือข้อต่อต่างๆ ของโฮสต์ รูปร่างยาวประมาณ 5-20 เซนติเมตร ผิวขรุขระ สีน้ำตาลหรือดำ มักพบการแตกแขนงตรงบริเวณส่วนปลายของสโตรมา ภายในพบเพอริทีเชียรูปร่างรี ฝังอยู่ในส่วนของสโตรมาทั้งหมด ถุงหุ้มสปอร์มีลักษณะเป็นแท่งทรงกระบอกยาว ภายในมีแอสโคสปอร์รูปร่างรีเรียงต่อกันเป็นสาย ขนาด 8-11x1-1.2 ไมโครเมตร (ภาพที่ 3 ข) (Sung, Shrestha, Han, & Sung, 2011)

(3) เชื้อรา *O. sobolifera* พบสโตรมางอกเจริญโผล่ขึ้นมาจากบริเวณส่วนหัวของตัวอ่อนจักจั่น มีรูปทรงกระบอง (clavate) ขนาดประมาณ 20-80 x 2-6 มิลลิเมตร ผิวเรียบ มีเม็ดสีน้ำตาล พบเพอริทีเชียแบบฝังตัวอยู่ในสโตรมาทั้งหมด รูปร่างคล้ายคนโทเรียวยาว ใสไม่มีสี ขนาดประมาณ 500-600 x 220-260 ไมโครเมตร ภายในมีถุงหุ้มสปอร์ รูปร่างทรงกระบอกยาว ขนาดประมาณ 300-470 x 5.6-6.5 ไมโครเมตร ส่วนปลายมีลักษณะกลมหรือค่อนข้างกลม พบแอสโคสปอร์มีรูปร่างทรงกระบอกหรือรีคล้ายเม็ดข้าวสาร มีผนังกันหลายชั้น ใสไม่มีสี ขนาดประมาณ 6-13 x 1-1.5 ไมโครเมตร (Sung, Hywel-Jones, et al., 2007)

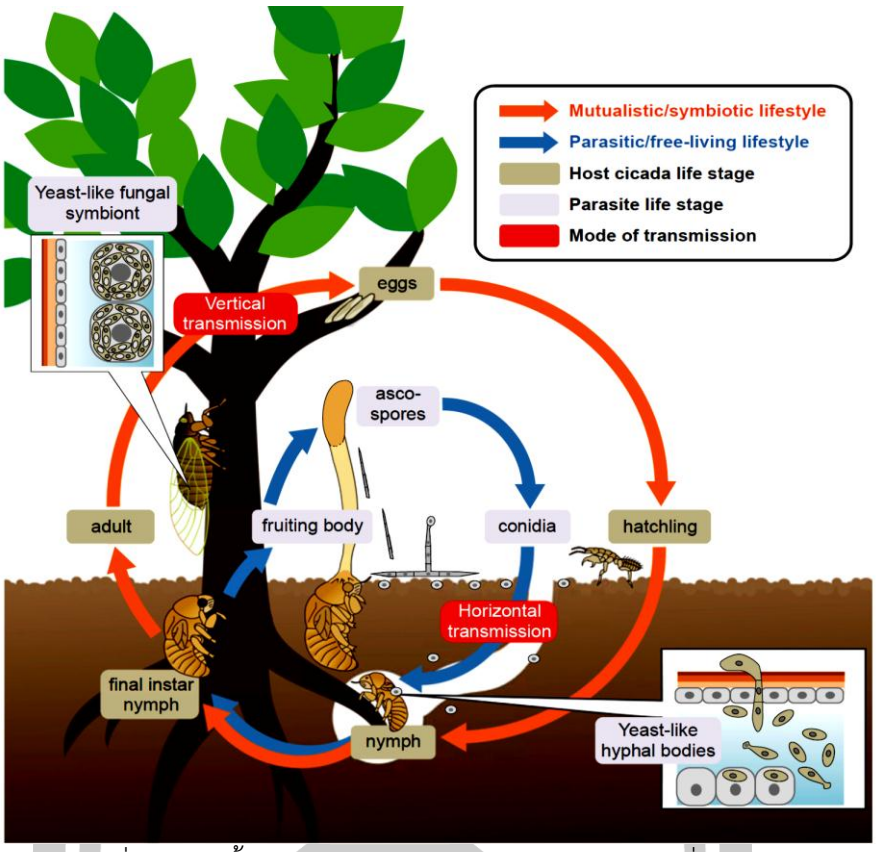
(4) เชื้อรา *O. halabalaensis* พบสโตรมางอกเจริญอยู่บริเวณส่วนอกและส่วนหัวของมดยักษ์ชนิด *Camponotus gigas* สโตรมามีลักษณะเป็นแท่งยาว หนา พบประมาณ 1-3 แท่ง บริเวณส่วนปลายมีสีขาว พบเพอริทีเชียรูปร่างกลมอยู่บริเวณกึ่งกลางของสโตรมา มีรูปร่างค่อนข้างรีเกือบกลม สีน้ำตาลดำ ขนาดประมาณ 1.5-2 x1.5-2 มิลลิเมตร แอสโคสปอร์รูปรียาวปลายแหลม ใสไม่มีสี (ภาพที่ 3 ค) (J Jennifer Luangsa-Ard, et al., 2011)

(5) เชื้อรา *O. unilateralis* พบสโตรมางอกเจริญอยู่บริเวณส่วนหัวของมดในสกุล *Camponotus* มีรูปร่างคล้ายคลึงกับชนิด *O. halabalaensis* แต่พบสโตรมาเพียงหนึ่งแท่ง ลักษณะเพอริทีเชียมีรูปร่างกลมฝังอยู่บริเวณกึ่งกลางของสโตรมา มีรูปร่างกลม สีเหลืองปนน้ำตาล และมีขนาดเล็กกว่าสโตรมาของ *O. halabalaensis* แอสโคสปอร์รูปรียาวปลายมน ใสไม่มีสี (ภาพที่ 3 ง) (Araújo, Evans, Geiser, Mackay, & Hughes, 2015; Kobmoo et al., 2015; Mongkolsamrit et al., 2012)



ภาพที่ 3 ลักษณะส่วนสโตรมาของเชื้อราสกุล *Ophiocordyceps* ที่พบบนโฮสต์แต่ละชนิด (ก) *O. sinensis* (ข) *O. longissima* (ค) *O. halabalaensis* และ (ง) *O. unilateralis* ที่มา: ดัดแปลงจาก Zhou et al (2014); Sung et al (2011); Sung et al (2007); Luangsa-Ard et al(2011); Mongkolsamrit et al (2012)

การเจริญของเชื้อราในกลุ่มสกุล *Ophiocordyceps* พบระยะการสืบพันธุ์ทั้งแบบอาศัยเพศและแบบไม่อาศัยเพศ (ในการสร้างสปอร์เพื่อใช้ในการสืบพันธุ์โดยสปอร์ของเชื้อราที่แพร่กระจายในสภาพแวดล้อมต่างๆ ปลิวตกลงบนตัวของโฮสต์ เช่น มด ผึ้ง จักจั่น (ภาพที่ 4) เมื่อสปอร์ของเชื้อราที่ปลิวตกตามอวัยวะต่างๆ ของโฮสต์ เชื้อราจะสร้างเส้นใยเจริญรอบๆ บริเวณส่วนข้อ ส่วนเปลือกหรือผิวลำตัวของโฮสต์ จากนั้นเส้นใยราจะงอกและแทงทะลุผ่านชั้นโครงร่างแข็งภายนอก (exoskeleton) โดยการสร้างเอนไซม์ไลเปส (lipase) และโปรติเอส (protease) มาย่อยชั้นดังกล่าวของโฮสต์ จากนั้นเส้นใยเชื้อราจะเจริญและเพิ่มจำนวนอยู่ภายในบริเวณ hemocoel ของแมลง และใช้ส่วนโครงร่างของแมลงที่เหลืออยู่เป็นส่วนป้องกันอันตรายแก่เชื้อรา ในระยะนี้โฮสต์จะมีลักษณะเหลือเพียงซากมีลักษณะคล้ายมัมมี่ (mummy) ฝังอยู่ใต้ผิวดิน บนผิวเปลือกไม้หรือใบไม้ขึ้นอยู่กับแหล่งอาศัยของโฮสต์นั้นๆ เมื่อสภาพแวดล้อมมีความเหมาะสม สเคลอโรเตียมของเชื้อราจะพัฒนากลายเป็นโครงสร้างส่วนสโตรมา แทงเส้นใยที่อัดตัวกันแน่นเจริญออกมาบนผิวนอกของโฮสต์และงอกโผล่พ้นพื้นดินในช่วงฤดูฝน หลังจากที่สโตรมาของเชื้อราเจริญเต็มที่ จะมีการสร้างสปอร์และปล่อยสปอร์ที่เจริญเต็มที่ออกสู่สิ่งแวดล้อม สปอร์สามารถปลิวไปติดเชื้อในโฮสต์ตัวใหม่ได้ เมื่อเชื้อราปล่อยสปอร์ที่เจริญเต็มที่แล้วจะเกิดการสลายของส่วนสโตรมาเดิม ในขณะที่ซากแมลงที่เหลืออยู่จะมีการสร้างส่วนสโตรมาอันใหม่ขึ้นมาอีกครั้งในฤดูกาลต่อไป (Clarkson & Charnley, 1996; Fernando E Vega, 2008; Fernando E Vega, et al., 2009; Frenando E Vega, Meyling, Luangsa-ard, & Blackwell, 2012)

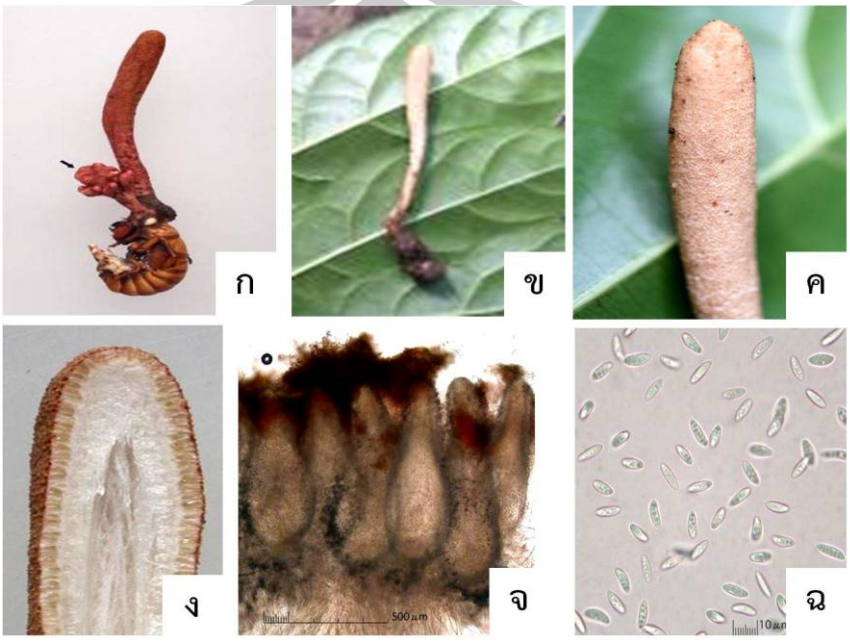


ภาพที่ 4 วงชีวิตโดยทั่วไปของเชื้อราสกุล *Ophiocordyceps* ในโฮสต์จักจั่น
ที่มา: https://experiment.com/u/EtDWGw [สืบค้นเมื่อวันที่ 3 เมษายน 2559]

2.3 ชีววิทยาของเชื้อรา *O. sobolifera*

เมื่อทำการศึกษาโครงสร้างของเชื้อรา *O. sobolifera* (เชื้อราในระยะ telomorph) ที่พบอาศัยอยู่ในตัวอ่อนของจักจั่น (*Beauveria sobolifera* เป็นเชื้อราในระยะ anamorph) (Z. Liu, et al., 2001) พบลักษณะโครงสร้างที่สำคัญคือ ส่วนสโตรมาโผล่ขึ้นมาจากส่วนหัวของโฮสต์เพียงหนึ่งอัน มีรูปร่างทรงกระบองขนาดประมาณ 20-80 x 2-6 มิลลิเมตร ผิวเรียบมีสีน้ำตาล พบโครงสร้างส่วนเพอริทีเชียเรียงตัวอัดแน่น ฝังตัวอยู่ในสโตรมาทั้งหมด มีรูปร่างคล้ายคนโทเรียวยาว ใสไม่มีสี ขนาดประมาณ 500-600 x 220-260 ไมโครเมตร ภายในมีถุงหุ้มสปอร์รูปร่างเป็นถุงทรงกระบอกยาว ขนาดประมาณ 300-470 x 5.6-6.5 ไมโครเมตร ภายในมีแอสโคสปอร์รูปร่างทรงกระบอกบรรจุอยู่ ส่วนปลายมีลักษณะกลมหรือค่อนข้างกลมเป็นช่องเปิดของสปอร์ โคนิเดียรูปร่างรีคล้ายเม็ดข้าวสาร มีผนังกั้นหลายชั้น ใสไม่มีสี ขนาดประมาณ 6-13 x 1-1.5 ไมโครเมตร (ภาพที่ 5) (Sung, Hywel-Jones, et al., 2007) สามารถพบเชื้อราดังกล่าวแพร่กระจายในบริเวณที่ระดับความสูงตั้งแต่ 700-950 เมตรจากระดับน้ำทะเล ตามบริเวณแนวเทือกเขาที่มีลักษณะป่าโล่ง อุณหภูมิอากาศเฉลี่ย

30-40°C เช่น แถบบริเวณเทือกเขาประเทศจีน ทิเบต ญี่ปุ่น เกาหลี ไต้หวัน ไทย เม็กซิโก และหมู่เกาะมาดากัสการ์ (H. Liu, et al., 2011)



ภาพที่ 5 โครงสร้างของเชื้อรา *O. sobolifera*
(ก-ข) ลักษณะเชื้อราที่พบในสภาพธรรมชาติ (ค-ง) สโตรมา (จ) เพอริทีเชีย และ (ฉ) โคนิเดีย
ที่มา: http://ignatius.blog3.fc2.com/blog-date-20100719.html [สืบค้นเมื่อวันที่ 3 เมษายน 2559]

2.4 ประโยชน์และความสำคัญของเชื้อรา *O. sobolifera*

เชื้อรา *O. sobolifera* เป็นเชื้อราที่มีสำคัญต่อการแพทย์เป็นอย่างมาก โดยพบเชื้อราชนิดดังกล่าวเจริญอยู่บนตัวอ่อนของจักจั่น ซึ่งคนจีนนิยมเก็บเชื้อรา *O. sobolifera* นำมาปรุงเป็นยาหรือใช้ศึกษาทางด้านเภสัชวิทยาเพื่อใช้ประโยชน์ในการรักษาโรคต่างๆ ซึ่งมีการรายงานพบสารสำคัญ (active metabolite) หลายชนิดในเชื้อรา *O. sobolifera* ได้แก่ polysaccharide (Kiho, Nagai, Miyamoto, Watanabe, & Ukai, 1990; Takano et al., 2005), nucleoside (Johansen, 1979), sterol (Y. Kuo, Weng, Chou, Chang, & Tsai, 2003), manitol, saponin, flavonoids (H. Liu, et al., 2011), myriocin (Fujita et al., 1994; Miyake, Kozutsumi, Nakamura, Fujita, & Kawasaki, 1995) และ alkaline serine protease (S.-X. Wang, et al., 2012) ที่แยกได้จากส่วนสโตรมาและสเคลอโรเตียมของเชื้อรา *O. sobolifera* ซึ่งจากการรายงานของ Imtaj & Lee (2007) ที่ได้ศึกษาและทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราของสารสกัดจากเห็ด จาก

ประเทศเกาหลี พบว่า น้ำเลี้ยงเส้นใยจากเชื้อรา *O. sobolifera* สายพันธุ์ IUM1613 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ซึ่งเป็นกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่ากลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ (*Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa*) (ขนาดโซนใสบริเวณยับยั้งเฉลี่ยเท่ากับ 9 มิลลิเมตร) นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งการเจริญและการเพิ่มจำนวนของเส้นใยเชื้อราก่อโรคในพืช 2 ชนิด ได้แก่ *Botrytis cinerea* และ *Colletotrichum gloeosporioides* ได้ (ร้อยละการยับยั้งเท่ากับ 39.87 และ 54.93 ตามลำดับ)

Wu & Li (2011) ได้ทำการสกัดสารจากเชื้อรา *O. sobolifera* โดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลายและนำมาทดสอบในหนูทดลอง (*in vivo*) เพื่อศึกษาผลของไลโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide: LPS) ในการรักษาภาวะบาดเจ็บของเซลล์ในท่อไต พบว่า สาร LPS ที่สกัดจากเชื้อรา *O. sobolifera* มีผลปรับการทำงานของท่อไตที่เสื่อมสภาพในหนูทดลอง โดยมีผลต่อการลดระดับ renal blood flow (RBF) และ glomerular filtration rate (GFR) และเพิ่มปริมาณ plasma blood urea nitrogen ระดับ creatinine และเม็ดเลือดขาวกลุ่มลิมโฟไซต์ได้อย่างมีนัยสำคัญ หลังได้รับสารสกัดเป็นระยะเวลา 2 เดือน และนอกจากนี้ Liu& Li (20 11) ได้รายงานสารสำคัญที่พบในเชื้อรา *O. sobolifera* ที่สามารถช่วยในการรักษาโรคมะเร็ง บำรุงร่างกาย ช่วยปรับภาวะสมดุลภายในร่างกาย ซึ่งสารสำคัญที่พบเป็นสารในกลุ่มโพลิแซคคาไรด์โดยเฉพาะกลุ่มไกลโคเจน (glycogen) เออร์โกสเตอรอล (ergosterol) สารอัลคอลอยด์ (alkaloid) และกรดคอร์ดิซิปิก (cordycepic acid) ที่เป็นสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งได้

Wang et al (2012) ได้ทำการสกัดและศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการทำงานเอนไซม์ HIV-1 reverse transcriptase ของสาร cordysobin ที่แยกได้จากส่วนฟรุตติ้งบอดี้ (fruiting bodies) ของเชื้อรา *O. sobolifera* พบว่า สาร cordysobin มีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์โปรติเอส (protease) ซึ่งสารที่พบในเชื้อราครั้งนี้ยังไม่เคยมีการรายงานมาก่อน โดยสารนี้มีคุณสมบัติทางกายภาพคือ มีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 31 kDa มีลำดับกรดอะมิโนคือ AFSTQPGAVCGK ภาวะความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่เหมาะสมในการทำงานมีค่าเท่ากับ 10 อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 65°C และค่า Km เท่ากับ 0.41-13.44 μm เมื่อนำมาทดสอบแอคติวิตี้ของเอนไซม์พบว่าสามารถยับยั้งสาร chymostatin และ phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) ได้ และมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HIV-1 reverse transcriptase โดยมีค่าระดับการยับยั้งที่ 50% (IC_{50}) เท่ากับ 8.2x10-3 μm

Chiu et al (2014) พบว่าสาร polysaccharide จากเชื้อรา *O. sobolifera* สามารถยับยั้งกระบวนการเกิด lipid peroxidation และกระตุ้นเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) ในการต้านสารอนุมูลอิสระที่ทำลายเนื้อเยื่อไตในหนูที่บาดเจ็บได้

Sangdee et al (2018) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรคในคนของสารสกัดจากเส้นใยและสารสกัดโปรตีนจากเชื้อรา *O. sobolifera* ไอโซเลท Cod-KK1643 พบว่า สารสกัดเส้นใย

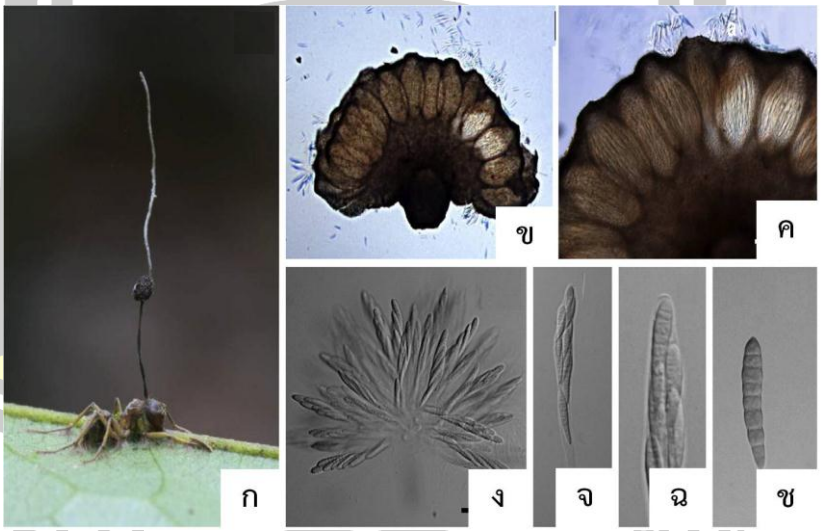
(mycelial extract) และสารสกัดโปรตีน (crude protein) ของเชื้อราดังกล่าวสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคในคนชนิด *Candida albicans* (*C. albicans*) ได้ดีที่สุด เมื่อเทียบกับสารสกัดจากเชื้อราไอโซเลทอื่นๆ (โดยสารสกัดสามารถให้ค่า MIC ต่ำสุด) ซึ่งผลการยับยั้งเชื้อราขึ้นกับความเข้มข้นและระยะเวลาการสัมผัสสารของเซลล์ยีสต์ *C. albicans* (concentration- and time dependent) และจากผลการศึกษายังพบว่า สารสกัดโปรตีนมีผลทำให้ลักษณะรูปร่างของเซลล์ยีสต์ *C. albicans* เปลี่ยนแปลงไป ทำให้เกิดลักษณะเซลล์หดสั้น และเกิดการแตกเป็นรอยที่ผิวเซลล์ และทำให้เซลล์ตายในที่สุด นอกจากนี้ Sangdee et al (2018) ยังพบว่าสารสกัดเส้นใย (mycelial extract) และสารสกัดโปรตีน (crude protein) ของเชื้อรา *O. sobolifera* ไอโซเลท Cod-KK1643 ยังสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในคนได้ โดยเฉพาะกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก (*B. cereus* และ *S. aureus* ทั้งสายพันธุ์ MRSA และ MSSA) ซึ่งสารสกัดไปมีผลต่อรูร่างของเซลล์แบคทีเรีย ทำให้เซลล์หดสั้นและเกิดการแตก (cell lysis) ในที่สุด และยังพบว่าสารสกัดจากเชื้อราดังกล่าวสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านม (human breast cancer MCF-7 cell line) โดยมีผลยับยั้งการกระจายตัวของเซลล์มะเร็งในระดับห้องปฏิบัติการได้

นอกจากประโยชน์ทางด้านการแพทย์แล้ว ยังพบว่าสารสกัดจากเชื้อรา *O. sobolifera* ยังมีบทบาทในการควบคุมเชื้อราก่อโรคในพืช โดยจากการรายงานของ Jaihan et al (2016; 2018) ได้ศึกษาผลการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคแอนแทรคโนสในพริกจากสารสกัดจากเชื้อราก่อโรคในแมลงที่แยกจากตัวอ่อนจักจั่น พบว่า สารสกัดจากเชื้อราไอโซเลท Cod-NB1302 ที่ระบุชนิดของเชื้อราเป็นชนิด *O. sobolifera* สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใย การงอกของสปอร์และลดรอยโรคที่เกิดจากเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสในพริกได้ โดยสารสกัดจากส่วนเส้นใยให้ผลการยับยั้งดีกว่าสารสกัดจากส่วนน้ำเลี้ยงเส้นใย และต่อมาได้ทำการศึกษาผลการยับยั้งเชื้อราสาเหตุก่อโรคแอนแทรคโนสในพริกของสารสกัดเชื้อรา *O. sobolifera* ไอโซเลท Cod-NB1302 ในสภาวะแปลงทดลอง พบว่า สารสกัดเส้นใยจากเชื้อราดังกล่าวสามารถลดรอยโรคที่เกิดจากเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนส *Collectrotrichum capsici* และ เชื้อรา *C. gloeosporioides* ในพริกได้ดีที่สุด (บริเวณรอยโรคเฉลี่ย 3.4±0.2 และ 3.6±0.44 มิลลิเมตร ตามลำดับ) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (บริเวณรอยโรคเฉลี่ย 22.2±1.24 และ 22.4±1.12 มิลลิเมตร ตามลำดับ) สารมาตรฐาน adenosine (บริเวณรอยโรคเฉลี่ย 18.6±1.86 และ 18.4±2.13 มิลลิเมตร ตามลำดับ) และ cordytropolone (บริเวณรอยโรคเฉลี่ย 11.2±1.06 และ 15.6±1.69 มิลลิเมตร ตามลำดับ) โดยเมื่อเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืชกับชุดควบคุมพบว่า สารสกัดจากเส้นใยเชื้อรามีประสิทธิภาพดีที่สุด และเมื่อนำสารมาตรฐานทั้งสองชนิด (adenosine และ cordytropolone) มาใช้ร่วมกันกับสารสกัดเส้นใยเชื้อราพบว่าสามารถเสริมฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้นในสภาวะแปลงทดสอบ ซึ่งจากผลการศึกษาในครั้งนี้สามารถยืนยันได้ว่า สารสกัดเส้นใยของเชื้อรา *O. sobolifera*

ไอโซเลท Cod-NB1302 สามารถยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสในพริกได้ทั้งในระดับห้องปฏิบัติการ (*in vitro*) และในแปลงทดสอบ (pot condition)

2.5 การจำแนกชนิดเชื้อราในสกุล *Ophiocordyceps*

การจำแนกหรือระบุชนิดของเชื้อราสกุล *Ophiocordyceps* ส่วนใหญ่จะอาศัยการศึกษาข้อมูลทางด้านสัณฐานวิทยา (morphological identification) และข้อมูลทางด้านโมเลกุล (molecular identification) โดยการศึกษาทางด้านสัณฐานวิทยาจะสังเกตลักษณะของส่วนสโตรมา ลักษณะของเพอริทีเชีย รูปร่างของแอสโคสปอร์และถุงหุ้มสปอร์ เป็นต้น (ภาพที่ 6) ซึ่งส่วนใหญ่จะพบส่วนสโตรมามีลักษณะอ่อนถึงแข็ง มีลักษณะเป็นเส้นยาวโผล่พ้นผิวดินหรืออยู่ตามบริเวณผิวของใบไม้ที่โฮสต์อาศัยอยู่ สีของสโตรมาส่วนใหญ่มีสี อ่อนถึงเข้มโดยเฉพาะสีน้ำตาลถึงดำ รูปร่างของสโตรมามักมีลักษณะรูปทรงกระบอก หรือคล้ายกระบองอาจมีเพียง 1 สโตรมาหรือมากกว่า 1 สโตรมาขึ้นไป (ส่วนใหญ่ไม่เกิน 3 สโตรมา) พบโครงสร้างส่วนเพอริทีเชียอยู่บริเวณส่วนปลายของสโตรมาหรืออยู่บริเวณกึ่งกลางสโตรมา รูปทรงกลม ภายในเพอริทีเชียจะพบถุงหุ้มสปอร์ที่มีรูปร่างรี ผนังหนา มีส่วน asci apex รูปร่างกลมหรือเกือบแบนอยู่บริเวณปลายสุดของถุงหุ้มสปอร์

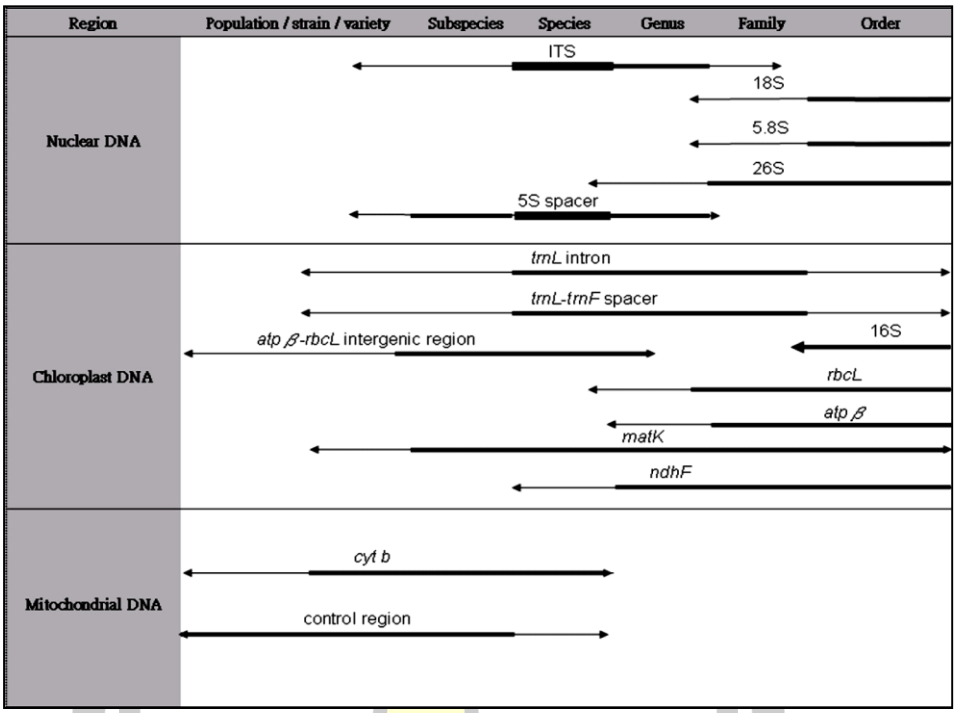


ภาพที่ 6 ตัวอย่างสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *O. septa*

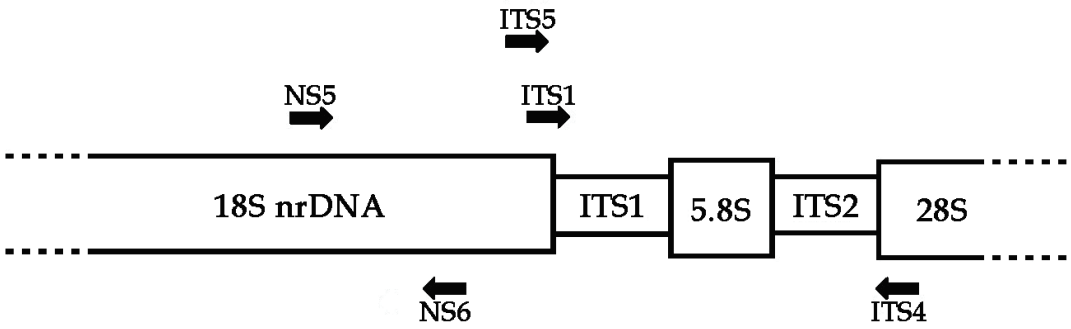
(ก) โฮสต์ของเชื้อรา *O. septa* (ข และ ค) ภาคตัดขวางบริเวณเพอริทีเชีย (ง และ จ) ถุงหุ้มสปอร์ และ (ฉ และ ช) แอสโคสปอร์

ที่มา: Kobmoo et al (2015)

สำหรับการจำแนกหรือระบุชนิดเชื้อราในสกุล *Ophiocordyceps* โดยอาศัยข้อมูลทางโมเลกุล (molecular identification) นิยมใช้เป็นข้อมูลช่วยในการศึกษาการจำแนกชนิดเนื่องจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางประการมีความคล้ายคลึงกันหรือช่วงระยะการสืบพันธุ์ทั้งสองระยะ (ระยะ anamorph และ teleomorph) มีการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยา ทำให้ไม่สามารถแยกได้ในระดับชนิด จึงจำเป็นต้องอาศัยข้อมูลทางโมเลกุลช่วยในการจำแนกชนิด โดยส่วนใหญ่การจัดจำแนกระดับโมเลกุลของสิ่งมีชีวิตไม่ว่าจะเป็นกลุ่มพืช สัตว์หรือแม้กระทั่งเชื้อรานิยมทำการศึกษาดีเอ็นเอในนิวเคลียส (nuclear DNA) ดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรีย (mitochondria DNA) หรือดีเอ็นเอในโครงสร้างคลอโรพลาสต์ (chloroplast DNA) (ใช้ศึกษาเฉพาะในกลุ่มพืชหรือสาหร่ายบางชนิด) ซึ่งขึ้นกับชนิดตัวอย่างที่ทำการศึกษา (ภาพที่ 7) (Yip, Chau, Mak, & Kwan, 2007) ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ โพลิเมอเรส (polymerase chain reaction: PCR) ซึ่งในกลุ่มของเชื้อรานิยมศึกษาในยีนส่วน internal transcribed spacer (ITS) ในการจำแนกในระดับชนิด โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ (ภาพที่ 8) (C.-S. Chen, et al., 2011) ต่อมา Sung et al (2007) ได้ทำการจัดจำแนกเชื้อราสกุล *Cordyceps* ในวงศ์ Clavicipitaceae ซึ่งเป็นเชื้อราอีกวงศ์ที่มีความหลากชนิดระหว่างสกุลมากที่สุดอีกกลุ่มหนึ่ง โดยอาศัยข้อมูลทางสัณฐานวิทยาร่วมกันการศึกษาทางโมเลกุลในส่วนยีน nuclear ribosomal small unit (nrSSU), nuclear ribosomal large unit (nrLSU), elongation 1α (tef1) largest subunit of RNA polymeraseII (rpb1) และ second largest subunit of RNA polymerase II (rpb2) สามารถจัดจำแนกได้เป็น 3 กลุ่มย่อย ได้แก่ Clavicipitaceae clade A Clavicipitaceae clade B และ Clavicipitaceae clade C และต่อมาได้มีการศึกษายีนบางส่วนเพิ่มเติมคือ ยีน β-tubulin และ mitochondrial ATP Synthase subunit 6 (mtATP6) จึงทำให้มีการจัดกลุ่มเชื้อราในวงศ์ Clavicipitacea ขึ้นใหม่ เป็นผลทำให้เชื้อราในวงศ์ Clavicipitacea เดิมบางชนิด ถูกย้ายไปอยู่วงศ์ใหม่ คือ วงศ์ Ophiocordycipitacea และมีการเปลี่ยนชื่อของเชื้อราให้สอดคล้องกับการจัดจำแนกใหม่ให้เป็นไปตามระบบ one fungus-one name (1F1N) ตามสกุลใหม่ที่ถูกจัดจำแนกขึ้นใหม่ ตัวอย่างเช่น *C. sinensis* เปลี่ยนชื่อเป็น *O. sinensis* *C. nutans* เปลี่ยนชื่อเป็น *O. nutans* และ *C. sobolifera* เปลี่ยนชื่อเป็น *O. sobolifera* เป็นต้น (Spatafora, et al., 2015; Sung, Hywel-Jones, et al., 2007; Sung, Sung, et al., 2007)



ภาพที่ 7 บริเวณตำแหน่งของยีนที่ใช้ในการจำแนกสิ่งมีชีวิตในแต่ละลำดับอนุกรมวิธาน
ที่มา: Yip et al (2007)



ภาพที่ 8 โครงสร้างยีนส่วน nuclear ribosomal DNA และชนิดไพรเมอร์ที่ใช้ในการระบุชนิดเชื้อรา
ที่มา: Chen et al (2011)

2.6 เครื่องหมายโมเลกุลสำหรับจำแนกชนิดเชื้อรา

การศึกษาเครื่องหมาย หรือ marker มีวัตถุประสงค์เพื่อบ่งชี้ความแตกต่างทางพันธุกรรม (genetic diversity) ของสิ่งมีชีวิต โดยอาจเป็นการจำแนกความแตกต่างในระหว่างและภายในสปีชีส์ ซึ่งเครื่องหมายที่ใช้ในการบ่งบอกความแตกต่างนี้ ได้แก่ เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยา (morphological marker) และเครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker)

เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยา จะใช้บอกถึงความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตโดยใช้การเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้งภายนอกและภายในเป็นเครื่องหมายที่สามารถมองเห็นได้ทันที เช่น สีของเส้นใยเชื้อรา รูปร่างของสปอร์ รูปร่างของสโตรมา เป็นต้น ซึ่งลักษณะที่ปรากฏในเชื้อราแต่ละชนิดมักจะขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมที่เชื้อราอาศัยอยู่ ทำให้ศึกษาลักษณะดังกล่าวเกิดข้อผิดพลาดได้ตามความแปรผันของลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่พบ แต่อย่างไรก็ตามการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาก็ยังมีความจำเป็นต้องศึกษาก่อนเป็นอันดับแรก แล้วจึงใช้วิธีการหรือศึกษาด้านอื่นประกอบเพื่อให้ได้ข้อมูลที่สมบูรณ์ขึ้น

เครื่องหมายโมเลกุล สามารถแยกได้เป็น 2 ชนิด คือ (1) เครื่องหมายโมเลกุลระดับโปรตีน (protein marker) เป็นเครื่องหมายที่ใช้ในการตรวจสอบโมเลกุลของโปรตีนชนิดต่างๆ โดยใช้ความแตกต่างของโมเลกุลโปรตีนด้วยเทคนิคอิเลคโตรโฟริซิส (electrophoresis) แยกขนาดโมเลกุลของโปรตีน แล้วย้อมดูแถบของโปรตีนโดยใช้สารที่เหมาะสมหรือตรวจสอบรูปแบบของเอนไซม์บางชนิดหรือไอโซไซม์ต่างๆ และ (2) เครื่องหมายโมเลกุลระดับดีเอ็นเอ (DNA marker) เป็นเครื่องหมายชิ้นส่วนของดีเอ็นเอในจีโนมที่แสดงพอลิมอร์ฟิซึม (polymorphism) หรือตรวจสอบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ในโมเลกุลของดีเอ็นเอ สามารถบอกความแตกต่างกันได้ทั้งในส่วนที่มียีน (coding DNA) และส่วนที่ไม่มียีน (noncoding DNA) ที่อยู่บนจีโนม ในปัจจุบันเทคนิคที่ใช้ในการศึกษาเครื่องหมายโมเลกุลระดับดีเอ็นเอมีหลายวิธี ดังนั้นวิธีการเลือกใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอจึงขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์และคุณสมบัติของเครื่องหมายดีเอ็นเอแต่ละประเภท ตัวอย่างเทคนิคที่ใช้ในการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่นิยมใช้ในการศึกษา (Korzun, 2002) ได้แก่

(1) เทคนิค Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) เป็นลักษณะของเครื่องหมายโมเลกุลที่สามารถบ่งบอกความแตกต่างทางพันธุกรรมหรือความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เกิดขึ้น โดยอาศัยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ในบริเวณการตัด (restriction site) ที่แตกต่างกัน ซึ่งสิ่งมีชีวิตต่างสายพันธุ์หรือต่างชนิดกัน ย่อมมีลำดับเบสของสารพันธุกรรมหรือดีเอ็นเอที่แตกต่างกันไม่มากก็น้อย ความแตกต่างนี้อาจเกิดจากการกลายพันธุ์ (mutation) ตามธรรมชาติอันเนื่องมาจากสภาพแวดล้อมหรืออาจเกิดจากข้อผิดพลาดของเซลล์เองในระหว่างขั้นตอนการจำลองดีเอ็นเอ ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเบสภายในดีเอ็นเอ เป็นผลทำให้เกิดความแตกต่างหรือความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตที่ส่งผลต่อตำแหน่งจดจำ (recognition site) ของเอนไซม์ตัดจำเพาะมีการเปลี่ยนแปลงไป ทำให้ได้ขนาดและจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน เรียกว่า การเกิดโพลีมอร์ฟิซึม (polymorphisms) เครื่องหมายอาร์เอฟแอลพี (RFLP marker) ซึ่งมีลักษณะเด่น คือ สามารถแยกความแตกต่างที่ดีเอ็นเอโดยตรง การตรวจสอบจะจำเพาะเจาะจงที่ยีนหรือตำแหน่งที่แน่นอนบนโครโมโซม (locus specific marker) ผลที่ได้จึงมีความแม่นยำและสามารถทำซ้ำได้ผลเหมือนเดิม (reproducibility) แต่วิธีการดังกล่าวมีข้อจำกัดในเรื่องของความไวที่น้อย

(sensitivity) ขั้นตอนยุ่งยาก ซับซ้อน และใช้เวลานาน ตลอดจนค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง ดีเอ็นเอที่ใช้ต้องมีปริมาณมากและบริสุทธิ์

(2) เทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) เป็นวิธีการใช้ตรวจสอบความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต โดยอาศัยหลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่ (PCR) แบบสุ่ม โดยอาศัยการเพิ่มจำนวนของไพรเมอร์แบบสุ่ม (random primer) ที่มีขนาดลำดับเบสสั้นประมาณ 10-12 นิวคลีโอไทด์ มีจำนวนชุดของเบสซ้ำและกลับทิศกัน และรวมทั้งอาศัยสภาวะการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในขั้นตอนการ annealing ที่ใช้อุณหภูมิค่อนข้างต่ำ (ประมาณ 28-38°C) จึงทำให้ได้จำนวนและชิ้นของดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกัน และสามารถนำมาใช้ประโยชน์เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอในการบ่งบอกชนิดของสายพันธุ์ (cultivar identification) ได้ ซึ่งวิธีการนี้ค่อนข้างน่าเชื่อถือ วิธีการไม่ยุ่งยาก ซับซ้อน สามารถทำได้ง่าย และรวดเร็ว เนื่องจากไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ไม่เฉพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอบริเวณใดบริเวณหนึ่งบนโครโมโซม ดังนั้นเทคนิคอาร์เอพีดีจึงเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ไม่เฉพาะเจาะจงที่ตำแหน่งยีนเหมือนอาร์เอฟแอลพี (RFLP) และความแตกต่างหรือโพลีมอร์ฟิซึมของอาร์เอพีดี มักเกิดในลักษณะมีและไม่มีแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งนั้นๆ แต่วิธีการนี้มีข้อจำกัดในเรื่องของการทำซ้ำ และต้องระมัดระวังและควบคุมสภาพการทดลองให้คงที่

(3) เทคนิค Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLP) เป็นวิธีการที่ตรวจสอบความแตกต่างของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) แล้วนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR) ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จะถูกต่อเข้ากับชิ้นดีเอ็นเอสังเคราะห์ที่ทราบรหัส (adapter) สองชนิด จากนั้นหากมีการเข้าคู่ที่เฉพาะเจาะจงระหว่างชิ้นดีเอ็นเอรหัสเริ่มต้นจำลองตัว (primer) กับชิ้นดีเอ็นเอสังเคราะห์ทราบรหัส (adapter) และเบสคัดเลือก (N) ในชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมาย จะทำให้ดีเอ็นเอเหล่านั้น มีการเพิ่มปริมาณขึ้นโดยปฏิกิริยาพีซีอาร์ เรียกขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบเฉพาะนี้ว่า “selective amplification” (Vos et al., 1995) ดังนั้นแถบดีเอ็นเอ (DNA profile) ที่เกิดขึ้นจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เอเอฟแอลพีไพรเมอร์ (AFLP primer) คู่หนึ่งๆนี้ จะเรียกว่า “ลายพิมพ์เอแอฟแอลพี” (AFLP fingerprint) ซึ่งแถบดีเอ็นเอในลายพิมพ์ของแต่ละตัวอย่างที่ปรากฏจะบ่งบอกถึงความแตกต่างของชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแต่ละชนิด ข้อดีของวิธีการนี้คือจำนวนเครื่องหมายโมเลกุลที่มีจำนวนมาก (abundance) และครอบคลุมทั้งจีโนม (extensive genome coverage) ในปฏิกิริยาหนึ่งๆ สามารถตรวจสอบดีเอ็นเอได้หลายตำแหน่ง (multilocus) พร้อมๆกัน (relatively high effective multiplex ratio) ใช้ปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นในการทำปฏิกิริยาในจำนวนที่น้อย และสามารถทำการตรวจสอบซ้ำจะให้ผลเหมือนเดิม (reproducibility) แต่มีข้อจำกัดคือ ค่าใช้จ่ายในการดำเนินการค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับการทำพีซีอาร์ทั่วไป และการเลือกใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะทั้งสองชนิด และชนิดของเบสคัดเลือกของเอเอฟแอลพีไพรเมอร์จะมีผลต่อชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกเลือกให้มี

การเพิ่มปริมาณ ดังนั้นเพื่อให้ได้ข้อมูลเพียงพอโดยไม่ต้องทำการทดลองหลายครั้ง จึงต้องคำนึงถึงขนาดของจีโนมตัวอย่างที่นำมาทำการศึกษา

(4) เทคนิค Simple Sequence Repeat (SSR) หรือไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite) เป็นเทคนิคเครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้หลักการกระจายตัวของลำดับเบสที่มีเบสซ้ำ (repetitive DNA) ภายในจีโนมของสิ่งมีชีวิตกลุ่มยูคาริโอต ความผันแปรของจำนวนเบสซ้ำในจีโนมนี้ สามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลในการแยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตได้ดี โดยที่ลักษณะของโพลีมอร์ฟิซึมที่เกิดขึ้นนั้น เป็นผลเนื่องมาจากจำนวนครั้งของเบสซ้ำของไมโครแซทเทลไลท์ในโลกัสหนึ่งๆได้ ซึ่งใช้บ่งบอกความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตได้ เทคนิคนี้อาจมีชื่อเรียกแตกต่างกันไป เช่น Simple Sequence Repeats (SSR) Simple Sequence Length Polymorphisms (SSLP) และ Sequence-tagged Microsatellite Site (STMS) เป็นต้น ข้อดีของวิธีการดังกล่าวคือ มีความจำเพาะทำให้ตรวจสอบความแตกต่างของเบสได้มากกว่าหนึ่งอัลลีลในตำแหน่งเดียวกัน (high informative content) ตรวจสอบง่ายและใช้ปริมาณดีเอ็นเอที่น้อย แต่มีข้อจำกัดในเรื่องค่าใช้จ่ายที่สูงในการเลือกไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะและต้องทราบลำดับเบสของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษา

(5) เทคนิค Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) เป็นเทคนิคที่อาศัยตำแหน่งบนนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอที่เกิดการกลาย (mutation) หรือเกิดการเปลี่ยนแปลงของเบสจำนวน 1 ตำแหน่ง ซึ่งตรวจสอบได้โดยอาศัย restriction enzyme ช่วยในการตัดในบริเวณจดจำที่แตกต่างกันหรืออาศัยเทคนิค PCR ร่วมด้วย ดังนั้นเทคนิคนี้จึงนิยมใช้แยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตจากตำแหน่งเบสบนสายดีเอ็นเอเดียวกันที่มีความแตกต่างกันเพียงหนึ่งตำแหน่ง

เทคนิคที่ใช้ในการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ดีควรมีลักษณะง่าย ราคาถูก ให้ผลความไวในการจำแนกชนิดสูง มีความเป็นโพลิมอร์ฟิซึมของแถบดีเอ็นเอ สามารถทำซ้ำให้ผลได้เหมือนเดิม ดังนั้นการศึกษาเครื่องหมายโมเลกุลแต่ละประเภทจึงต้องคำนึงถึงความเหมาะสมต่อตัวอย่างที่ศึกษาเพื่อให้ได้เครื่องหมายโมเลกุลที่มีประสิทธิภาพและน่าเชื่อถือ

2.7 การระบุชนิดเชื้อรา *Ophiocordyceps* sp. โดยอาศัยเทคนิคเครื่องหมายโมเลกุล

Chen et al (1999) ได้ทำการศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมและอนุกรมวิธานของเชื้อรา *C. sinensis* (= *O. sinensis*) โดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด RAPD พบว่า เครื่องหมาย RAPD สามารถนำมาใช้แยกความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอเชื้อรา *C. sinensis* ได้โดยเมื่อนำตัวอย่างเชื้อราทั้งหมด 29 ตัวอย่าง ที่เก็บและสำรวจจากบริเวณเทือกเขาทิเบตในประเทศจีน สามารถจัดกลุ่มเชื้อราได้ 3 กลุ่ม คือ กลุ่ม north population (NP) จำนวน 7 ตัวอย่าง กลุ่ม middle population (MP)

จำนวน 8 ตัวอย่าง และกลุ่ม south population (SP) จำนวน 14 ตัวอย่าง ซึ่งทั้งสามกลุ่มนี้มีความแตกต่างกันตามลักษณะภูมิศาสตร์แหล่งอาศัยของเชื้อรา

Wang et al (2011) ได้ทำการศึกษาและออกแบบพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิดไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite markers) เพื่อใช้สำหรับระบุชนิดของเชื้อรา *O. sinensis* (Ophiocordycipitaceae) ด้วยเทคนิค ISSR-TAIL-PCR โดยทำการศึกษาตัวอย่างเชื้อราจำนวน 48 ตัวอย่างจาก 5 เขตมณฑลของประเทศจีน ได้แก่ มณฑลเสฉวน มณฑลกานซู มณฑลชิงไห่ มณฑลทิเบต และมณฑลยูนาน ผลการศึกษาพบว่า มีไพรเมอร์จำนวน 33 ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนบริเวณไมโครแซทเทลไลท์ โดยพบยีนจำนวน 17 ตำแหน่ง ที่แสดงลักษณะโพลิมอร์ฟิซึม (polymorphism) บริเวณ 2-4 อัลลีลต่อตำแหน่งยีนที่แสดงลักษณะโพลิมอร์ฟิซึม ในขณะที่พบยีน 13 ตำแหน่ง แสดงลักษณะโมโนมอร์ฟิซึม (monomorphism) ที่พบในช่วงการเจริญระยะ anamorph ที่มีลักษณะโครโมโซมแบบแฮพลอยด์ (haploid) และรูปแบบของไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอที่ได้มีความแตกต่างกันตามแหล่งการกระจาย ภูมิศาสตร์ และลักษณะประชากรที่พบ ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นเทคนิค ISSR-TAIL-PCR สามารถนำมาใช้เพื่อการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลของเชื้อรา *O. sinensis* ได้

Yao et al (2014) ทำการศึกษาลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *C. sinensis* (= *O. sinensis*) ในแต่ละช่วงการเจริญด้วยเครื่องหมายโมเลกุลชนิด RAPD พบว่าเครื่องหมายโมเลกุลชนิด RAPD สามารถระบุความคล้ายคลึงของดีเอ็นเอในส่วนสโตรมาของแต่ละช่วงการเจริญเป็น 3 ระดับ คือ ระดับต่ำ ปานกลาง และสูง ซึ่งให้ขนาดดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน โดยให้ค่า polymorphic similality เท่ากับ 0.87

Lam et al (2015) ทำการศึกษาและพัฒนาวิธีการยืนยันชนิดของเชื้อรา *C. sinensis* (= *O. sinensis*) โดยใช้ยีนส่วน ITS และพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิด RAPD-SCAR เพื่อแยกความต่างของชนิดของเชื้อราในสกุล *Cordyceps* พบว่า เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราในสกุล *Cordyceps* ได้แก่ *C. sinensis C. gracilis C. hawkesii* และ *C. gunnii* พบมีลักษณะสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกัน และเมื่อศึกษาในส่วนลำดับเบสของยีน ITS สามารถแยกกลุ่มของเชื้อรา *C. sinensis* ออกจากชนิดอื่น และเมื่อนำเทคนิค RAPD-SCAR มาใช้ในการระบุชนิด พบว่า ลักษณะขนาดดีเอ็นเอของ *C. sinensis* มีความแตกต่างจากเชื้อราชนิดอื่นๆ ซึ่งจากผลการศึกษา พบว่าการใช้ยีนในส่วน ITS และเทคนิค RAPD-SCAR สามารถใช้แยกความต่างในระดับชนิดของเชื้อราในสกุล *Cordyceps* ได้ โดยเทคนิค RAPD-SCAR ที่นำมาศึกษาสามารถให้ผลการทำซ้ำที่แน่นอน (reproductively) และเป็นวิธีการที่รวดเร็วซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลในการตรวจหาและระบุชนิดของเชื้อราสกุล *Cordyceps* ได้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 ตัวอย่างเชื้อราที่ใช้ในการศึกษา

ทำการเก็บตัวอย่างตัวอ่อนจักจั่น (cicada larvae) ที่ถูกเชื้อราแมลงเข้าทำลายในบริเวณป่าเบญจพรรณ ในเขตพื้นที่จังหวัดขอนแก่น โดยเลือกบริเวณป่าที่พบตัวเต็มวัยและคราบจักจั่นบนต้นไม้ในช่วงฤดูฝน (ระหว่างช่วงเดือนพฤษภาคม ถึงสิงหาคม) และนำตัวอย่างมาแยกเชื้อราด้วยวิธี tissue transplanting โดยนำตัวอ่อนจักจั่นมาล้างด้วยน้ำให้สะอาด ผึ่งลมให้แห้ง ทำการตัดแยกตัวอ่อนจักจั่นออกเป็นสองส่วน ตัดส่วนเนื้อเยื่อด้านในขนาด 5x5 ตารางเซนติเมตร จากนั้นทำการฆ่าเชื้อบริเวณผิวชิ้นตัวอย่างด้วยสารละลาย 10% sodium hypochloride นาน 2 นาที จุ่มล้างชิ้นตัวอย่างในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อประมาณ 2-3 ครั้ง นานครั้งละ 2 นาที และนำชิ้นส่วนตัวอย่างที่ปราศจากเชื้อมาทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร potato dextrose agar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิ 25-28°C นาน 7 วัน สังเกตการเจริญของเส้นใยเชื้อราที่แทงงอกออกมาจากชิ้นตัวอย่าง เมื่อเส้นใยเชื้อราเจริญคลุมบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการ sub-culture ตัวอย่างเชื้อราที่ได้ เพื่อนำไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป (A. Sangdee & Sangdee, 2013)

3.2 การระบุชนิดของเชื้อรา

ทำการเลี้ยงเส้นใยเชื้อราที่แยกได้จากตัวอ่อนจักจั่นในแต่ละไอโซเลทบนอาหารแข็งสูตร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 25-28°C นาน 20 วัน จากนั้นทำการเก็บเส้นใยเชื้อราและบดเส้นใยให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว นำเส้นใยที่บดละเอียดไปสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดทดสอบ plant DNA extraction kit (Vivantis, USA) นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจหาขนาดของดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 1% และทำการเก็บดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ –20°C เพื่อใช้ในการศึกษาขั้นตอนต่อไป

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (polymerase chain reaction: PCR) เพื่อทำการระบุชนิดของเชื้อราโดยเลือกใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนในส่วน ITS ได้แก่ ไพรเมอร์ ITS1 (5′-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3′) และ ITS4 (5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′) ตามวิธีการของ Sangdee และคณะ (2015) ซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้

total genomic DNA (ปริมาณ 100 ng)	2 µl
10X PCR buffer	5 µl
25 µM $MgCl_2$	2 µl

2.5 µM dNTPs	4 µl
10 µM ไพรเมอร์จำเพาะ (แต่ละชนิด)	1 µl
5 U/µl *Taq* DNA polymerase	0.5 µl
sterile deionized water	34.5 µl

ทำการผสมสารดังกล่าวในปริมาตรรวม 50 µl นำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอภายใต้สภาวะที่กำหนด คือ ขั้นตอนที่ 1: อุณหภูมิ 94°C นาน 4 นาที ขั้นตอนที่ 2: อุณหภูมิ 94°C นาน 1 นาที อุณหภูมิ 55°C นาน 45 วินาที และอุณหภูมิ 72°C นาน 1.5 นาที จำนวน 38 รอบ และขั้นตอนที่ 3: อุณหภูมิ 72°C นาน 10 นาที ด้วยเครื่อง Thermal cycler (Veriti 96-well Thermal cycler, Applied Biosystems, USA) ทำการตรวจสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ที่ได้จากปฏิกิริยา PCR (PCR product) โดยนำไปแยกบนอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 1% (Sangdee et al., 2015) และทำการวิเคราะห์หาลำดับเบสตามวิธีของหน่วยบริการบริษัท Macrogen Advancing through Genomics (Macrogen Inc., Korea) เมื่อได้ลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วจึงนำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Bioedit version 7.1.9 และโปรแกรมวิเคราะห์ BLAST analysis (www.ncbi.nih.gov/blast) จากนั้นทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล GenBank (National Center for Biotechnology Information: NCBI) ที่ได้มีการรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อรา *O. sobolifera* ไว้แล้ว และทำการวิเคราะห์ระบุชนิดของเชื้อราและสายสัมพันธ์วิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ด้วยโปรแกรม Molecular Evolutionary Genetics analysis version 6 (MEGA 6) โดยวิเคราะห์แบบ Neighbor-Joining (NJ) ตามรูปแบบ Kimura 2-parameter ด้วยการทำ Bootstrap จำนวน 1000 ครั้ง (replications)

3.3 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญบนอาหารสูตรสังเคราะห์

3.3.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *O. sobolifera*

นำตัวอย่างที่ถูกระบุในข้อ 3.2 ว่าเป็นเชื้อราชนิด *O. sobolifera* มาทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้งภายในและภายนอกโดยทำการศึกษาสัณฐานวิทยาภายนอกด้วยตาเปล่า (macroscopic characters) ได้แก่ สี รูปร่าง ความสูง ความกว้าง ลักษณะผิวและเนื้อสัมผัส จำนวนและลักษณะของสโตรมาหรือฟรุตติ้งบอดี้ที่เจริญอยู่บนตัวโฮสต์ รวมถึงชนิดของโฮสต์ และระบุแหล่งที่พบตัวอย่าง

ส่วนการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใน จะทำการตัดตามขวางบริเวณส่วนของสโตรมาและสังเกตลักษณะโครงสร้างภายในของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscopic) และกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (stereo microscopic) ได้แก่ ขนาด รูปร่าง

ลักษณะของโครงสร้างเพอริทีเชีย การเรียงตัวของเพอริทีเชียบนสโตรมา รูปร่าง ลักษณะ สี และขนาดของโคนิเดีย แอสโคสปอร์ และถุงหุ้มสปอร์

3.3.2 การศึกษาการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *O. sobolifera* บนอาหารสูตรสังเคราะห์

ทำการศึกษาลักษณะของเส้นใยโคโลนีเชื้อราบนอาหารสังเคราะห์สูตรต่างๆ 7 ชนิดในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ potato dextrose agar (PDA) sabouraud dextrose agar (SDA) malt extract agar (MEA), yeast malt agar (YMA) Czapek Dox agar (CDA) oat meal agar (OMA) และ homogenized died cricket glucose agar (HCGA) (K. Sangdee, Nakbanpote, & Sangdee, 2015) โดยตัดบริเวณส่วนปลายของเส้นใยเชื้อรา *O. sobolifera* ด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 7 มิลลิเมตร นำชิ้นส่วนเส้นใยโคโลนีเชื้อรามาวางบนอาหารสูตรสังเคราะห์ในแต่ละชนิด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25-28°C นาน 20 วัน สังเกตลักษณะโคโลนี สี และลักษณะเส้นใยเชื้อราที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด ทำการวัดความกว้างของโคโลนีเชื้อรา และบันทึกผลการเจริญของเชื้อรา

3.4 การทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี agar well diffusion

3.4.1 การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทดสอบ

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดเส้นใย (mycelial extract) จากเชื้อรา *O. sobolifera* ทำโดยนำสารสกัดจากเชื้อรา *O. sobolifera* มาทำการทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียก่อโรคสายพันธุ์มาตรฐาน (reference strain) จำนวน 15 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bacillus cereus* ATCC11778 *Pseudomonas aeroginosa* ATCC27853 *Salmonella typhimurium* ATCC14028 *Escherichia coli* O157:H7 DMST12743 *Escherichia coli* (EIEC) DMST30545 *Salmonella typhi* DMST22842 *Salmonella typhi* DMST16122 *Shigella flexeri* DMST4423 *Shigella flexeri* DMST17569 *Shigella dysenteriae* DMST15110 Methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* MRSA DMST20651 (MRSA) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* MRSA DMST20654 (MRSA) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* MRSA DMST4783 (MRSA) Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* MSSA DMST2933 (MSSA) และ *Vibrio cholerae* (O1) DMST9700 ส่วนสายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากผู้ป่วย (patient strain) จำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Klebsiella pneumonia* *Pseudomonas aeroginosa* (Ptl) *Enterobacter cloacae* *Proteus vulgaris* และ *Proteus mirabilis* โดยเชื้อแบคทีเรียทดสอบทั้งหมดได้รับความอนุเคราะห์จากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กุสาวดี แสงดี ภาควิชาปรีคลินิก คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียทดสอบมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยง

เชื้อสูตร Mueller-Hinton broth (MHB) เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นเชื้อแบคทีเรียตั้งต้น (bacterial stock) ในการนำไปทดสอบในขั้นตอนต่อไป

3.4.2 การสกัดสารสกัดเส้นใย (mycelial extract) จากเชื้อรา *O. sobolifera*

ทำการเลี้ยงเส้นใยของเชื้อรา *O. sobolifera* แต่ละไอโซเลทในอาหารเหลวสูตร induce medium (ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 35 กรัมต่อลิตร เปปโตน 5 กรัมต่อลิตร สารสกัดยีสต์ 2.5 กรัมต่อลิตร $MgSO_4$ 0.5 กรัมต่อลิตร KH_2PO_4 1 กรัมต่อลิตร และวิตามิน B1 0.05 กรัมต่อลิตร) (Huang, Li, Chen, Wang, & Zhou, 2009) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25-28°C เป็นเวลานาน 20 วัน เมื่อครบตามกำหนด ทำการเก็บเส้นใยและอบแห้งที่อุณหภูมิ 50°C บดเส้นใยให้เป็นผงละเอียด ชั่งน้ำหนักเส้นใยจำนวน 1 กรัม นำไปสกัดด้วยตัวทำละลาย 50% เอทานอล ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (ความเข้มข้นสารสกัดเท่ากับ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) จากนั้นนำไปสกัดโดยใช้วิธีการ sonicated ด้วยเครื่อง high intensity ultrasonic processor (Model VCX750, USA) เป็นเวลานาน 5 นาที บนน้ำแข็ง นำสารแขวนลอยที่ได้ไปทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm นาน 5 นาที ดูดเก็บส่วนใส (supernatant) นำไปกรองผ่าน filter membrane ขนาด 0.2 ไมโครเมตร สารละลายที่ได้จะเรียกว่า “สารสกัดเส้นใย (mycelial extract)” ทำการแบ่งสารละลายส่วนหนึ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C และอีกส่วนหนึ่งนำไปสกัดให้ได้เป็นสารสกัดโปรตีน (crude protein) เพื่อนำไปทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียในขั้นตอนต่อไป

3.4.3 การสกัดสารสกัดโปรตีน (crude extract) จากส่วนเส้นใยของเชื้อรา *O. sobolifera*

นำสารสกัดเส้นใยมาทำการแยกสกัดโปรตีน โดยการนำสารสกัดเส้นใยปริมาตร 6 มิลลิลิตร มาตกตะกอนด้วยสารละลายแอมโมเนียมอะซีเตท (ammonium acetate) ในเมทานอล (อัตราส่วนสกัด 1:3) เขย่าโดยพลิกหลอดกลับไปมา บ่มที่อุณหภูมิ -20°C นาน 3 ชั่วโมง ทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm นาน 10 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้ง เก็บส่วนตะกอนโปรตีนที่ได้ ทำการละลายตะกอนโปรตีนด้วยสาร DMSO ปริมาตร 300 µl และปรับปริมาตรให้ครบ 5 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ กรองสารละลายที่ได้ผ่าน filter membrane ขนาด 0.2 ไมโครเมตร จะได้สารละลายสกัดที่เรียกว่า “สารสกัดโปรตีน (crude protein)” ทำการวัดปริมาณโปรตีนด้วยเครื่อง micro-volume UV-Vis spectrophotometer (Nano-Drop) ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร แล้วปรับความเข้มข้นโปรตีนให้มีค่าเท่ากับ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อนำไปทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียในขั้นตอนต่อไป

3.4.4 การทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากเชื้อรา *O. sobolifera* ด้วยวิธี agar well diffusion

1) การทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคของสารสกัดเส้นใย (mycelial extract) จากเชื้อรา *O. sobolifera*

นำสารสกัดเส้นใยที่สกัดได้จากเชื้อรา *O. sobolifera* (ในข้อ 3.4.2) แต่ละไอโซเลทมาทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในเบื้องต้น ด้วยวิธีการ agar well diffusion โดยนำแบคทีเรียทดสอบทั้ง 20 สายพันธุ์ (ข้อ 3.4.1) มาทำการถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB หลอดใหม่ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 3 ชั่วโมง ด้วยเครื่องบ่มเชื้อแบบเขย่า (incubator shaker) เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ให้เชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นแต่ละชนิดมีค่าความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland standard (4-5x10^8CFU/ml) จากนั้นปรับความเข้มข้นของเชื้อแต่ละชนิดให้ได้ประมาณ 4-5x10^6 CFU/ml ด้วย 1XPBS นำไม้พันสำลีปราศจากเชื้อมาจุ่มเชื้อแบคทีเรียทดสอบและทำการป้ายเชื้อ (swab) ให้ทั่วบริเวณผิวหน้าอาหารสูตร Mueller-Hinton agar (MHA) ทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที เมื่อผิวหน้าอาหารแห้ง ทำการเจาะหลุมขนาด 0.7 เซนติเมตร ด้วย cork borer ที่ปราศจากเชื้อ จากนั้นเติมสารสกัดทดสอบ ได้แก่ สารสกัดหยาบจากเส้นใยในแต่ละไอโซเลท (ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 100 µl ลงในแต่ละหลุม สำหรับชุดควบคุมจะใช้สารละลายเอทานอลเข้มข้น 50% และยาปฏิชีวนะ tetracycline (ความเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และ ciprofloxacin (ความเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) แทนสารสกัด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 16-18 ชั่วโมง สังเกตบริเวณการยับยั้งที่เกิดขึ้น (inhibition zone) และเปรียบเทียบบริเวณการยับยั้งของสารสกัดทดสอบเทียบกับชุดควบคุม แล้วทำการคัดเลือกสารสกัดเส้นใยจากเชื้อรา *O. sobolifera* ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ดีที่สุด เรียกว่า Active isolate ไปศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดโปรตีนต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในขั้นตอนต่อไป

2) การทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคของสารสกัดโปรตีน (crude protein) จากเชื้อรา *O. sobolifera*

นำสารสกัดโปรตีนจากเชื้อรา O. sobolifera จำนวน 16 ไอโซเลท ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียดีที่สุด โดยเฉพาะแบคทีเรียกลุ่มแกรมบวก มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ด้วยวิธี agar well diffusion นำแบคทีเรียทดสอบจำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bacillus cereus* ATCC11778 Methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* MRSA DMST20651 Methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* MRSA DMST20654 Methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* MRSA DMST4783 และ Methicillin- susceptible *Staphylococcus aureus* MSSA DMST2933 มาทำการถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB หลอดใหม่ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 3 ชั่วโมง ด้วยเครื่องบ่มเชื้อแบบเขย่า (incubator shaker) เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

ให้เชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นแต่ละชนิดมีค่าความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland standard (4-5x10^8CFU/ml) จากนั้นปรับความเข้มข้นของเชื้อแต่ละชนิดให้ได้ประมาณ 4-5x10^6 CFU/ml ด้วย 1XPBS นำไม้พันสำลีปราศจากเชื้อมาจุ่มเชื้อแบคทีเรียทดสอบและทำการป้ายเชื้อให้ทั่วบริเวณผิวหน้าอาหารสูตร Mueller-Hinton agar (MHA) ทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที เมื่อผิวหน้าอาหารแห้ง ทำการเจาะหลุมขนาด 0.7 เซนติเมตรด้วย cork borer ที่ปราศจากเชื้อ จากนั้นเติมสารสกัดทดสอบได้แก่ สารสกัดโปรตีนในแต่ละไอโซเลท (ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 100 µl ในแต่ละหลุม สำหรับชุดควบคุมจะใช้สารละลาย dimethylsulfoxide (DMSO) และยาปฏิชีวนะ tetracycline และ ciprofloxacin แทนสารสกัด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 16-18 ชั่วโมง สังเกตบริเวณการยับยั้งที่เกิดขึ้น (inhibition zone) และเปรียบเทียบบริเวณการยับยั้งของสารสกัดทดสอบเทียบกับชุดควบคุม

3.4.5 การหาระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (minimum inhibitory concentration: MIC) และระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (minimum bactericidal concentration: MBC) ของสารสกัดเส้นใยและสารสกัดโปรตีนจากเชื้อรา *O. sobolifera*

นำสารสกัดเส้นใยและสารสกัดโปรตีนจากเชื้อรา *O. sobolifera* ที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในข้อ 3.4.4 มาทำการหาระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (MIC) และระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC) ตามวิธีการดังนี้

1) การหาค่าระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (MIC) ของสารสกัดเส้นใยและสารสกัดโปรตีนจากเชื้อรา *O. sobolifera*

1.1 วิธี agar well diffusion

นำสารสกัดเส้นใยและสารสกัดโปรตีนจากเชื้อรา *O. sobolifera* ที่ให้ผลการยับยั้งเชื้อที่ดีที่สุด (active isolate) จำนวน 16 ไอโซเลท มาหาค่า MIC ด้วยวิธี agar well diffusion โดยทำการเจือจางความเข้มข้นลดลงทีละสองเท่า (serial two-fold dilution) ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้ได้ในแต่ละความเข้มข้นทดสอบที่ต้องการ (ที่ระดับ 100 50 25 12.5 6.25 3.125 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สำหรับสารสกัดเส้นใย และ 20 10 5 2.5 1.25 0.625 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สำหรับสารสกัดโปรตีน) เตรียมเชื้อแบคทีเรียทดสอบทั้ง 5 สายพันธุ์ให้มีค่าความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland standard (4-5x10^8 CFU/ml) จากนั้นปรับความเข้มข้นของเชื้อแต่ละชนิดให้ได้ประมาณ 4-5x10^6 CFU/ml ด้วย 1XPBS นำไม้พันสำลีปราศจากเชื้อมาจุ่มเชื้อแบคทีเรียทดสอบและทำการป้ายเชื้อให้ทั่วบริเวณผิวหน้าอาหารสูตร Mueller-Hinton agar (MHA) ทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที เมื่อผิวหน้าอาหารแห้ง ทำการเจาะหลุมขนาด 0.7 เซนติเมตรด้วย cork borer ที่ปราศจากเชื้อ จากนั้นทำการเติมสารสกัดทดสอบ (สารสกัดเส้นใยหรือสารสกัดโปรตีน) ในแต่ละความเข้มข้นที่เจือจางแล้วลงในแต่ละหลุมบนอาหาร MHA

สำหรับชุดควบคุมจะใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อ และยาปฏิชีวนะ (tetracycline และ ciprofloxacin) แทนสารสกัด จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 16-18 ชั่วโมง สังเกตบริเวณการยับยั้งของเชื้อแบคทีเรียในแต่ละระดับความเข้มข้น ทำการอ่านค่า MIC ของสารสกัดทดสอบที่ระดับความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียรอบๆ หลุมทดสอบ (ไม่พบบริเวณการยับยั้ง)

1.2 วิธี microdilution plate

สำหรับการหาค่า MIC ของสกัดเส้นใยและสารสกัดโปรตีนจากเชื้อรา *O. sobolifera* ด้วยวิธี microdilution plate ทำใน 96 well plate โดยการเจือจางความเข้มข้นลดลงทีละสองเท่า (serial two-fold dilution) ในอาหารเหลวสูตร MHB ให้ได้แต่ละความเข้มข้นทดสอบที่ต้องการในแต่ละหลุมบน 96 well plate (ที่ระดับ 100 50 25 12.5 6.25 3.125 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สำหรับสารสกัดเส้นใย และ 20 10 5 2.5 1.25 0.625 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สำหรับสารสกัดโปรตีน) เตรียมเชื้อแบคทีเรียทดสอบจำนวน 5 สายพันธุ์ ให้มีค่าความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland standard (4-5x10^8 CFU/ml) จากนั้นปรับความเข้มข้นของเชื้อแต่ละชนิดให้ได้ประมาณ 4-5x10^6 CFU/ml ด้วย 1XPBS จากนั้นทำการเติมเชื้อแบคทีเรียทดสอบลงในแต่ละหลุม ปริมาตร 10 µl สำหรับชุดควบคุมจะประกอบด้วยหลุมที่เติมเฉพาะเชื้อทดสอบไม่เติมสารสกัด หลุมที่เติมยาปฏิชีวนะ tetracycline กับเชื้อทดสอบ หลุมที่เติมยาปฏิชีวนะ ciprofloxacin กับเชื้อทดสอบ และหลุมที่มีเฉพาะอาหาร MHB เพียงอย่างเดียว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 16-18 ชั่วโมง สังเกตความขุ่นของเชื้อแบคทีเรียในแต่ละหลุม ทำการอ่านค่า MIC ของสารสกัดทดสอบที่ระดับความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ (หลุมสุดท้ายที่ไม่พบการเจริญของเชื้อ)

2) การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC) ของสารสกัดเส้นใยและสารสกัดโปรตีนจากเชื้อรา *O. sobolifera*

ทำโดยการ sub-culture จากในแต่ละหลุมที่ได้ทดสอบหาค่า MIC โดยวิธี microdilution plate โดยการขีดเชื้อแบบ simple streak ลงบนอาหารสูตร MHA บ่มอีกครั้งที่อุณหภูมิ 37°C นาน 16-18 ชั่วโมง สังเกตรอยการเจริญของเชื้อตามรอยขีดบนผิวหน้าอาหาร อ่านค่า MBC โดยอ่านที่ระดับความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (ไม่พบการเจริญของเชื้อ)

3.5 การวิเคราะห์ขนาดและชนิดของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE และ GC-MS/MS

สารสกัดโปรตีนจากเส้นใยเชื้อรา *O. sobolifera* ที่ให้ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ดีที่สุดจะถูกนำมาทำการแยกและตรวจหาขนาดโมเลกุลโปรตีนด้วยวิธี sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ตามวิธีการของ Sambrook และคณะ (1989) โดยนำตัวอย่างโปรตีนที่ตกตะกอนได้ (ความเข้มข้นของตัวอย่างโปรตีนเท่ากับ 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

มาผสมกับสารละลาย protein sample buffer ในอัตราส่วน 1:2 (v/v) นำไปต้ม 5 นาที และนำไปแช่ที่อุณหภูมิ -20°C ก่อนนำไปแยกบนตัวกลางเจลตามระบบ discontinuous SDS-PAGE โดยใช้ 12% resolving gel และ 5% stacking gel เมื่อเจลแข็งตัวจึงทำการเติมตัวอย่างโปรตีน ปริมาตร 10 µl ลงในช่องเจล และปล่อยให้ตัวอย่างโปรตีนเคลื่อนที่ภายใต้สภาวะกระแสไฟฟ้าคงที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 1.30 ชั่วโมง และทำการย้อมเจลด้วยสีย้อม coomassie brilliant blue R-250 staining buffer ล้างสีส่วนเกินออกด้วย destaining solution ก่อนนำไปบันทึกภาพ (Sambrook, Fritsch, & Maniatis, 1989) และทำการตัดแถบขนาดโปรตีนที่ต้องการส่งวิเคราะห์เพื่อหาโครงสร้างโปรตีนด้วยวิธี GC-MS/MS โดยใช้บริการจากหน่วยบริการของบริษัท Proteomics International ประเทศออสเตรเลีย จากนั้นนำลำดับกรดอะมิโนที่ได้มาวิเคราะห์และเทียบชนิดของโปรตีนที่มีการรายงานในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ ExPASy และ BLAST analysis (www.ncbi.nih.gov/blast)

3.6 การออกแบบเครื่องหมายโมเลกุลด้วยวิธี random amplified polymorphic DNA-sequence characterized amplified region (RAPD-SCAR)

3.6.1 การคัดเลือกไพร์เมอร์ที่เหมาะสมด้วยเทคนิค random amplified polymorphic DNA (RAPD)

นำ genomic DNA ของเชื้อรา *O. sobolifera* ไอโซเลท Cod-KK1519 ซึ่งใช้เป็นตัวแทนของเชื้อราในกลุ่มที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ดีที่สุด นำมาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์แบบสุ่ม (random primer) จำนวน 22 ไพรเมอร์ (Operon technologies company, USA) ด้วยเทคนิค RAPD เพื่อทำการคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการใช้ออกแบบเครื่องหมายโมเลกุล ตามวิธีการที่ได้ดัดแปลงจากวิธีการของ Lam และคณะ (2015) (ตารางที่ 1)

พหุน ปณ ฑิโต ชีเว

ตารางที่ 1 แสดงชื่อและลำดับเบสของไพร์เมอร์แบบสุ่มที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี RAPD

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบส (5′→ 3′)	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบส (5′→ 3′)
OPC10	TGTCTGGGTG	OPI07	CAGCGACAAG
OPD11	AGCGCCATTG	OPI09	TGGAGAGCAG
OPE20	AACGGTGACC	OPI18	TGCCCAGCCT
OPF06	GGGAATTCGG	OPT08	AACGGCGACA
OPG01	CTACGGAGGA	OPI09	CACCCCTGAT
OPG03	GAGCCCTCCA	OPT12	GGGTGTGTAG
OPH01	GGTCGGAGAA	OPT13	AGGACTGCCA
OPH03	AGACGTCCAC	OPT14	AATGCCGCAG
OPH13	GACGCCACAC	OPT17	CCAACGTCGT
OPH18	GAATCGGCCA	OPT19	GTCCGTATGG
OPH19	GAATCGGCCA	OPT20	GACCAATGCC

ทำการเติมสารละลายในการทำ RAPD ดังนี้ เติม genomic DNA (50 ng) ของเชื้อรา *O. sobolifera* ปริมาตร 2 µl, 10x Taq buffer ปริมาตร 2.5 µl, 25 mM $MgCl_2$ ปริมาตร 2.5 µl, 2.5 mM dNTPs ปริมาตร 2.5 µl, 10mM random primer ปริมาตร 2 µl, sterile distill water ปริมาตร 13.25 µl และ 5U/µl *Taq* polymerase (Invitrogen, Australia) ปริมาตร 0.25 µl ทำการผสมสารดังกล่าวในปริมาตรรวม 25 µl นำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอภายใต้สภาวะที่กำหนด คือ ขั้นตอนที่ 1: อุณหภูมิ 94°C นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบ ขั้นตอนที่ 2: อุณหภูมิ 94°C นาน 1 นาที อุณหภูมิ 36°C นาน 1 นาที และอุณหภูมิ 72°C นาน 2 นาที จำนวน 40 รอบ และขั้นตอนที่ 3: อุณหภูมิ 72°C นาน 10 นาที จำนวน 1 รอบ ด้วยเครื่อง Thermal cycler (Veriti 96-well Thermal cycler, Applied Biosystems, USA) ทำการตรวจสอบขนาดแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันบนอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 1% จากนั้นคัดเลือกไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเออยู่ในช่วง 5-15 แถบ เพื่อไปใช้ในการทดสอบต่อไป

จากนั้นนำไพรเมอร์ที่คัดเลือกได้ไปทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อรา *O. sobolifera* ทั้งในกลุ่มที่ active และ non-active รวมทั้งเชื้อราอื่นๆ ที่แยกได้จากตัวอ่อนจักจั่นด้วยวิธี RAPD-PCR แล้วทำการวิเคราะห์รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น และคัดเลือกเฉพาะไพรเมอร์ที่สามารถให้แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะและพบเฉพาะในกลุ่มเชื้อรา *O. sobolifera* เท่านั้น มาทำการศึกษาในขั้นต่อไป

3.6.2 การสกัดดีเอ็นเอออกจากเจล

นำ PCR product จากขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD ในข้อ 3.6.1 มาแยกขนาดบนเจลอะกาโรส 0.8% agarose gel หลังจากนั้นนำเจลไปย้อมด้วยสีย้อม novel juice® (GeneDirex, USA) แล้วนำไปตัดภายใต้แสง UV โดยใช้ใบมีดตัดเจลในบริเวณแถบดีเอ็นเอที่ต้องการใส่ในหลอด microcentrifuge เพื่อแยกสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลโดยใช้ชุดสกัด Gel/PCR Fragment Extraction kit (Geneaid Biotech Ltd. , Taiwan) เติม DF buffer 500 µl นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm ประมาณ 1 นาที หลอมเจลใน water bath อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ใส่ DF column ลงใน DF tube เทเจลที่หลอมเสร็จแล้วลงใน DF column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm 30 วินาที เทส่วนล่างใน DF tube ทิ้งไป (ส่วนของดีเอ็นเอจะติดอยู่บนแผ่นเมมเบรนใน DF column) ใช้ DF tube ใหม่กับ DF column เดิม เติม washing buffer 500 µl ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm 30 วินาที เทน้ำออกนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm 2 นาที ย้าย DF column มาใส่ในหลอด microcentrifuge ใหม่ (ทิ้ง DF tube) เติม elution buffer 25 µl ตั้งทิ้งไว้ 2 นาที ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm 2 นาที ทิ้ง DF column แล้วเก็บส่วนของดีเอ็นเอที่อยู่ในหลอด microcentrifuge ไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ –20°C เพื่อนำมาทำการโคลนยีนหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในการออกแบบเครื่องหมาย RAPD-SCAR ในขั้นตอนต่อไป

3.6.3 การโคลนยีนเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในการใช้ออกแบบเครื่องหมาย RAPD-SCAR

นำแถบดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 3.6.2 มาทำการโคลนยีนเข้าสู่เวคเตอร์โดยใช้ pGEM-T Easy® (Promega, USA) ตามวิธีการที่บริษัทแนะนำ ด้วยการเชื่อมต่อ (ligation) ชิ้นดีเอ็นเอเข้ากับพาหะ (vector) คือ pGEM® - T easy vector ที่มีส่วนผสมของปฏิกิริยาดังนี้

T4 DNA ligation 2x buffer	5 µl
pGEM® - T easy vector (50 ng)	1 µl
PCR product	3 µl
T4 DNA ligation (3 weiss unit/µl)	1 µl

ผสมส่วนผสมให้เข้ากันแล้วแช่ในตู้เย็นอย่างน้อย 18 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำดีเอ็นเอสายผสม (recombinant DNA) เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านด้วยการทำการทรานฟอร์ม (transform) เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* JM109 ที่อยู่ในสภาพพร้อมรับดีเอ็นเอจากภายนอกเข้าสู่เซลล์ (competent cell) ด้วยวิธี TSS method (Chung, Niemela, & Miller, 1989) จากนั้นทำการ heat shock เพื่อกระตุ้นให้ พลาสมิดสายผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านโดยมีรายละเอียดดังนี้ เติม Ligation reaction ปริมาตร 10 µl และเติมเซลล์คอมพีเทนต์ (*E. coli* JM109) ปริมาตร 90 µl (อัตราส่วน 1:10) ลงในหลอด microcentrifuge แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 45 นาที ทำ heat shook โดยแช่ใน water bath ที่อุณหภูมิ 42°C นาน 45 วินาที แล้ววางบนน้ำแข็งอย่างน้อย 30 นาที เติมอาหาร LB (ซึ่งเตรียมได้จาก LB 25

มิลลิลิตร ผสมกับ 1 M glucose 2 มิลลิลิตร) ปริมาตร 900 µl นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 rpm นาน 1-2 ชั่วโมง แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลานาน 1.30 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วนำไป spread plate บนอาหารคัดเลือก chromogenic agar โดยแบ่งเป็น control plate (อาหารที่ไม่เติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน) และ ampicillin plate (อาหารที่เติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C นาน 15-20 ชั่วโมง หรือนานข้ามคืน ทำการคัดเลือก recombinant clone ด้วยวิธี blue-white selection ใช้ไม้จิ้มฟันแตะโคโลนีสีขาว (white colony) จากจานอาหารที่มีเติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ที่แบ่งเป็นตารางไว้ (1 โคโลนี : 1 ช่อง) และทิ้งไม้จิ้มฟันลงในอาหาร LB ที่เติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินที่เตรียมไว้ นำเชื้อไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37°C นานข้ามคืน จากนั้นนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตะเชื้อไว้ในตู้เย็น และนำเชื้อในอาหาร LB ที่เติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ไปตรวจหาพลาสมิดลูกผสม (recombinant plasmid) ด้วยวิธี alkaline lysis ตามวิธีการของ Sambrook et al (1989) ด้วยการเทเชื้อจากอาหารเหลวใส่หลอด microcentrifuge ปริมาตร 500 µl นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 prm นาน 5 นาที เทส่วนใสทิ้งเพื่อเก็บตะกอน เติม STE buffer ปริมาตร 500 µl ผสมให้ตะกอนละลาย นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm นาน 5นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม solution I ปริมาตร 100 µl ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex ตั้งทิ้งไว้ นาน 10 นาที เติม solution II ปริมาตร 200 µl (เตรียมใหม่ทุกครั้ง) พลิกหลอดไปมา 20 ครั้ง แช่ในน้ำแข็งนาน 10 นาที เติม solution III ปริมาตร 150 µl พลิกหลอดไปมา 20 ครั้ง แช่ในน้ำแข็ง 5-10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm นาน 5 นาที เทสารละลายใส่หลอดใหม่ เติม 3M NaOAc (sodium acetate) ปริมาตร 1/10 volume และ 95% EtOH (absolute alcohol) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร พลิกหลอดไปมา 20 ครั้ง นำไปแช่ในตู้เย็นอุณหภูมิ -20°C นาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm นาน 20 นาที เทส่วนใสทิ้งและปล่อยให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งจึงเติม TE buffer ปริมาตร 20-25 µl เพื่อละลายตะกอน หลังจากนั้นนำไปตรวจสอบบน 1% agarose gel electrophoresis

ทำการวิเคราะห์ขนาดของ insert DNA ใน recombinant plasmid โดยการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ชนิด EcoR I ที่มีส่วนผสมของปฏิกิริยาดังนี้

Plasmid	5.0 µl
10x buffer	2.0 µl
RNase A (10 mg/ml)	0.25 µl
1x BSA	1.0 µl
EcoR I (10 unit/ µl)	0.5 µl
H_2O	11.25 µl

ผสมส่วนผสมให้เข้ากันปริมาตรรวม 20 µl แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 1-2 ชั่วโมง

นำไปแยกขนาดบนเจลอะกาโรส 0.8% agarose gel electrophoresis เพื่อตรวจสอบขนาดของพลาสมิดลูกผสม

ทำการคัดเลือกโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการเพื่อนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้บริการจากหน่วยบริการบริษัท Word medic ประเทศสาธารณรัฐสิงคโปร์ และเมื่อได้ลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วจึงนำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Bioedit version 7.1.9 และ ClustalW นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาทำการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อรา *O. sobolifera* โดยใช้โปรแกรม PCR primer design tool ของ Eurofins genomics (free software) (http://www.eurofinsgenomics.eu/en/ecom/tools/pcr-primer-design/) จะได้ไพรเมอร์ RAPD-SCAR primer ที่เรียกว่า “*O. sobolifera* RAPD-SCAR primer” เพื่อนำไปใช้ในการระบุชนิดของเชื้อรา *O. sobolifera* ในขั้นตอนต่อไป

3.7 การทดสอบความจำเพาะของเครื่องหมายโมเลกุล RAPD-SCAR (specificity of primer)

นำไพรเมอร์ที่ทำการออกแบบได้ ที่เรียกว่า “*O. sobolifera* RAPD-SCAR primer” มาทำการทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของไพรเมอร์ *O. sobolifera* RAPD-SCAR primer โดยทำการศึกษาประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อรา *O. sobolifera* เท่านั้นเทียบกับเชื้อรา *Ophiocordyceps* sp. ชนิดอื่นที่พบเจริญบนโฮสต์ตัวอ่อนจักจั่นด้วยการทำปฏิกิริยา PCR ซึ่งมีส่วนผสมดังนี้ genomic DNA (50 ng) ปริมาตร 2 µl, 10x Taq buffer ปริมาตร 2.5 µl, 25 mM $MgCl_2$ ปริมาตร 2.5 µl, 2.5 mM dNTPs ปริมาตร 2.5 µl, 10 mM forward primer ปริมาตร 1 µl, 10 mM reverse primer ปริมาตร 1 µl, sterile distill water ปริมาตร 13.25 µl และ 5U/µl *Taq* polymerase (Invitrogen, Australia) ปริมาตร 0.25 µl ผสมสารดังกล่าวในปริมาตรรวม 25 µl จากนั้นทำปฏิกิริยาภายใต้สภาวะ คือ ขั้นตอนที่ 1: อุณหภูมิ 95°C นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบ ขั้นตอนที่ 2: อุณหภูมิ 95°C นาน 1 นาที อุณหภูมิ 50°C นาน 1 นาที และอุณหภูมิ 72°C นาน 2 นาที จำนวน 35 รอบ และขั้นตอนที่ 3: อุณหภูมิ 72°C นาน 10 นาที จำนวน 1 รอบ ด้วยเครื่อง Thermal cycler (Veriti 96-well Thermal cycler, Applied Biosystems, USA) และทำการตรวจสอบขนาดแถบดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 1%

3.8 การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่องหมายโมเลกุล RAPD-SCAR (validation of primer)

ทำการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ *O. sobolifera* RAPD-SCAR primer ที่ถูกออกแบบขึ้นเพื่อใช้ในการระบุชนิดของเชื้อรา *O. sobolifera* โดยทำการปรับ

สภาวะอุณหภูมิ annealing ปริมาณไพรเมอร์ และปริมาณความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ มีวิธีการดังนี้

3.8.1 การหาสภาวะช่วงอุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสม

นำ *O. sobolifera* RAPD-SCAR primer ที่ออกแบบได้ทั้งหมดมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปรับสภาวะที่เหมาะสมของช่วงอุณหภูมิ annealing โดยปรับช่วงอุณหภูมิ annealing ที่ 3 ระดับ ได้แก่ 48 50 และ 52°C ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Thermal cycler (Veriti 96-well Thermal cycler, Applied Biosystems, USA) และทำการตรวจสอบขนาดแถบดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 1%

3.8.2 การหาปริมาณไพรเมอร์ที่เหมาะสม

นำไพรเมอร์ *O. sobolifera* RAPD-SCAR primer จากข้อ 3.8.1 ที่สามารถเพิ่มจำนวนแถบแบนดีเอ็นเอของเชื้อ *O. sobolifera* ในช่วงอุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสม นำมาทำการปรับปริมาณความเข้มข้นของไพรเมอร์ให้มีความเหมาะสมที่ระดับความเข้มข้น 10 mM และ 20 mM ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Thermal cycler (Veriti 96-well Thermal cycler, Applied Biosystems, USA) และทำการตรวจสอบขนาดแถบดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 1%

3.8.3 การหาปริมาณความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ที่เหมาะสม

นำไพรเมอร์ที่ออกแบบที่สามารถเพิ่มจำนวนแถบแบนดีเอ็นเอของเชื้อ *O. sobolifera* ในช่วงอุณหภูมิ annealing และปริมาณไพรเมอร์ที่เหมาะสม นำมาทำการปรับปริมาณความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ได้แก่ 1 mM 2 mM 2.5 mM และ 3 mM $MgCl_2$ ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยเครื่อง Thermal cycler (Veriti 96-well Thermal cycler, Applied Biosystems, USA) และทำการตรวจสอบขนาดแถบดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 1%

3.9 การทดสอบความไวของเครื่องหมายโมเลกุล RAPD-SCAR (sensitivity of primer)

การทดสอบความไว (sensitivity) ของ *O. sobolifera* RAPD-SCAR primer จะทำการเจือจางความเข้มข้นของปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อรา *O. sobolifera* ไอโซเลท Cod-KK1519 ตั้งแต่ระดับ 5 µg ถึง 5 fg จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR เพื่อตรวจหาปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดของดีเอ็นเอที่ไพรเมอร์สามารถเพิ่มจำนวนได้ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.8 ด้วยเครื่อง Thermal cycler (Veriti 96-well Thermal cycler, Applied Biosystems, USA) และทำการตรวจสอบขนาดแถบดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 1%

3.10 การนำเครื่องหมายโมเลกุล RAPD-SCAR ไปใช้ในการระบุชนิดของเชื้อรา *O. sobolifera*

นำ *O. sobolifera* RAPD-SCAR primer ที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อรา *O. sobolifera* ที่จัดเป็นกลุ่มที่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ดีที่สุด (active isolateX จำนวน 16 ไอโซเลท และกลุ่มที่ไม่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (non-active isolate) จำนวน 4 ไอโซเลท เทียบกับเชื้อราเข้าทำลายแมลงชนิดอื่นที่พบบนตัวอ่อนของจักจั่นที่คัดแยกได้ในห้องปฏิบัติการ จำนวน 4 ไอโซเลท ได้แก่ *Simplicilium* sp. (ไอโซเลท Cod-MK1311) *Polycephalomyces nipponicus* (ไอโซเลท Cod-MK1319) *Ophiocordyceps longissima* (ไอโซเลท Cod-Loei1301) และ *Metacordyceps chalamydosporia* (ไอโซเลท Cod-NN1302) ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมด้วยเครื่อง Thermal cycler (Veriti 96-well Thermal cycler, Applied Biosystems, USA) และทำการตรวจสอบขนาดแถบดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 1%

3.11 การวิเคราะห์ข้อมูล

ทำการวิเคราะห์ข้อมูลในรูปแบบของจำนวนร้อยละและค่าเฉลี่ย เปรียบเทียบและระบุชนิดของดีเอ็นเอด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ผลสำเร็จรูป เช่น โปรแกรม ExPASy (https://www.expasy.org/) BLAST analysis (www.ncbi.nih.gov/blast) โปรแกรม BioEdit version 7.1.9 (http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html) โปรแกรม ClustalW (http://www.clustal.org/) โปรแกรม Molecular evolutionary genetic analysis version 6 (MEGA 6) และโปรแกรมสำหรับออกแบบ PCR primer design tool (free software) (http://www.eurofinsgenomics.eu/en/ecom/tools/pcr-primer-design/)

พหุน ปณ ฑิโต ชีเว

บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 การแยกเชื้อราและระบุชนิดเชื้อรา *O. sobolifera* จากตัวอย่างจักจั่น

นำตัวอย่างตัวอ่อนจักจั่นที่ถูกเชื้อราแมลงเข้าทำลายจำนวนทั้งหมด 44 ตัวอย่างที่เก็บมาจากพื้นที่จังหวัดขอนแก่น (KK isolate) มาทำการแยกเชื้อและระบุชนิดของเชื้อราแมลงด้วยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนยีน ITS พบว่า มีจำนวนตัวอย่างที่สามารถแยกเชื้อราแมลงได้จำนวน 44 ไอโซเลท ดังข้อมูลแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงรหัสไอโซเลทและจำนวนเชื้อราที่คัดแยกได้จากพื้นที่จังหวัดขอนแก่น

พื้นที่ศึกษา	ปีที่เก็บ	จำนวนไอโซเลท	รหัส
ขอนแก่น (KK isolate) (16° 29´ 2.784´´ N´ 102° 49´ 55.206´´ E´)	2015	44	Cod-KK1501 Cod-KK1502 Cod-KK1503 Cod-KK1504 Cod-KK1505 Cod-KK1506 Cod-KK1507 Cod-KK1508 Cod-KK1509 Cod-KK1510 Cod-KK1511 Cod-KK1512 Cod-KK1513 Cod-KK1514 Cod-KK1515 Cod-KK1517 Cod-KK1518 Cod-KK1519 Cod-KK1520 Cod-KK1521 Cod-KK1522 Cod-KK1523 Cod-KK1524 Cod-KK1525 Cod-KK1526 Cod-KK1527 Cod-KK1528 Cod-KK1530 Cod-KK1531 Cod-KK1532 Cod-KK1533 Cod-KK1535 Cod-KK1536 Cod-KK1537 Cod-KK1538 Cod-KK1539 Cod-KK1540 Cod-KK1541 Cod-KK1542 Cod-KK1543 Cod-KK1545 Cod-KK1546 Cod-KK1547 และ Cod-KK1548

และเมื่อนำตัวอย่างเชื้อราทั้ง 44 ไอโซเลท มาระบุชนิดด้วยยีน ITS พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อราได้ทุกไอโซเลท แต่เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างเชื้อราที่คัดแยกได้ไปเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีนส่วน ITS ของเชื้อราชนิด *O. sobolifera* ที่มีรายงานมาก่อนในฐานข้อมูล

GenBank ด้วยโปรแกรม Blast search พบว่า มีตัวอย่างเชื้อราที่แยกได้จากตัวอ่อนจักจั่น จำนวน 42 ไอโซเลท มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อรา *O. sobolifera* ไอโซเลท Cod-NB1302 (KT281884.1) ที่เคยมีการรายงานมาก่อน โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนอยู่ในช่วง 90-99 ดังนั้นทั้ง 42 ไอโซเลท จึงถูกระบุชนิดเป็นเชื้อรา *O. sobolifera* และมีจำนวน 2 ไอโซเลท ถูกระบุชนิดเป็นเชื้อราชนิดอื่นที่ไม่ใช่เชื้อรา *O. sobolifera* ประกอบด้วย (1) ไอโซเลท Cod-KK1533 มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับเชื้อรา *Beauveria* sp. ATT050 (HQ607818.1) (เปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 100) ซึ่งเชื้อราดังกล่าวถือเป็นระยะ anamorph ของเชื้อราในสกุล *Ophiocordyceps* sp. และ (2) ไอโซเลท Cod-KK1545 ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับเชื้อรา *Simplicillium obclavatum* strain SO2 (KC403970.1) (เปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 92) ดังข้อมูลแสดงในภาพที่ 9

ภาพที่ 9 สายสัมพันธ์วิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ของเชื้อราที่แยกได้จากตัวอ่อนจักจั่น โดยเปรียบเทียบลำดับเบสในส่วนยีน ITS วิเคราะห์ผลโดยใช้โปรแกรม MEGA6 ใช้วิธีการ Neighbor-Joining (NJ) ตามรูปแบบ Kimura 2-parameter ด้วยการทำ bootstrap จำนวน 1,000 ครั้ง (replications)

4.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *O. sobolifera*

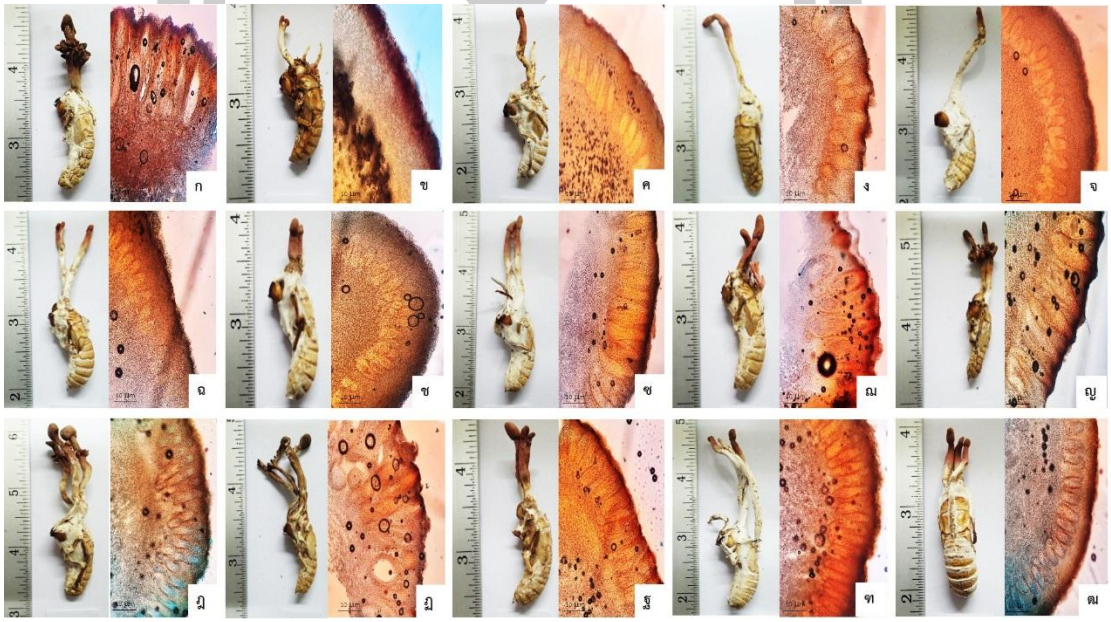
4.2.1 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *O. sobolifera*

เมื่อทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตัวอย่างเชื้อราจำนวน 42 ไอโซเลท ที่ถูกระบุชนิดเป็นเชื้อรา *O. sobolifera* โดยการสังเกตลักษณะของสโตรมาที่งอกพ้นตัวโฮสต์ พบว่า ตัวอ่อนจักจั่นถูกปกคลุมด้วยเส้นใยเชื้อราสีขาวทั่วโครงสร้างของตัวอ่อนจักจั่นมีการงอกของส่วนสโตรมาโผล่พ้นตัวอ่อนจักจั่น สโตรมามีรูปร่างทรงกระบองยาว (cylindric) ส่วนปลายพองออกเป็นกระเปาะรูปร่างค่อนข้างกลม (subglobose) มีขนาดใหญ่กว่าส่วนก้าน ซึ่งเป็นบริเวณเพอริทิเซีย เรียกส่วนบริเวณปลายสุดของสโตรมาที่พองออกเป็นกระเปาะว่า fertile head หรือ fertile part โดยพบส่วนสโตรมางอกออกมาจากส่วนหัวของโฮสต์ส่วนใหญ่พบเพียง 1 อัน และอาจพบเฉลี่ย 2-3 อันต่อหนึ่งตัวอย่างโฮสต์ ความยาวเฉลี่ย 3-8 เซนติเมตร มีสีน้ำตาลอมชมพู ลักษณะผิวสัมผัสของสโตรมาจะมีผิวสัมผัสที่ขรุขระคล้ายเม็ดทรายละเอียด และพบเส้นใยของเชื้อรามีสีขาวเจริญปกคลุมทั่วตัวอ่อนของจักจั่น (ภาพที่ 10)

ภาพที่ 10 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกของเชื้อรา *O. sobolifera*
(ก) ไอโซเลท Cod-KK1505 (พบ 1 สโตรมา) (ข) ไอโซเลท Cod-KK1501 (พบ 2 สโตรมา) และ (ค) ไอโซเลท Cod-KK1528 (พบ 3 สโตรมา)

เมื่อเปรียบเทียบลักษณะส่วนสโตรมาที่พบในตัวอย่างเชื้อรา สามารถแบ่งได้เป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 พบสโตรมาเจริญโผล่พ้นส่วนหัวของโฮสต์จำนวน 1 อัน จำนวน 8 ตัวอย่าง (Cod- KK1505 Cod- KK1515 Cod- KK1518 Cod- KK1525 Cod- KK1535 Cod- KK1536 Cod-KK1537และ Cod-KK1546) กลุ่มที่ 2 พบสโตรมาเจริญโผล่พ้นส่วนหัวของโฮสต์จำนวน 2 อัน จำนวน 22 ตัวอย่าง (Cod-KK1501 Cod-KK1502 Cod-KK1503 Cod-KK1506 Cod-KK1507

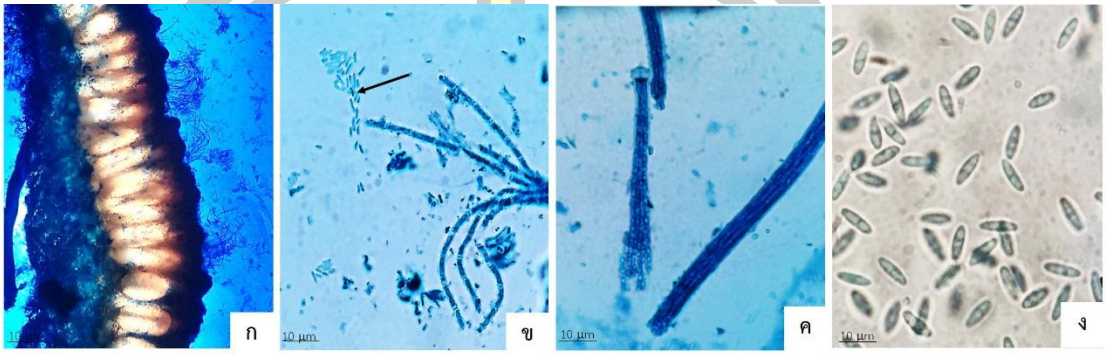
Cod- KK1508 Cod- KK1513 Cod- KK1517 Cod- KK1519 Cod- KK1520 Cod- KK1522 Cod- KK1523 Cod- KK1526 Cod- KK1527 Cod- KK1530 Cod- KK1531 Cod- KK1539 Cod-KK1541 Cod-KK1542 Cod-KK1543 Cod-KK1547 และ Cod-KK1548) กลุ่มที่ 3 พบสโตรมาเจริญโผล่พ้นส่วนหัวของโฮสต์จำนวน 3 อัน จำนวน 11 ตัวอย่าง (Cod-KK1504 Cod-KK1509 Cod- KK1510 Cod- KK1511 Cod- KK1512 Cod- KK1514 Cod- KK1521 Cod- KK1524 Cod-KK1528 Cod-KK1538 และ Cod-KK1540) (ภาพที่ 11) และกลุ่มที่ 4 ไม่พบสโตรมาเจริญโผล่พ้นส่วนหัวของโฮสต์ จำนวน 1 ตัวอย่าง (Cod-KK1532) โดยลักษณะส่วนสโตรมาที่พบในแต่ละกลุ่มจะมีจำนวน และขนาดไม่เหมือนกัน ซึ่งลักษณะภายนอกของส่วนสโตรมาที่มีความแปรผันแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อรา บริเวณที่พบตัวอย่าง สภาพแวดล้อม และความสมบูรณ์ของโฮสต์



ภาพที่ 11 ลักษณะความแปรผันของโครงสร้างส่วนสโตรมาที่พบในเชื้อรา *O. sobolifera* (ก-จ) กลุ่มสโตรมา 1 อัน (ฉ-ญ) กลุ่มสโตรมา 2 อัน และ (ฏ-ฒ) กลุ่มสโตรมา 3 อัน

เมื่อศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาภายในของเชื้อราโดยการตัดตามขวางโครงสร้างส่วนของสโตรมาและนำมาศึกษาภายใต้กล้องสเตอริโอและกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง พบลักษณะของเพอริทีเชียมีรูปร่างคล้ายรูปคนโทหรือรูปไข่หรือคล้ายหยดน้ำ ฝังตัวอยู่ภายในสโตรมาทั้งหมด บริเวณด้านบนของเพอริทีเชียมีช่องเปิดสำหรับปล่อยสปอร์เรียกว่า ostioles (ภาพที่ 12 ก) ภายในพบถุงหุ้มสปอร์เป็นถุงรูปร่างทรงกระบอกยาว ใสไม่มีสี มีผนังชั้นเดียว ภายในมีแอสโคสปอร์จำนวนมากบรรจุอยู่ เรียงตัวขนานตามความยาว และพบการหักออกของแอสโคสปอร์เป็นท่อนสั้นๆ เซลล์เดี่ยวเรียก part-spore (ภาพที่ 12 ข) บริเวณส่วนปลายของถุงหุ้มสปอร์ พบบริเวณรูเปิดมีรูปร่างเกือบ

กลมคล้ายหมวกปิดอยู่ ผนังหนา ใสไม่มีสี ซึ่งเป็นรูให้เกิดการปล่อยสปอร์ของเชื้อรา (ภาพที่ 12 ค) และเมื่อนำเส้นใยเชื้อราที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ชนิด PDA มาตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง พบว่าเส้นใยเป็นแบบมีผนังกั้นและพบโครงสร้างโคนิเดียมีรูปร่างรี และมีผนังกั้นแบบตามขวาง ขนาดประมาณ 1.5-2 x 2-4 ไมโครเมตร (ภาพที่ 12 ง)



ภาพที่ 12 ลักษณะของเชื้อรา *O. sobolifera* ไอโซเลท Cod-KK1528
(ก) เพอริทีเชีย (ข) part-spore (บริเวณลูกศรชี้) (ค) แอสคัส และ (ง) โคนิเดีย

4.2.2 การเพาะเลี้ยงเส้นใยเชื้อรา *O. sobolifera* บนอาหารสูตรสังเคราะห์

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเส้นใยเชื้อรา *O. sobolifera* ทั้งหมด 43 ไอโซเลท ประกอบด้วยไอโซเลทที่แยกได้จากพื้นที่จังหวัดขอนแก่น (KK isolate) จำนวน 42 ไอโซเลท และไอโซเลทที่นำมาใช้เป็นสายพันธุ์อ้างอิงในการศึกษาจำนวน 1 ไอโซเลท คือ *O. sobolifera* ไอโซเลท Cod-NB1302 ที่แยกได้จากจังหวัดหนองบัวลำภู จำนวน 1 ไอโซเลท มาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตรต่างๆ 7 ชนิดในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ potato dextrose agar (PDA) sabouraud dextrose agar (SDA) malt extract agar (MEA) yeast malt agar (YMA) Czapek Dox agar (CDA) oat meal agar (OMA) และ homogenized died cricket glucose agar (HCGA) เพื่อทำการศึกษาลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *O. sobolifera* เป็นเวลา 20 วัน พบว่า เชื้อรา *O. sobolifera* ที่คัดแยกได้สามารถเจริญบนอาหารสูตรสังเคราะห์ทั้ง 7 สูตรได้แตกต่างกัน ซึ่งลักษณะโคโลนีของเชื้อราที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถแบ่งได้เป็น 4 กลุ่มคือ (1) โคโลนีสีชมพู อัดแน่นคล้ายกำมะหยี่ และพบการสร้าง spore mass สีน้ำตาลบริเวณกึ่งกลางโคโลนี (2) โคโลนีมีสีชมพู ฟู กระจาย และไม่พบการสร้าง spore mass (3) โคโลนีสีขาว ฟู หนาแน่นและกระจาย และไม่พบการสร้าง spore mass และ (4) โคโลนีสีขาว ฟู บางและไม่กระจาย และไม่พบการสร้าง spore mass โดยในอาหารเลี้ยงเชื้อส่วนใหญ่ให้ลักษณะโคโลนีกลุ่มที่ 1-3 ยกเว้นอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Czapek Dox agar (CDA) ที่พบเฉพาะลักษณะโคโลนีในกลุ่มที่ 3 และ 4 เท่านั้น

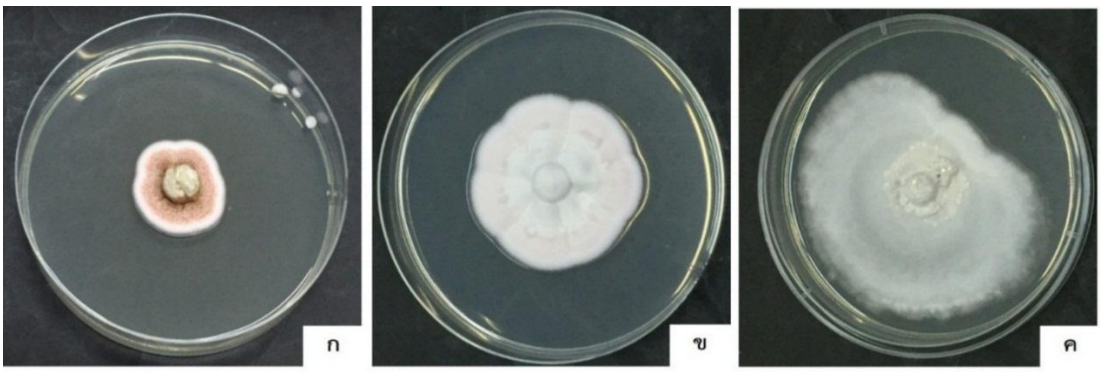
เมื่อเทียบการเจริญของเส้นใยเชื้อราทั้ง 43 ไอโซเลท บนอาหารทั้ง 7 สูตร พบว่า ในภาพรวมเส้นใยของเชื้อรา *O. sobolifera* ส่วนใหญ่สามารถเจริญได้ดีที่สุดบนอาหารสูตร HCGA (ความกว้างของโคโลนีเฉลี่ย 6.5 x 7.0 เซนติเมตร) รองลงมาคือ อาหารสูตร MEA (ความกว้างของโคโลนีเฉลี่ย 5.0 x 6.8 เซนติเมตร) อาหารสูตร OMA (ความกว้างของโคโลนีเฉลี่ย 4.8 x 5.5 เซนติเมตร) อาหารสูตร YMA (ความกว้างของโคลโลนีเฉลี่ย 3.5 x 4.2 เซนติเมตร) อาหารสูตร PDA (ความกว้างของโคโลนีเฉลี่ย 3.8 x 4.0 เซนติเมตร) และอาหารสูตร SDA (ความกว้างของโคโลนีเฉลี่ย 1.8 x 2.0 เซนติเมตร) ตามลำดับ ในขณะที่อาหารสูตร CZA ไม่พบการเจริญของเส้นใยโคโลนีเชื้อรา โดยลักษณะการเจริญของโคโลนีเชื้อราบนอาหารสังเคราะห์สูตรต่างๆ ให้ผล ดังนี้

1) อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (PDA)

เมื่อนำเชื้อรา *O. sobolifera* ทั้ง 43 ไอโซเลท มาเลี้ยงบนอาหาร PDA พบว่า สามารถแบ่งลักษณะโคโลนีของเชื้อได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม (1) โคโลนีสีชมพู เส้นใยอัดแน่นคล้ายกำมะหยี่ พบการสร้าง spore mass สีน้ำตาลบริเวณกลางโคโลนี จำนวน 5 ไอโซเลท กลุ่ม (2) โคโลนีสีชมพู เส้นใยฟู กระจาย ไม่พบการสร้าง spore mass จำนวน 9 ไอโซเลท และกลุ่ม (3) โคโลนีสีขาว เส้นใยฟู หนาแน่นและกระจาย ไม่พบการสร้าง spore mass จำนวน 29 ไอโซเลท (ตารางที่ 3 และภาพที่ 13)

ตารางที่ 3 การจัดกลุ่มลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Potato dextrose agar (PDA)

กลุ่ม	จำนวน	รหัสไอโซเลท
1	5	Cod-KK1501 Cod-KK1512 Cod-KK1523 Cod-KK1524 และ Cod-KK1541
2	9	Cod-NB1302 Cod-KK1504 Cod-KK1505 Cod-KK1506 Cod-KK1513 Cod-KK1515 Cod-KK1519 Cod-KK1520 และ Cod-KK1547
3	29	Cod-KK1502 Cod-KK1503 Cod-KK1507 Cod-KK1508 Cod-KK1509 Cod-KK1510 Cod-KK1511 Cod-KK1514 Cod-KK1517 Cod-KK1518 Cod-KK1521 Cod-KK1522 Cod-KK1525 Cod-KK1526 Cod-KK1527 Cod-KK1528 Cod-KK1530 Cod-KK1531 Cod-KK1532 Cod-KK1535 Cod-KK1536 Cod-KK1537 Cod-KK1538 Cod-KK1539 Cod-KK1540 Cod-KK1542 Cod-KK1543 Cod-KK1546 และ Cod-KK1548



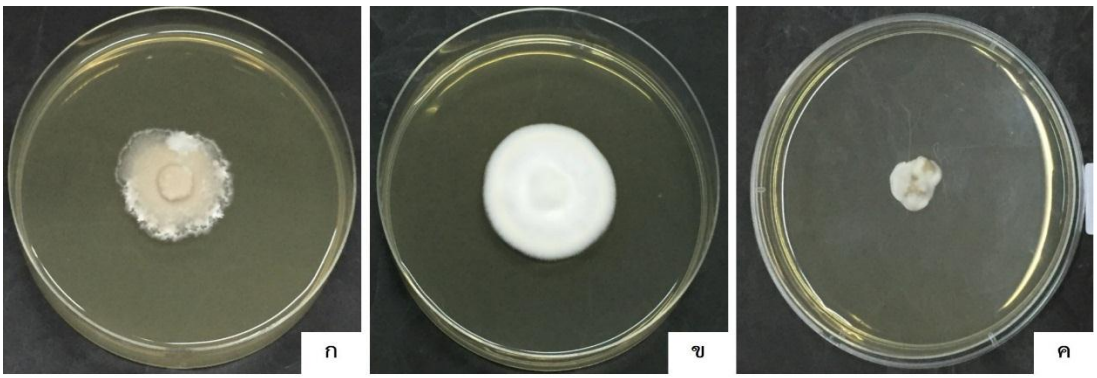
ภาพที่ 13 ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *O. sobolifera* เมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร PDA เป็นเวลา 20 วัน (ก) กลุ่ม 1 (Cod-KK1501) (ข) กลุ่ม 2 (Cod-KK1506) และ (ค) กลุ่ม 3 (Cod-KK1502)

2) อาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud dextrose agar (SDA)

เมื่อนำเชื้อรา *O. sobolifera* ทั้ง 43 ไอโซเลท มาเลี้ยงบนอาหาร SDA พบว่า สามารถแบ่งลักษณะโคโลนีของเชื้อได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม (2) โคโลนีสีชมพู เส้นใยฟูกระจาย ไม่พบการสร้าง spore mass จำนวน 4 ไอโซเลท กลุ่ม (3) โคโลนีสีขาว เส้นใยฟู หนาแน่นและกระจาย ไม่พบการสร้าง spore mass จำนวน 27 ไอโซเลท และกลุ่ม (4) โคโลนีสีขาว เส้นใยบางและไม่กระจาย ไม่พบการสร้าง spore mass จำนวน 12 ไอโซเลท (ตารางที่ 4 และภาพที่ 14)

ตารางที่ 4 การจัดกลุ่มลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Sabouraud dextrose agar (SDA)

กลุ่ม	จำนวน	รหัสไอโซเลท
2	4	Cod-KK1503 Cod-KK1506 Cod-KK1523 และ Cod-KK1536
3	27	Cod-KK1504 Cod-KK1505 Cod-KK1507 Cod-KK1508 Cod-KK1509 Cod-KK1510 Cod-KK1515 Cod-KK1517 Cod-KK1519 Cod-KK1520 Cod-KK1521 Cod-KK1522 Cod-KK1526 Cod-KK1527 Cod-KK1528 Cod-KK1530 Cod-KK1532 Cod-KK1535 Cod-KK1537 Cod-KK1538 Cod-KK1539 Cod-KK1540 Cod-KK1541 Cod-KK1543 Cod-KK1546 Cod-KK1547 และ Cod-KK1548
4	12	Cod-NB1302 Cod-KK1501 Cod-KK1502 Cod-KK1511 Cod-KK1512 Cod-KK1513 Cod-KK1514 Cod-KK1518 Cod-KK1524 Cod-KK1525 Cod-KK1531 และ Cod-KK1542



ภาพที่ 14 ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *O. sobolifera* เมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร SDA เป็นเวลา 20 วัน (ก) กลุ่ม 2 (Cod-KK1536) (ข) กลุ่ม 3 (Cod-KK1508) และ (ค) กลุ่ม 4 (Cod-KK1501)

3) อาหารเลี้ยงเชื้อ Malt extract agar (MEA)

เมื่อนำเชื้อรา *O. sobolifera* ทั้ง 43 ไอโซเลท มาเลี้ยงบนอาหาร MEA พบว่า สามารถแบ่งลักษณะโคโลนีของเชื้อได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม (1) โคโลนีสีชมพู เส้นใยอัดแน่นคล้ายกำมะหยี่ พบการสร้าง spore mass สีน้ำตาลบริเวณกลางโคโลนี จำนวน 9 ไอโซเลท กลุ่ม (2) โคโลนีสีชมพู เส้นใยฟู กระจาย ไม่พบการสร้าง spore mass จำนวน 13 ไอโซเลท และ กลุ่ม (3) โคโลนีสีขาว เส้นใยฟู หนาแน่นและกระจาย ไม่พบการสร้าง spore mass จำนวน 21 ไอโซเลท (ตารางที่ 5 และภาพที่ 15)

ตารางที่ 5 การจัดกลุ่มลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Malt extract agar (MEA)

กลุ่ม	จำนวน	รหัสไอโซเลท
1	9	Cod-KK1501 Cod-KK1503 Cod-KK1512 Cod-KK1515 Cod-KK1519 Cod-KK1520 Cod-KK1524 Cod-KK1528 และ Cod-KK1541
2	13	Cod-KK1504 Cod-KK1505 Cod-KK1506 Cod-KK1507 Cod-KK1513 Cod-KK1523 Cod-KK1525 Cod-KK1527 Cod-KK1530 Cod-KK1532 Cod-KK1540 Cod-KK1543 และ Cod-KK1547
3	21	Cod-NB1302 Cod-KK1502 Cod-KK1508 Cod-KK1509 Cod-KK1510 Cod-KK1511 Cod-KK1514 Cod-KK1517 Cod-KK1518 Cod-KK1521 Cod-KK1522 Cod-KK1526 Cod-KK1531 Cod-KK1535 Cod-KK1536 Cod-KK1537 Cod-KK1538 Cod-KK1539 Cod-KK1542 Cod-KK1546 และ Cod-KK1548

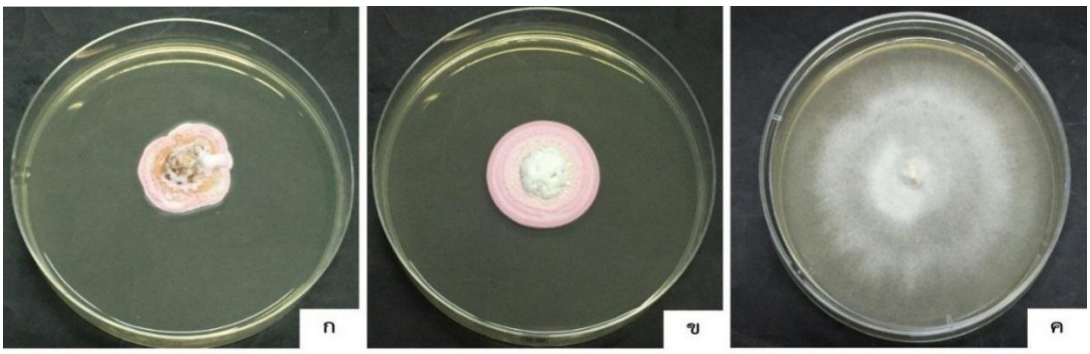
ภาพที่ 15 ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *O. sobolifera* เมื่อเลี้ยงบนอาหาร MEA เป็นเวลา 20 วัน (ก) กลุ่ม 1 (Cod-KK1536) (ข) กลุ่ม 2 (Cod-KK1540) และ (ค) กลุ่ม 3 (Cod-KK1502)

4) อาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast malt agar (YMA)

เมื่อนำเชื้อรา *O. sobolifera* ทั้ง 43 ไอโซเลท มาเลี้ยงบนอาหาร YMA พบว่า สามารถแบ่งลักษณะโคโลนีของเชื้อได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม (1) โคโลนีสีชมพู เส้นใยอัดแน่นคล้ายกำมะหยี่ พบการสร้าง spore mass สีน้ำตาลบริเวณกลางโคโลนี จำนวน 6 ไอโซเลท กลุ่ม (2) โคโลนีสีชมพู เส้นใยฟู ไม่พบการสร้าง spore mass จำนวน 13 ไอโซเลท และกลุ่ม (3) โคโลนีสีขาว เส้นใยฟู หนาแน่นและกระจาย ไม่พบการสร้าง spore mass จำนวน 24 ไอโซเลท (ตารางที่ 6 และภาพที่ 16)

ตารางที่ 6 การจัดกลุ่มลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Yeast malt agar (YMA)

กลุ่ม	จำนวน	รหัสไอโซเลท
1	6	Cod-KK1503 Cod-KK1505 Cod-KK1506 Cod-KK1507 Cod-KK1515 และ Cod-KK1517
2	13	Cod-KK1501 Cod-KK1504 Cod-KK1512 Cod-KK1519 Cod-KK1520 Cod-KK1523 Cod-KK1524 Cod-KK1525 Cod-KK1527 Cod-KK1528 Cod-KK1540 Cod-KK1541 และ Cod-KK1547
3	24	Cod-NB1302 Cod-KK1502 Cod-KK1508 Cod-KK1509 Cod-KK1510 Cod-KK1511 Cod-KK1513 Cod-KK1514 Cod-KK1518 Cod-KK1521 Cod-KK1522 Cod-KK1526 Cod-KK1530 Cod-KK1531 Cod-KK1532 Cod-KK1535 Cod-KK1536 Cod-KK1537 Cod-KK1538 Cod-KK1539 Cod-KK1542 Cod-KK1543 Cod-KK1546 และ Cod-KK1548



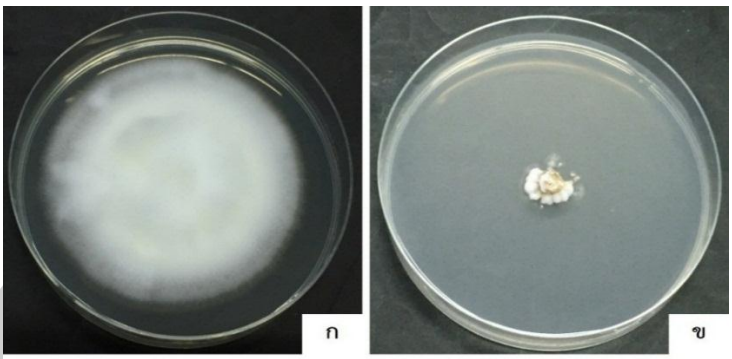
ภาพที่ 16 ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *O. sobolifera* เมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร YMA เป็นเวลา 20 วัน (ก) กลุ่ม 1 (Cod-KK1515) (ข) กลุ่ม 2 (Cod-KK1523) และ (ค) กลุ่ม 3 (Cod-KK1546)

5) อาหารเลี้ยงเชื้อ Czapek Dox agar (CDA)

เมื่อนำเชื้อรา *O. sobolifera* ทั้ง 43 ไอโซเลท มาเลี้ยงบนอาหาร CDA พบว่า สามารถแบ่งลักษณะโคโลนีของเชื้อได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม (3) โคโลนีสีขาว เส้นใยฟู หนาแน่นและกระจาย ไม่พบการสร้าง spore mass เจริญเร็ว จำนวน 41 ไอโซเลท และกลุ่ม (4) โคโลนีสีขาว เส้นใยฟู บางและไม่กระจาย ไม่พบการสร้าง spore mass เจริญช้า จำนวน 2 ไอโซเลท (ตารางที่ 7 และภาพที่ 17)

ตารางที่ 7 การจัดกลุ่มลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Czapek Dox agar (CDA)

กลุ่ม	จำนวน	รหัสไอโซเลท
3	41	Cod-NB1302 Cod-KK1501 Cod-KK1502 Cod-KK1503 Cod-KK1504 Cod-KK1505 Cod-KK1506 Cod-KK1507 Cod-KK1509 Cod-KK1510 Cod-KK1511 Cod-KK1512 Cod-KK1513 Cod-KK1514 Cod-KK1515 Cod-KK1517 Cod-KK1518 Cod-KK1519 Cod-KK1520 Cod-KK1521 Cod-KK1522 Cod-KK1523 Cod-KK1524 Cod-KK1525 Cod-KK1526 Cod-KK1527 Cod-KK1528 Cod-KK1530 Cod-KK1531 Cod-KK1532 Cod-KK1535 Cod-KK1536 Cod-KK1537 Cod-KK1538 Cod-KK1539 Cod-KK1540 Cod-KK1541 Cod-KK1543 Cod-KK1546 Cod-KK1547 และ Cod-KK1548
4	3	Cod-KK1508 และ Cod-KK1542



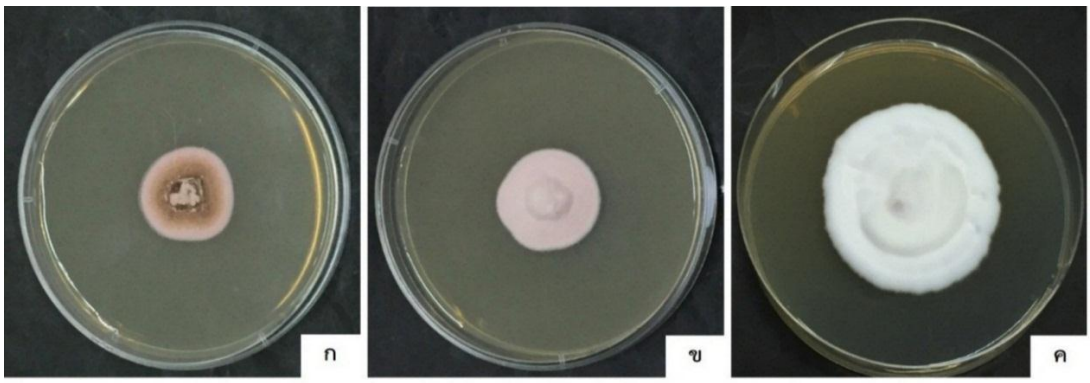
ภาพที่ 17 ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *O. sobolifera* เมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร CDA เป็นเวลา 20 วัน (ก) กลุ่ม 3 (Cod-KK1508) และ (ข) กลุ่ม 4 (Cod-KK1515)

6) อาหารเลี้ยงเชื้อ Oat meal agar (OMA)

เมื่อนำเชื้อรา *O. sobolifera* ทั้ง 43 ไอโซเลท มาเลี้ยงบนอาหาร OMA พบว่า สามารถแบ่งลักษณะโคโลนีของเชื้อได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม (1) โคโลนีสีชมพู เส้นอัดแน่นคล้ายกำมะหยี่ พบการสร้าง spore mass สีน้ำตาลบริเวณกลางโคโลนี พบจำนวน 13 ไอโซเลท กลุ่ม (2) โคโลนีสีชมพู เส้นใยฟู ไม่พบการสร้าง spore mass พบจำนวน 11 ไอโซเลท และ กลุ่ม (3) โคโลนีสีขาว เส้นใยฟูหนาแน่นและกระจาย ไม่พบการสร้าง spore mass พบจำนวน 19 ไอโซเลท (ตารางที่ 8 และภาพที่ 18)

ตารางที่ 8 การจัดกลุ่มลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Oat meal agar (OMA)

กลุ่ม	จำนวน	รหัสไอโซเลท
1	13	Cod-KK1501 Cod-KK1502 Cod-KK1503 Cod-KK1504 Cod-KK1512 Cod-KK1513 Cod-KK1514 Cod-KK1515 Cod-KK1519 Cod-KK1524 Cod-KK1525 Cod-KK1528 และ Cod-KK1541
2	11	Cod-KK1505 Cod-KK1506 Cod-KK1507 Cod-KK1517 Cod-KK1520 Cod-KK1523 Cod-KK1527 Cod-KK1531 Cod-KK1532 Cod-KK1543 และ Cod-KK1547
3	19	Cod-NB1302 Cod-KK1508 Cod-KK1509 Cod-KK1510 Cod-KK1511 Cod-KK1518 Cod-KK1521 Cod-KK1522 Cod-KK1526 Cod-KK1530 Cod-KK1535 Cod-KK1536 Cod-KK1537 Cod-KK1538 Cod-KK1539 Cod-KK1540 Cod-KK1542 Cod-KK1546 และ Cod-KK1548



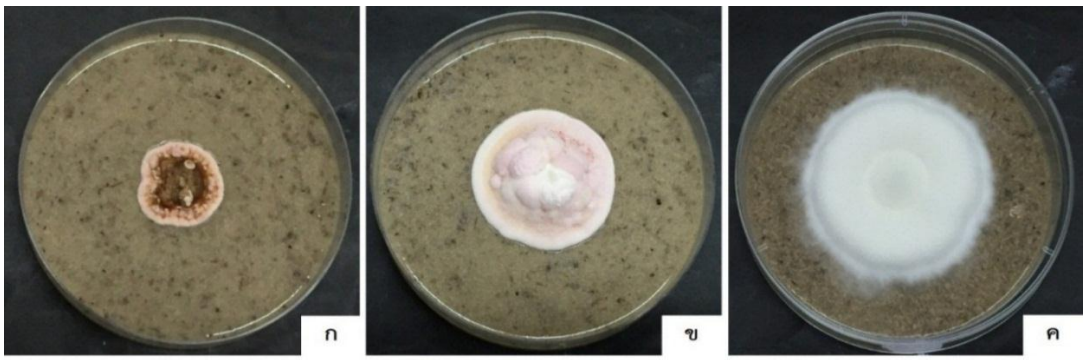
ภาพที่ 18 ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *O. sobolifera* เมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร OMA เป็นเวลา 20 วัน (ก) กลุ่ม 1 (Cod-KK1501) (ข) กลุ่ม 2 (Cod-KK1505) และ (ค) กลุ่ม 3 (Cod-KK1508)

7) อาหารเลี้ยงเชื้อ Homogenized died cricket glucose agar (HCGA)

เมื่อนำเชื้อรา *O. sobolifera* ทั้ง 43 ไอโซเลท มาเลี้ยงบนอาหาร HCGA พบว่า สามารถแบ่งลักษณะโคโลนีของเชื้อได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม (1) โคโลนีสีชมพู เส้นใยอัดแน่นคล้ายกำมะหยี่ พบการสร้าง spore mass สีน้ำตาลบริเวณกลางโคโลนี พบจำนวน 7 ไอโซเลท กลุ่ม (2) โคโลนีสีชมพู เส้นใยฟู ไม่พบการสร้าง spore mass จำนวน 17 ไอโซเลท และ กลุ่ม (3) โคโลนีสีขาว เส้นใยฟูหนาแน่นและกระจาย ไม่พบการสร้าง spore mass พบจำนวน 19 ไอโซเลท (ตารางที่ 9 และภาพที่ 19)

ตารางที่ 9 การจัดกลุ่มลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Homogenized died cricket glucose agar (HCGA)

กลุ่ม	จำนวน	รหัสไอโซเลท
1	7	Cod-KK1501 Cod-KK1507 Cod-KK1512 Cod-KK1515 Cod-KK1519 Cod-KK1524 และ Cod-KK1541
2	17	Cod-NB1302 Cod-KK1503 Cod-KK1504 Cod-KK1505 Cod-KK1506 Cod-KK1511 Cod-KK1517 Cod-KK1518 Cod-KK1520 Cod-KK1523 Cod-KK1525 Cod-KK1527 Cod-KK1528 Cod-KK1530 Cod-KK1532 Cod-KK1537 และ Cod-KK1547
3	19	Cod-KK1502 Cod-KK1508 Cod-KK1509 Cod-KK1510 Cod-KK1513 Cod-KK1514 Cod-KK1521 Cod-KK1522 Cod-KK1526 Cod-KK1531 Cod-KK1535 Cod-KK1536 Cod-KK1538 Cod-KK1539 Cod-KK1540 Cod-KK1542 Cod-KK1543 Cod-KK1546 และ Cod-KK1548



ภาพที่ 19 ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *O. sobolifera* เมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร HCGA เป็นเวลา 20 วัน (ก) กลุ่ม 1 (Cod-KK1501) (ข) กลุ่ม 2 (Cod-KK1506) และ (ค) กลุ่ม 3 (Cod-KK1509)

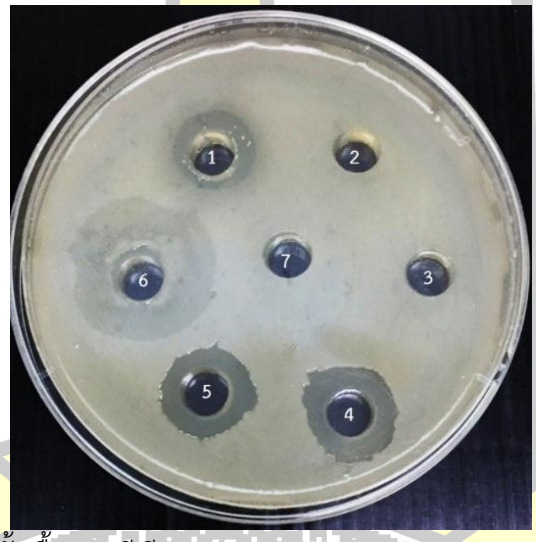
4.3 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากเชื้อรา *O. sobolifera*

4.3.1 ประสิทธิภาพเบื้องต้นในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคของสารสกัดเส้นใยเชื้อรา *O. sobolifera* ด้วยวิธี agar well diffusion

นำสารสกัดเส้นใยของเชื้อรา *O. sobolifera* ในแต่ละไอโซเลทมาทำการทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคสายพันธุ์มาตรฐาน และสายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากผู้ป่วย จำนวน 20 สายพันธุ์ พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของสารสกัดเส้นใยเชื้อรา *O. sobolifera* จำนวน 36 ไอโซเลท สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในเบื้องต้นได้ทั้งกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก (5 สายพันธุ์) และกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ (2 สายพันธุ์) ดังนี้ *B. cereus* ATCC11778 *S. aureus* MRSA DMST20651 *S. aureus* MRSA DMST20654 *S. aureus* MRSA DMST4783 *S. aureus* MSSA DMST2933 *V. choleae* (O1) DMST9700 และ *Sh. flexeri* DMST4423 โดยมีบริเวณยับยั้งตั้งแต่ 6.0±1.0 ถึง 19.6±2.0 มิลลิเมตร ซึ่งสารสกัดเส้นใยที่มีประสิทธิภาพยับยั้งเชื้อแบคทีเรียดีที่สุดคือ ไอโซเลท Cod-NB1302 รองลงมาคือ Cod-KK1505 Cod-KK1506 และ Cod-KK1524 ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแสดงให้เห็นว่าสารสกัดเส้นใยเชื้อรา *O. sobolifera* ส่วนใหญ่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแกรมลบ โดยเฉพาะในกลุ่มแบคทีเรีย *B. cereus* และ *S. aureus* ซึ่งสารสกัดสามารถยับยั้งได้ทั้ง *S. aureus* สายพันธุ์ที่ไวและดื้อต่อยาเมธิซิลิน เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมยาปฏิชีวนะ โดยเฉพาะยาปฏิชีวนะ ciprofloxacin ไม่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มดื้อยาได้ (ดังตารางที่ 10 และภาพที่ 20-21) อย่างไรก็ตามจากผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดในเบื้องต้นนี้เป็นที่น่าสนใจว่า เชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ทั้งสายพันธุ์ไวและดื้อต่อยา โดยเฉพาะสายพันธุ์ดื้อยาทั้งสามสายพันธุ์ (MRSA DMST20651 MRSA DMST20654 และ MRSA DMST4783) ยาปฏิชีวนะ ciprofloxacin ไม่สามารถยับยั้งเชื้อได้ แต่เชื้อดังกล่าวให้ผลไวกับสารสกัดเส้นใยเชื้อรา *O. sobolifera* ทำให้สารสกัด

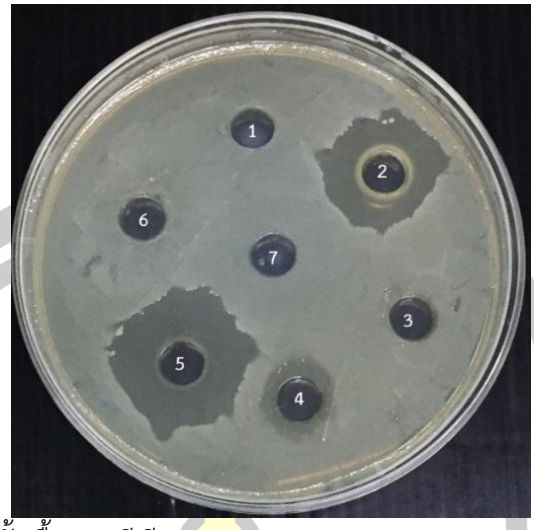
เส้นใยจากเชื้อราสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อดังกล่าวได้ดีกว่ายาปฏิชีวนะ ciprofloxacin ที่นำมาใช้ในการทดสอบ

และเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบขนาดของบริเวณยับยั้งของสารสกัดที่มีขนาดมากกว่า 10 มิลลิเมตรขึ้นไป พบว่ามีสารสกัดเส้นใยเชื้อรา *O. sobolifera* จำนวน 16 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท Cod- NB1302 Cod- KK1501 Cod- KK1502 Cod- KK1503 Cod- KK1505 Cod- KK1506 Cod- KK1507 Cod- KK1510 Cod- KK1511 Cod- KK1512 Cod- KK1513 Cod- KK1514 Cod- KK1515 Cod- KK1522 Cod- KK1523 และ Cod- KK1524 สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีที่สุดโดยเฉพาะเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกชนิด *S. aureus* MSSA DMST2933 *S. aureus* MRSA DMST20651 *S. aureus* MRSA DMST20654 *S. aureus* MRSA DMST4783 และ *B. cereus* ATCC11778 เมื่อเทียบกับบริเวณยับยั้งจากยาปฏิชีวนะ ciprofloxacin และเรียกไอโซเลทที่มีฤทธิ์ยับยั้งได้ดีที่สุดเหล่านี้ว่า “active isolate” ดังนั้นไอโซเลทดังกล่าวนี้จึงถูกคัดเลือกนำไปสกัดสารสกัดโปรตีนและศึกษาฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียต่อไป



ภาพที่ 20 บริเวณการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *B. cereus* ATCC11778 ของสารสกัดเส้นใยเชื้อรา *O. sobolifera* ด้วยวิธี agar well diffusion

1 = Ciprofloxacin 2 = Cod-KK1543 3 = Cod-KK1545
4 = Cod-KK1546 5 = Cod-KK1547 6 = Cod-KK1548
7 = 50% EtOH



ภาพที่ 21 บริเวณการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* MRSA DMST20651 ของสารสกัดเส้นใยเชื้อรา *O. sobolifera* ด้วยวิธี agar well diffusion

1 = Ciprofloxacin 2 = Cod-KK1515 3 = Cod-KK1517
4 = Cod-KK1518 5 = Cod-KK1519 6 = Cod-KK1520
7 = 50% EtOH

พหูน ปณ ฑิโต ชีเว

ตารางที่ 10 ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคของสารสกัดเส้นใย (mycelial extract) เชื้อรา *O. sobolifera* ด้วยวิธี agar well diffusion

ไอโซเลทของ *O. sobolifera*	บริเวณการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (มิลลิเมตร)* ของสารสกัดเส้นใยที่ระดับความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร																		
	Ps. aeruginosa ATCC27853	*S. typhi murium* ATCC14028	*E. coli* O157:H7 DMST12743	*E. coli* (EIEC) DMST30545	*Sh. ty phi* DMST22842	*Sh. typhi* DMST16122	*Sh. flexneri* DMST17569	*K. pneumoniae*	*Ps. aeruginosa* (pti)	*P. vulgaris*	*P. mirabilis*	*En. cloacae*	*Sh. dysenteriae* DMST15110	*Sh. flexneri* DMST4423	*V. cholerae* (O1) DMST9700	*S. aureus* (MSSA) DMST2933	*S. aureus* (MRSA) DMST20651	*S. aureus* (MRSA) DMST20654	*S. aureus* (MRSA) DMST4783	*B. cereus* ATCC11778
Cod-NB1302	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14±0.5	13±1.0	26.3±1.8	26.6±0.8	25.6±0.6	26.6±2.0	22.6±0.6
Cod-KK1501	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	18.3±0.6	18±0.5	17±0.0	15.3±0.3	13.6±0.8
Cod-KK1502	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	17±0.0	14.3±0.6	15.6±0.6	12.6±1.2	13±1.0
Cod-KK1503	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	17.6±0.6	17±0.0	15.37±0.8	14±1.0	14.6±0.8
Cod-KK1504	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14±1.0	14.6±0.3	13.3±0.8	13.3±0.8	17.6±0.6
Cod-KK1505	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11.3±0.8	9.3±0.3	23.6±0.8	19±0.0	17±1.1	16.3±0.6	15.6±0.6
Cod-KK1506	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8.6±0.3	10.5±0.5	19.6±1.2	18±0.5	17±1.1	19.3±0.8	18.3±0.6
Cod-KK1507	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16.3±0.6	15.6±0.6	17±0.0	18±0.5	17±0.0
Cod-KK1508	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15.3±0.3	17.6±0.6	15±0.0	17±1.1	17.6±0.6
Cod-KK1509	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ KK isolate = 42 ไอโซเลท, NB isolate = 1 ไอโซเลท, - = ไม่ยับยั้งเชื้อ, * ขนาดของบริเวณยับยั้ง รวมความกว้างของ well (7 มิลลิเมตร)

ตารางที่ 10 ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคของสารสกัดเส้นใย (mycelial extract) เชื้อรา *O. sobolifera* ด้วยวิธี agar well diffusion (ต่อ)

ไอโซเลทของ *O. sobolifera*	บริเวณการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (มิลลิเมตร)* ของสารสกัดเส้นใยที่ระดับความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร																			
	Ps. aeruginosa ATCC27853	*S. typhi murium* ATCC14028	*E. coli* O157:H7 DMST12743	*E. coli* (EIEC) DMST30545	*Sh. ty phi* DMST22842	*Sh. typhi* DMST16122	*Sh. flexneri* DMST17569	*K. pneumoniae*	*Ps. aeruginosa* (pti)	*P. vulgaris*	*P. mirabilis*	*En. cloacae*	*Sh. dysenteriae* DMST15110	*Sh. flexneri* DMST4423	*V. cholerae* (O1) DMST9700	*S. aureus* (MSSA) DMST2933	*S. aureus* (MRSA) DMST20651	*S. aureus* (MRSA) DMST20654	*S. aureus* (MRSA) DMST4783	*B. cereus* ATCC11778
Cod-KK1510	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16.3±0.6	18.6±1.6	16.3±0.6	17±0.0	19.3±1.4
Cod-KK1511	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16±1.5	17.3±0.3	16±0.0	16.6±0.3	15.6±0.6
Cod-KK1512	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15.3±0.3	15±1.1	18±1.0	17±0.0	15±0.0
Cod-KK1513	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16.3±0.3	19±1.1	14.3±0.3	15.3±0.8	15.6±1.3
Cod-KK1514	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	17.6±0.6	17±0.0	15±0.0	19±3.0	15.6±0.6
Cod-KK1515	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10.3±0.3	9.8±0.6	16.6±0.3	17.6±0.3	15.6±0.6	17±0.0	16.3±0.6
Cod-KK1517	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cod-KK1511	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16±1.5	17.3±0.3	16±0.0	16.6±0.3	15.6±0.6
Cod-KK1518	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13.3±0.8	13.3±0.8	12±0.0	12±0.0	11±1.0
Cod-KK1519	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15.6±0.8	17±0.0	15±1.1	17±0.0	15.6±0.6

หมายเหตุ KK isolate = 42 ไอโซเลท, NB isolate = 1 ไอโซเลท, - = ไม่ยับยั้งเชื้อ, * ขนาดของบริเวณยับยั้ง รวมความกว้างของ well (7 มิลลิเมตร)

ตารางที่ 10 ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคของสารสกัดเส้นใย (mycelial extract) เชื้อรา *O. sobolifera* ด้วยวิธี agar well diffusion (ต่อ)

ไอโซเลทของ *O. sobolifera*	บริเวณการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (มิลลิเมตร)* ของสารสกัดเส้นใยที่ระดับความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร																			
	Ps. aeruginosa ATCC27853	*S. typhi murium* ATCC14028	*E. coli* O157:H7 DMST12743	*E. coli* (EIEC) DMST30545	*Sh. ty phi* DMST22842	*Sh. typhi* DMST16122	*Sh. flexneri* DMST17569	*K. pneumoniae*	*Ps. aeruginosa* (pti)	*P. vulgaris*	*P. mirabilis*	*En. cloacae*	*Sh. dysenteriae* DMST15110	*Sh. flexneri* DMST4423	*V. cholerae* (O1) DMST9700	*S. aureus* (MSSA) DMST2933	*S. aureus* (MRSA) DMST20651	*S. aureus* (MRSA) DMST20654	*S. aureus* (MRSA) DMST4783	*B. cereus* ATCC11778
Cod-KK1520	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cod-KK1521	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cod-KK1522	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	17.6±0.6	14.3±0.6	15.6±0.6	15.6±0.6	15.6±1.3
Cod-KK1523	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8.3±0.3	9.3±0.3	15±0.0	13.6±0.8	8.1±0.6
Cod-KK1524	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	18.3±0.6	19.3±0.3	17±0.0	18±0.5	15.6±0.6
Cod-KK1525	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15±1.1	15.6±0.6	13.3±0.8	10.6±0.8	-
Cod-KK1526	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13±1.0	8.6±1.6	15±1.1	8.6±1.6	9.6±0.6
Cod-KK1527	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cod-KK1528	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9.6±0.6	16.3±0.6	13.6±0.6	10.6±0.8	15.6±0.6
Cod-KK1530	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13±0.5	17±0.0	19±1.5	13.6±0.6	15.6±0.6

หมายเหตุ KK isolate = 42 ไอโซเลท, NB isolate = 1 ไอโซเลท, - = ไม่ยับยั้งเชื้อ, * ขนาดของบริเวณยับยั้ง รวมความกว้างของ well (7 มิลลิเมตร)

ตารางที่ 10 ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคของสารสกัดเส้นใย (mycelial extract) เชื้อรา *O. sobolifera* ด้วยวิธี agar well diffusion (ต่อ)

ไอโซเลทของ *O. sobolifera*	บริเวณการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (มิลลิเมตร)* ของสารสกัดเส้นใยที่ระดับความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร																			
	Ps. aeruginosa ATCC27853	*S. typhi murium* ATCC14028	*E. coli* O157:H7 DMST12743	*E. coli* (EIEC) DMST30545	*Sh. ty phi* DMST22842	*Sh. typhi* DMST16122	*Sh. flexneri* DMST17569	*K. pneumoniae*	*Ps. aeruginosa* (ptl)	*P. vulgaris*	*P. mirabilis*	*En. cloacae*	*Sh. dysenteriae* DMST15110	*Sh. flexneri* DMST4423	*V. cholerae* (O1) DMST9700	*S. aureus* (MSSA) DMST2933	*S. aureus* (MRSA) DMST20651	*S. aureus* (MRSA) DMST20654	*S. aureus* (MRSA) DMST4783	*B. cereus* ATCC11778
Cod-KK1531	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13±1.0	14±1.0	16.3±0.6	14±1.0	13±2.0
Cod-KK1532	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14±1.0	15.6±0.6	17±0.0	17±0.0	15.6±0.6
Cod-KK1535	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14±1.5	15±0.0	15.6±0.6	15±0.0	15.6±0.6
Cod-KK1536	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14±1.0	-	-	14.6±1.4	13.6±0.6
Cod-KK1537	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13.6±0.6	12±1.7	14.6±1.4	10.6±0.8	12.6±1.2
Cod-KK1538	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13±1.0	-	-	14±1.0	9.6±0.6
Cod-KK1539	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cod-KK1540	-	-	-	-	-	-	9.6±0.3	-	-	-	-	-	-	-	-	15.6±0.6	5±0.0	13±1.0	11.3±0.6	-
Cod-KK1541	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16.3±0.6	16.3±0.6	15.6±0.6	15.6±0.6	15±0.0
Cod-KK1542	-	-	-	-	-	-	12±0.0	-	-	-	-	-	-	-	-	13±1.1	15.6±0.6	12±0.0	11±1.0	-

หมายเหตุ KK isolate = 42 ไอโซเลท, NB isolate = 1 ไอโซเลท, - = ไม่ยับยั้งเชื้อ, * ขนาดของบริเวณยับยั้ง รวมความกว้างของ well (7 มิลลิเมตร)

ตารางที่ 10 ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคของสารสกัดเส้นใย (mycelial extract) เชื้อรา *O. sobolifera* ด้วยวิธี agar well diffusion (ต่อ)

ไอโซเลทของ *O. sobolifera*	บริเวณการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (มิลลิเมตร)* ของสารสกัดเส้นใยที่ระดับความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร																			
	Ps. aeruginosa ATCC27853	*S. typhi murium* ATCC14028	*E. coli* O157:H7 DMST12743	*E. coli* (EIEC) DMST30545	*Sh. ty phi* DMST22842	*Sh. typhi* DMST16122	*Sh. flexneri* DMST17569	*K. pneumoniae*	*Ps. aeruginosa* (ptl)	*P. vulgaris*	*P. mirabilis*	*En. cloacae*	*Sh. dysenteriae* DMST15110	*Sh. flexneri* DMST4423	*V. cholerae* (O1) DMST9700	*S. aureus* (MSSA) DMST2933	*S. aureus* (MRSA) DMST20651	*S. aureus* (MRSA) DMST20654	*S. aureus* (MRSA) DMST4783	*B. cereus* ATCC11778
Cod-KK1543	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10.6 ±0.3	15.6 ±0.6	16.3 ±0.6	10.8 ±0.8	11.3 ±0.6
Cod-KK1546	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10.3 ±0.6	8.6 ±0.3	11.3 ±0.3	11.6 ±1.3	11.6 ±0.6
Cod-KK1547	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13.3 ±0.8	15.6 ±0.6	14.3 ±0.6	8.6 ±0.6	-
Cod-KK1548	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ciprofloxacin (250 ug/ml)	25.6 ±0.6	29.3 ±0.6	30.6 ±0.8	21.6 ±0.8	25.3 ±0.3	28.0 ±0.5	34.3 ±0.6	30.3 ±0.3	26.3 ±0.6	23.6 ±0.6	26.6 ±0.8	-	32.3 ±0.3	28.6 ±0.3	36.3 ±0.6	25.3 ±0.8	-	-	-	23.6 ±0.8

หมายเหตุ KK isolate = 42 ไอโซเลท, NB isolate = 1 ไอโซเลท, - = ไม่ยับยั้งเชื้อ, * ขนาดของบริเวณยับยั้ง รวมความกว้างของ well (7 มิลลิเมตร)

ตารางที่ 10 ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคของสารสกัดเส้นใย (mycelial extract) เชื้อรา *O. sobolifera* ด้วยวิธี agar well diffusion (ต่อ)

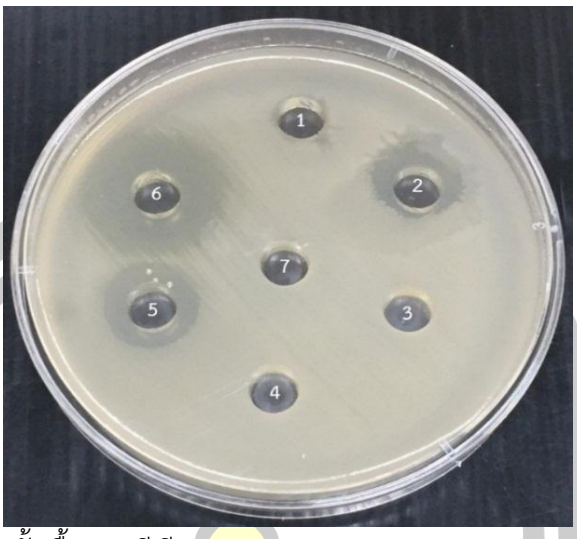
ไอโซเลทของ *O. sobolifera*	บริเวณการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (มิลลิเมตร)* ของสารสกัดเส้นใยที่ระดับความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร																		
	Ps. aeruginosa ATCC27853	*S. typhi murium* ATCC14028	*E. coli* O157:H7 DMST12743	*E. coli* (EIEC) DMST30545	*Sh. ty phi* DMST22842	*Sh. typhi* DMST16122	*Sh. flexneri* DMST17569	*K. pneumoniae*	*Ps. aeruginosa* (ptl)	*P. vulgaris*	*P. mirabilis*	*En. cloacae*	*Sh. dysenteriae* DMST15110	*Sh. flexneri* DMST4423	*V. cholerae* (O1) DMST9700	*S. aureus* (MSSA) DMST2933	*S. aureus* (MRSA) DMST20651	*S. aureus* (MRSA) DMST20654	*S. aureus* (MRSA) DMST4783	*B. cereus* ATCC11778
Tetracycline	26.3	35.6	36.2	33.4	-	27.6	-	25.3	32.4	33.6	-	-	-	-	29.6	27.0	31.6	32.3	33.3	37.0
(250 ug/ml)	±0.4	±0.2	±0.5	±0.3		±0.3		±0.2	±0.8	±0.6					±0.3	±1.1	±0.8	±1.4	±1.2	±1.1
50% EtOH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ KK isolate = 42 ไอโซเลท, NB isolate = 1 ไอโซเลท, - = ไม่ยับยั้งเชื้อ, * ขนาดของบริเวณยับยั้ง รวมความกว้างของ well (7 มิลลิเมตร)

4.3.2 ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคของสารสกัดโปรตีนจากเชื้อรา *O. sobolifera* ด้วยวิธี agar well diffusion

เมื่อทำการคัดเลือกไอโซเลทที่ให้ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ดีที่สุด (active isolate) จำนวน 16 ไอโซเลท มาทำการสกัดส่วนโปรตีนโดยการตกตะกอนด้วยสารละลาย 100 mM ammonium acetate เพื่อให้ได้เป็นสารสกัดโปรตีน (crude protein) จากเส้นใยเชื้อรา *O. sobolifera* พบว่าความเข้มข้นของสารสกัดโปรตีนที่สกัดได้จากทั้ง 16 ไอโซเลท มีความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 15-20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และเมื่อนำมาทำการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มแกรมบวก จำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *S. aureus* MSSA DMST2933, *S. aureus* MRSA DMST20651, *S. aureus* MRSA DMST20654, *S. aureus* MRSA DMST4783 และ *B. cereus* ATCC11778 ด้วยวิธี agar well diffusion พบว่า สารสกัดโปรตีนจากไอโซเลท Cod-NB1302 ให้ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบได้ดีที่สุด โดยสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทดสอบทั้ง 5 ชนิดได้ (บริเวณยับยั้งเฉลี่ย 14.6-17.3 มิลลิเมตร) ในขณะที่ไอโซเลท Cod-KK1505 Cod-KK1507 Cod-KK1510 Cod-KK1512 Cod-KK1513 Cod-KK1515 Cod-KK1522 และ Cod-KK1524 สามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้เพียงบางสายพันธุ์ (บริเวณยับยั้งเฉลี่ย 8.3-15.6 มิลลิเมตร) และที่น่าสนใจคือสารสกัดโปรตีนของเชื้อรา *O. sobolifera* สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มแกรมบวกโดยเฉพาะเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ดื้อยา *S. aureus* MRSA ที่นำมาทดสอบได้ ในขณะที่ยาปฏิชีวนะ ciprofloxacin ไม่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคดังกล่าวได้ เช่นเดียวกับผลการยับยั้งของสารสกัดเส้นใยของเชื้อราก็มีผลในการยับยั้งเชื้อดังกล่าวได้ดีเช่นเดียวกัน (ดังตารางที่ 11 และภาพที่ 22-23)

และเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียระหว่างสารสกัดเส้นใยและสารสกัดโปรตีนจากเชื้อรา *O. sobolifera* ทั้ง 16 ไอโซเลท ในภาพรวมแสดงให้เห็นว่า สารสกัดเส้นใยให้ผลการยับยั้งเชื้อได้ดีกว่าสารสกัดโปรตีน ซึ่งให้บริเวณยับยั้งใกล้เคียงกับชุดควบคุมโดยเฉพาะยาปฏิชีวนะ ciprofloxacin แต่อย่างไรก็ตามผลการศึกษาแสดงให้เห็นได้ว่าทั้งสารสกัดเส้นใยและสารสกัดโปรตีนจากเชื้อรา *O. sobolifera* ให้ผลไวต่อการยับยั้งเชื้อสายพันธุ์ดื้อยา (MRSA) ได้ดีกว่ายาปฏิชีวนะ ciprofloxacin ที่พบว่าเชื้อมีการดื้อต่อยาดังกล่าว (ดังตารางที่ 12)



ภาพที่ 22 บริเวณการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *B. cereus* ATCC11778 ของสารสกัดโปรตีนจากเชื้อรา *O. sobolifera* ด้วยวิธี agar well diffusion

1 = Cod-KK1515 2 = Cod-KK1512 3 = Cod-KK1513

4 = Cod-KK1514 5 = Ciprofloxacin 6 = Tetracycline 7 = DMSO

ภาพที่ 23 บริเวณการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* MRSA DMST4783 ของสารสกัดโปรตีนจากเชื้อรา *O. sobolifera* ด้วยวิธี Agar well diffusion

1 = Cod-KK1511 2 = Cod-KK1512 3 = Cod-KK1513

4 = Cod-KK1514 5 = Ciprofloxacin 6 = Tetracycline 7 = DMSO

ตารางที่ 11 ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดโปรตีน (crude protein) จากเชื้อรา *O. sobolifera* ด้วยวิธี agar well diffusion

ไอโซเลทของ *O. sobolifera*	**บริเวณการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (มิลลิเมตร)* ของสารสกัดเส้นใยที่ระดับความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร**				
	Staphylococcus aureus				***Bacillus cereus*** ATCC11778
	MSSA DMST2933	MRSA DMST20651	MRSA DMST20654	MSRA DMST4783	
Cod-NB1302	21.6±0.3	22.6±0.3	22.6±1.2	25.6±0.8	24.3±0.3
Cod-KK1501	-	-	-	-	-
Cod-KK1502	-	-	-	-	-
Cod-KK1503	-	-	-	-	-
Cod-KK1505	15.3±0.6	-	16.3±0.3	16±0.0	-
Cod-KK1506	-	-	-	-	-
Cod-KK1507	20±1.0	-	22.6±0.6	21.6±0.3	-
Cod-KK1510	22.6±0.6	-	-	-	-
Cod-KK1511	-	-	-	-	-
Cod-KK1512	19.6±0.6	-	22.3±0.3	18.6±0.3	16.6±0.6
Cod-KK1513	19.3±0.3	-	-	-	-

หมายเหตุ KK isolate = 15 ไอโซเลท, NB isolate = 1 ไอโซเลท, - = ไม่ยับยั้งเชื้อ, * ขนาดของบริเวณยับยั้ง รวมความกว้างของ well (7 มิลลิเมตร)

ตารางที่ 11 ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดโปรตีน (crude protein) จากเชื้อรา *O. sobolifera* ด้วยวิธี agar well diffusion (ต่อ)

ไอโซเลทของ *O. sobolifera*	**บริเวณการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (มิลลิเมตร)* ของสารสกัดเส้นใยที่ระดับความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร**				
	Staphylococcus aureus				*Bacillus cereus* ATCC11778
	MSSA DMST2933	MRSA DMST20651	MRSA DMST20654	MSRA DMST4783	
Cod-KK1514	-	-	-	-	-
Cod-KK1515	-	-	-	16.6±0.6	17.3±0.3
Cod-KK1522	16.3±0.3	-	-	-	16.6±0.6
Cod-KK1523	-	-	-	-	-
Cod-KK1524	16.6±0.6	-	-	18±0.5	-
Ciprofloxacin (250 ug/ml)	23.6±0.86	-	-	18.3±0.6	27.2±0.1
Tetracyclin (250 ug/ml)	30.0±0.57	31.3±0.3	31.6±1.4	32.6±1.2	35.6±0.6
DMSO	-	-	-	-	-

หมายเหตุ KK isolate = 15 ไอโซเลท, NB isolate = 1 ไอโซเลท, - = ไม่ยับยั้งเชื้อ, * ขนาดของบริเวณยับยั้ง รวมความกว้างของ well (7 มิลลิเมตร)

ตารางที่ 12 เปรียบเทียบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดเส้นใยและสารสกัดโปรตีนของเชื้อรา *O. sobolifera* ด้วยวิธี agar well diffusion

ไอโซเลทของ *O. sobolifera*	บริเวณการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (มิลลิเมตร)*									
	Staphylococcus aureus								*Bacillus cereus*	
	MSSA DMST2933		MRSA DMST20651		MRSA DMST20654		MSRA DMST4783		ATCC11778	
	C	P	C	P	C	P	C	P	C	P
Cod-NB1302	26.3±1.8	21.6±0.3	26.6±0.8	22.6±0.3	25.6±0.6	22.6±1.2	26.6±2.0	25.6±0.8	22.6±0.6	24.3±0.3
Cod-KK1501	18.3±0.6	-	18±0.5	-	17±0.0	-	15.3±0.3	-	13.6±0.8	-
Cod-KK1502	17±0.0	-	14.3±0.6	-	15.6±0.6	-	112.6±1.2	-	13±1.0	-
Cod-KK1503	17.6±0.6	-	17±0.0	-	15.3±0.8	-	14±1.0	-	14.6±0.8	-
Cod-KK1505	23.6±0.8	25.3±0.6	19±0.0	-	17±1.1	16.3±0.3	16.3±0.6	16±0.0	15.6±0.6	-
Cod-KK1506	19.6±1.2	-	18±0.5	-	17±1.1	-	19.3±0.8	-	18.3±0.6	-
Cod-KK1507	16.3±0.6	20±1.0	15.6±0.6	-	17±0.0	22.6±0.6	18±0.5	21.6±0.3	17±0.0	-
Cod-KK1510	16.3±0.6	22.6±0.6	18.6±1.6	-	16.3±0.6	-	17±0.0	-	19.3±1.4	-
Cod-KK1511	16±1.5	-	17.3±0.3	-	16±0.0	-	16.6±0.3	-	15.6±0.6	-
Cod-KK1512	15.3±0.3	19.6±0.6	15±1.1	-	18±1.0	22.3±0.3	17±0.0	18.6±0.3	15±0.0	16.6±0.6
Cod-KK1513	16.3±0.3	19.3±0.3	19±1.1	-	14.3±0.3	-	15.3±0.8	-	15.6±1.3	-

หมายเหตุ KK isolate = 15 ไอโซเลท, NB isolate = 1 ไอโซเลท, C = mycelial extract, P = crude protein, - = ไม่ยับยั้งเชื้อ, ND = not determine * ขนาดของบริเวณยับยั้งรวมความกว้างของ well

ตารางที่ 12 เปรียบเทียบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดเส้นใยและสารสกัดโปรตีนจากเชื้อรา *O. sobolifera* ด้วยวิธี agar well diffusion (ต่อ)

ไอโซเลทของ *O. sobolifera*	บริเวณการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (มิลลิเมตร)*									
	Staphylococcus aureus								*Bacillus cereus*	
	MSSA DMST2933		MRSA DMST20651		MRSA DMST20654		MSRA DMST4783		ATCC11778	
	C	P	C	P	C	P	C	P	C	P
Cod-KK1514	17.6±0.6	-	17±0.0	-	15±0.0	-	19±3.0	-	15.6±0.6	-
Cod-KK1515	16.6±0.3	-	17.6±0.3	-	15.6±0.6	-	17±0.0	16.6±0.6	16.3±0.6	17.3±0.3
Cod-KK1522	17.6±0.6	16.3±0.3	14.3±0.6	-	15.6±0.6	-	15.6±0.6	-	15.6±1.3	16.6±0.6
Cod-KK1523	8.3±0.3	-	9.3±0.3	-	15±0.0	-	13.6±0.8	-	8.1±0.6	-
Cod-KK1524	18.3±0.6	16.6±0.6	19.3±0.3	-	17±0.0	-	18±0.5	18±0.5	15.6±0.6	-
Ciprofloxacin	25.3±0.8	23.6±0.86	-	-	-	-	-	18.3±0.6	23.6±0.8	27.2±0.1
Tetracyclin	27.0±1.1	30.0±0.57	31.6±0.8	31.3±0.3	32.3±1.4	31.6±1.4	33.3±1.2	32.6±1.2	37.0±1.1	35.6±0.6
DMSO	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
50% EtOH	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND

หมายเหตุ KK isolate = 15 ไอโซเลท, NB isolate = 1 ไอโซเลท, C = mycelial extract, P = crude protein, - = ไม่ยับยั้งเชื้อ, ND = not determine * ขนาดของบริเวณยับยั้งรวมความกว้างของ well

4.4 ระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (minimum inhibitory concentration: MIC) และระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (minimum bactericidal concentration: MBC) ของสารสกัดจากเชื้อรา *O. sobolifera*

เมื่อทำการทดสอบหาระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (MIC) ด้วยวิธีการ agar well diffusion ด้วยสารสกัดเส้นใยหรือสารสกัดโปรตีนของเชื้อรา *O. sobolifera* ที่เจือจางทีละส่วน (serial dilution) และนำมาทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียทดสอบทั้ง 5 สายพันธุ์ (*S. aureus* MSSA DMST2933, *S. aureus* MRSA DMST20651, *S. aureus* MRSA DMST20654, *S. aureus* MRSA DMST4783 และ *B. cereus* ATCC11778) ให้ผลการทดสอบดังนี้

4.4.1 ค่า MIC ของสารสกัดเส้นใยและสารสกัดโปรตีนจากเชื้อรา *O. sobolifera*

ค่า MIC เมื่อทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion และวิธี microdilution method ให้ค่าที่สอดคล้องกัน อยู่ในช่วงระหว่าง 0.781-6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยสารสกัดเส้นใยส่วนใหญ่ให้ค่า MIC อยู่ในระดับค่อนข้างต่ำ และยับยั้งการเจริญของเชื้อทั้ง 5 สายพันธุ์ได้ ยกเว้น สารสกัดเส้นใยจากเชื้อราไอโซเลท Cod-KK1505 ยับยั้งการเจริญของเชื้อทั้ง 5 สายพันธุ์ได้น้อยที่สุด (ค่า MIC อยู่ช่วงระหว่าง 1.562-12.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ส่วนสารสกัดโปรตีนให้ค่า MIC อยู่ในช่วงระหว่าง 0.156-10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยสารสกัดโปรตีนจากไอโซเลท Cod-KK1507 ให้ค่า MIC ดีที่สุด (MIC = 0.156 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) โดยสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ทั้งสายพันธุ์ไวและดื้อต่อยา (MSSA DMST2933 และ MRSA DMST20651) รวมทั้งเชื้อ *B. cereus* ATCC11778 เมื่อพิจารณาค่า MIC ของไอโซเลท Cod-NB1302 ที่ถือเป็นไอโซเลทที่ยับยั้งเชื้อได้ดีที่สุด พบว่ามีค่า MIC ของสารสกัดเส้นใยและสารสกัดโปรตีนค่อนข้างต่ำต่อการยับยั้งเชื้อโดยเฉพาะในสายพันธุ์ดื้อยา *S. aureus* (MIC สารสกัดเส้นใย= 0.781-1.562 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ MIC สารสกัดโปรตีน= 0.625-1.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ)

และเมื่อเปรียบเทียบค่า MIC ของสารสกัดเส้นใยและสารสกัดโปรตีนในแต่ละไอโซเลท พบว่าสารสกัดเส้นใยทุกไอโซเลทยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ทั้ง 5 สายพันธุ์ (MIC= 0.781 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ในขณะที่สารสกัดโปรตีนยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. cereus* ATCC11778 และ *S. aureus* สายพันธุ์ไวและดื้อต่อยาบางสายพันธุ์ (MSSA DMST2933 และ MRSA DMST20651) (ดังตารางที่ 13)

4.4.2 ค่า MBC ของสารสกัดเส้นใยและสารสกัดโปรตีนจากเชื้อรา *O. sobolifera*

สารสกัดเส้นใยจากทุกไอโซเลทส่วนใหญ่ให้ค่า MBC ค่อนข้างต่ำเช่นเดียวกับค่า MIC ของสารสกัดเส้นใยและสารสกัดโปรตีน โดยมีค่าอยู่ในช่วงระหว่าง 0.781-12.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งสามารถฆ่าเชื้อทดสอบทั้ง 5 สายพันธุ์ได้เป็นอย่างดี ส่วนสารสกัดโปรตีนให้ค่า MBC อยู่ในช่วงระหว่าง 0.156-10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยสามารถฆ่าเชื้อ *S. aureus* สายพันธุ์ไวต่อยา (MSSA DMST2933)

และ *B. cereus* ATCC11778 ได้ดีที่สุด (MBC=0.156 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ในขณะที่ค่า MBC ของสารสกัดโปรตีนดีที่สุดเท่ากับ 0.312 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในการออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อ *S. aureus* สายพันธุ์ดื้อยา (MRSA DMST20654) เมื่อพิจารณาค่า MBC พบว่า ค่า MBC ทั้งจากสารสกัดเส้นใยและสารสกัดโปรตีนของไอโซเลท Cod-NB1302 มีค่าค่อนข้างต่ำซึ่งสอดคล้องกับค่า MIC ที่ได้รายงานมาแล้ว โดยให้ค่า MBC ของสารสกัดเส้นใยเท่ากับ 0.781 และ 1.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สำหรับสารสกัดโปรตีนในการฆ่าเชื้อทั้ง 5 สายพันธุ์

จากผลการทดสอบค่าระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ (MIC) และฆ่าเชื้อ (MBC) ในสารสกัดเส้นใยและสารสกัดโปรตีนให้ผลสอดคล้องกัน โดยสารสกัดเส้นใยและสารสกัดโปรตีนจากไอโซเลท Cod-NB1302 และ Cod-KK1507 มีผลต่อเจริญของเชื้อ *S. aureus* ทั้งสายพันธุ์ไวและดื้อต่อยา (*S. aureus* MSSA DMST2933 และ *S. aureus* MRSA DMST20651) ได้ดีที่สุด (ดังตารางที่ 14)

พหูน ปณ ฑิโต ชีเว

ตารางที่ 13 ระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (MIC) ของสารสกัดเส้นใยและสารสกัดโปรตีนจากเชื้อรา *O. soobolifera*

ไอโซเลทของ *O. sobolifera*	ระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (MIC) (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) (ค่าที่ได้จากการทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion/microdilution)									
	S.aureus MSSA DMST2933		*S.aureus* MRSA DMST20651		*S.aureus* MRSA DMST20654		*S.aureus* MSRA DMST4783		*B.cereus* ATCC11778	
	C	P	C	P	C	P	C	P	C	P
Cod-NB1302	0.781/0.781	0.625/0.625	1.562/1.562	0.625/0.625	0.781/0.781	1.25/1.25	0.781/0.781	1.25/1.25	0.781/0.781	1.25/1.25
Cod-KK1501	0.781/0.781	0.156/0.156	1.562/1.562	0.312/0.312	0.781/0.781	1.25/1.25	0.781/0.781	0.625/0.625	0.781/0.781	0.156/0.156
Cod-KK1502	0.781/0.781	5.0/5.0	1.562/1.562	0.625/0.625	0.781/0.781	1.25/1.25	0.781/0.781	1.25/1.25	0.781/0.781	0.625/0.625
Cod-KK1503	0.781/0.781	2.5/2.5	1.562/1.562	0.625/0.625	1.562/1.562	0.312/0.312	1.562/1.562	0.625/0.625	1.562/1.562	0.625/0.625
Cod-KK1505	1.562/1.562	2.5/2.5	6.25/6.25	0.625/0.625	3.125/3.125	2.5/2.5	12.5/12.5	1.25/1.25	6.25/6.25	0.625/0.625
Cod-KK1506	0.781/0.781	0.156/0.156	0.781/0.781	0.625/0.625	0.781/0.781	0.625/0.625	0.781/0.781	0.625/0.625	0.781/0.781	0.625/0.625
Cod-KK1507	0.781/0.781	0.156/0.156	0.781/0.781	0.156/0.156	0.781/0.781	1.25/1.25	0.781/0.781	1.562/1.562	0.781/0.781	0.156/0.156
Cod-KK1510	0.781/0.781	0.625/0.625	1.562/1.562	1.25/1.25	1.562/1.562	1.25/1.25	1.562/1.562	1.25/1.25	0.781/0.781	0.625/0.625
Cod-KK1511	0.781/0.781	0.156/0.156	0.781/0781	0.312/0.312	1.562/1.562	1.25/1.25	1.562/1.562	1.25/1.25	0.781/0.781	0.625/0.625
Cod-KK1512	0.781/0.781	5.0/5.0	1.562/1.562	5.0/5.0	6.25/6.25	5.0/5.0	1.562/1.562	5.0/5.0	1.562/1.562	5.0/5.0

หมายเหตุ MIC = minimum inhibitory concentration, C= สารสกัดเส้นใย (mycelial extract), P= สารสกัดโปรตีน (crude protein) ของเชื้อรา *O. sobolifera*

ตารางที่ 13 ระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (MIC) ของสารสกัดเส้นใยและสารสกัดโปรตีนจากเชื้อรา *O. sobolifera* (ต่อ)

ไอโซเลทของ *O. sobolifera*	ระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (MIC) (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) (ค่าที่ได้จากการทดสอบด้วยวิธี Agar well diffusion/Microdilution)									
	S.aureus MSSA DMST2933		*S.aureus* MRSA DMST20651		*S.aureus* MRSA DMST20654		*S.aureus* MSRA DMST4783		*B.cereus* ATCC11778	
	C	P	C	P	C	P	C	P	C	P
Cod-KK1513	0.781/0.781	10.0/10.0	1.562/1.562	5.0/5.0	1.562/1.562	10.0/10.0	1.562/1.562	10.0/10.0	1.562/1.562	10.0/10.0
Cod-KK1514	0.781/0.781	1.25/1.25	0.781/0.781	2.5/2.5	0.781/0.781	1.25/1.25	0.781/0.781	1.25/1.25	0.781/0.781	2.5/2.5
Cod-KK1515	0.781/0.781	2.5/2.5	0.781/0.781	2.5/2.5	0.781/0.781	2.5/2.5	0.781/0.781	2.5/2.5	0.781/0.781	2.5/2.5
Cod-KK1522	0.781/0.781	2.5/2.5	0.781/0.781	1.25/1.25	0.781/0.781	1.25/1.25	0.781/0.781	1.25/1.25	0.781/0.781	2.5/2.5
Cod-KK1523	0.781/0.781	2.5/2.5	0.781/0.781	1.25/1.25	0.781/0.781	1.25/1.25	0.781/0.781	1.25/1.25	0.781/0.781	2.5/2.5
Cod-KK1524	0.781/0.781	2.5/2.5	0.781/0.781	2.5/2.5	0.781/0.781	2.5/2.5	0.781/0.781	1.25/1.25	0.781/0.781	1.251.25

หมายเหตุ MIC = minimum inhibitory concentration, C= สารสกัดเส้นใย (mycelial extract), P= สารสกัดโปรตีน (crude protein) ของเชื้อรา *O. sobolifera*

ตารางที่ 14 ระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC) ของสารสกัดเส้นใยและสารสกัดโปรตีนจากเชื้อรา *O. sobolifera*

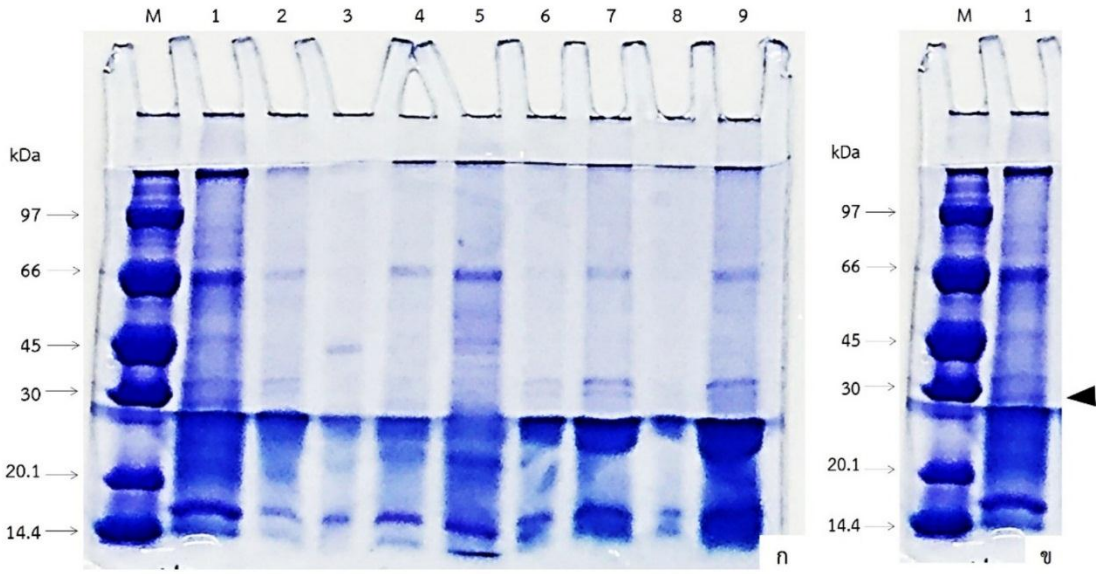
ไอโซเลทของ *O. sobolifera*	ระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC) (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)									
	S.aureus MSSA DMST2933		*S.aureus* MRSA DMST20651		*S.aureus* MRSA DMST20654		*S.aureus* MSRA DMST4783		*B.cereus* ATCC11778	
	C	P	C	P	C	P	C	P	C	P
Cod-NB1302	0.781	1.25	0.781	1.25	0.781	1.25	0.781	1.25	0.781	1.25
Cod-KK1501	0.781	0.312	1.562	2.5	0.781	1.25	1.562	0.625	0.781	0.156
Cod-KK1502	3.125	5.0	0.781	1.25	0.781	1.25	0.781	2.5	0.781	0.625
Cod-KK1503	6.25	2.5	1.562	5.0	1.562	0.312	1.562	1.25	1.562	1.25
Cod-KK1505	25.0	2.5	6.25	1.25	6.25	2.5	25.0	2.5	6.25	1.25
Cod-KK1506	1.562	0.625	0.781	0.625	0.781	0.625	0.781	0.625	0.781	0.625
Cod-KK1507	0.781	1.25	0.781	2.5	0.781	1.25	0.781	0.625	0.781	0.156
Cod-KK1510	0.781	0.625	3.125	1.25	1.562	1.25	3.125	1.25	0.781	0.625
Cod-KK1511	0.781	0.156	3.125	1.25	1.562	1.25	1.25	2.5	0.781	0.625
Cod-KK1512	0.781	5.0	3.125	5.0	6.25	5.0	1.562	5.0	1.562	5.0
Cod-KK1513	1.562	10.0	1.562	10.0	0.782	10.0	3.125	10.0	1.562	10.0
Cod-KK1514	0.781	2.5	0.781	5.0	1.562	1.25	0.781	2.5	0.781	2.5
Cod-KK1515	0.781	2.5	0.781	2.5	0.781	2.5	0.781	5.0	0.781	2.5
Cod-KK1522	0.781	2.5	0.781	1.25	0.781	1.25	0.781	1.25	0.781	2.5
Cod-KK1523	0.781	2.5	0.781	1.25	0.781	1.25	0.781	1.25	0.781	2.5
Cod-KK1524	0.781	2.5	0.781	2.5	0.781	2.5	0.781	2.5	0.781	1.25

หมายเหตุ MBC = minimum bactericidal concentration, C= สารสกัดเส้นใย (mycelial extract), P= สารสกัดโปรตีน (crude protein) ของเชื้อรา *O. sobolifera*

4.5 การวิเคราะห์ขนาดและชนิดของโปรตีนจากเชื้อรา *O. sobolifera*

จากผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสารสกัดเส้นใยและสารสกัดโปรตีนจากเชื้อรา *O. sobolifera* พบว่าสารสกัดจากไอโซเลท Cod-NB1302 ให้ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียดีที่สุด จึงคัดเลือกสารสกัดโปรตีนจากไอโซเลทดังกล่าว มาทำการวิเคราะห์ขนาดของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE และวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนด้วยวิธี GC-MS/MS พบว่าเมื่อเปรียบเทียบขนาดของโปรตีนที่แยกในตัวกลางชนิดโพลิอะคริลาไมด์เจล ด้วยวิธีการ SDS-PAGE เปรียบเทียบระหว่างโปรตีนในสารสกัดจากเชื้อรา *O. sobolifera* กลุ่ม active isolate (16 ไอโซเลท) และตัวแทนสารสกัดจากเชื้อรา *O. sobolifera* กลุ่ม non-active isolate (4 ไอโซเลท ได้แก่ Cod-KK1504 Cod-KK1530 Cod-KK1545 และ Cod-KK1546) พบว่าแถบของโปรตีนที่พบในสารสกัดกลุ่ม active isolate (ภาพที่ 24ก เลน 1-5) มีขนาดของโปรตีนแตกต่างจากแถบโปรตีนที่พบในกลุ่ม non-active isolate (ภาพที่ 24ก เลน 6-9) โดยตัวอย่างโปรตีนในกลุ่ม active isolate พบโปรตีนขนาด 30 kDa ขณะที่ในกลุ่ม non-active isolate ไม่พบโปรตีนขนาดดังกล่าว จึงได้ทำการตัดแยกแถบโปรตีนดังกล่าวเพื่อนำไปวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนต่อไป

พหูน ปณฺฑิโต ชีเว



ภาพที่ 24 แถบโปรตีนที่แยกได้จากสารสกัดโปรตีนของเชื้อรา *O. sobolifera* ด้วยวิธี SDS-PAGE (ก) สารสกัดกลุ่ม active isolate (เลน 1-5) และสารสกัดกลุ่ม non-active isolate (เลน 6-9) (ข) แถบโปรตีนขนาด 30 kDa ของไอโซเลท Cod-NB1302 ที่ถูกคัดเลือกเพื่อนำไปวิเคราะห์หาชนิดโปรตีน

M = Protein ladder

1 = Cod-NB1302	2 = Cod-KK1512	3 = Cod-KK1513
4 = Cod-KK1514	5 = Cod-KK1515	6 = Cod-KK1504
7 = Cod-KK1530	8 = Cod-KK1545	9 = Cod-KK1546

เมื่อทำการตัดแถบโปรตีนขนาด 30 kDa ที่คัดเลือกจากไอโซเลท Cod-NB1302 เพื่อวิเคราะห์ชนิดและหาลำดับกรดอะมิโนด้วยวิธี GC-MS/MS จากบริษัท Proteomics International ประเทศออสเตรเลีย พบว่า ขนาดโมเลกุลของโปรตีนที่ได้มีขนาดมวลโมเลกุลเท่ากับ 30 kDa และมีลำดับกรดอะมิโน ดังนี้

1 MVKAVAVLRG DSNVKGTVIF EQESESAPTT ITYDISGNDP NAKRGFHIHT

51 FGDNTNGCTS AGPHCKSSEI RVPGNGVGRG EEREEAIIIA EQWTDQCALT

101 HHAVNPRGTT HGNRTDEVR**H VGDLGNLETD AQGNAK**GSVT DNLVK**LIGPE**

151 **SVIGR**TVVVH AGTDDLGKGG NEEPLKTGNA GPRPACGVIG ISQ

โดยตัวอย่างโปรตีนที่แยกได้มีลำดับกรดอะมิโนจำนวน 193 กรดอะมิโน โดยมีส่วนบริเวณส่วนปลายอะมิโน (N-terminal sequence) คือ HVGDLGNIETDAQGNAK และเมื่อทำการเปรียบเทียบชนิดของโปรตีนจากข้อมูลใน GenBank ด้วยโปรแกรม ExPASy และ BLAST analysis พบว่า ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนจากตัวอย่างเชื้อรา O. sobolifera ไอโซเลท Cod-NB1302 มีความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนสำหรับยีนกลุ่มเอนไซม์ superoxide dismutase -1 (SOD1) ที่พบในเชื้อรา *Sordaria fimicola* ไอโซเลท SFECSOD1-N6 (KM282180.1)) (เปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 80%), superoxide dismutase ของเชื้อราแมลง *Cordyceps militaris* Cu-Zn (AY822477.1) (เปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 66%) และยีน SOD1 ของเชื้อราชนิดอื่นๆ (เปอร์เซ็นต์ความเหมือนอยู่ระหว่าง 65-79%) ดังนั้นจึงคาดว่าชนิดของโปรตีนที่สามารถแยกได้จากตัวอย่างเชื้อรา *O. sobolifera* ไอโซเลท Cod-NB1302 ในครั้งนี้ อาจจัดเป็นโปรตีนในกลุ่มเอนไซม์ superoxide dismutase -1 (SOD1)

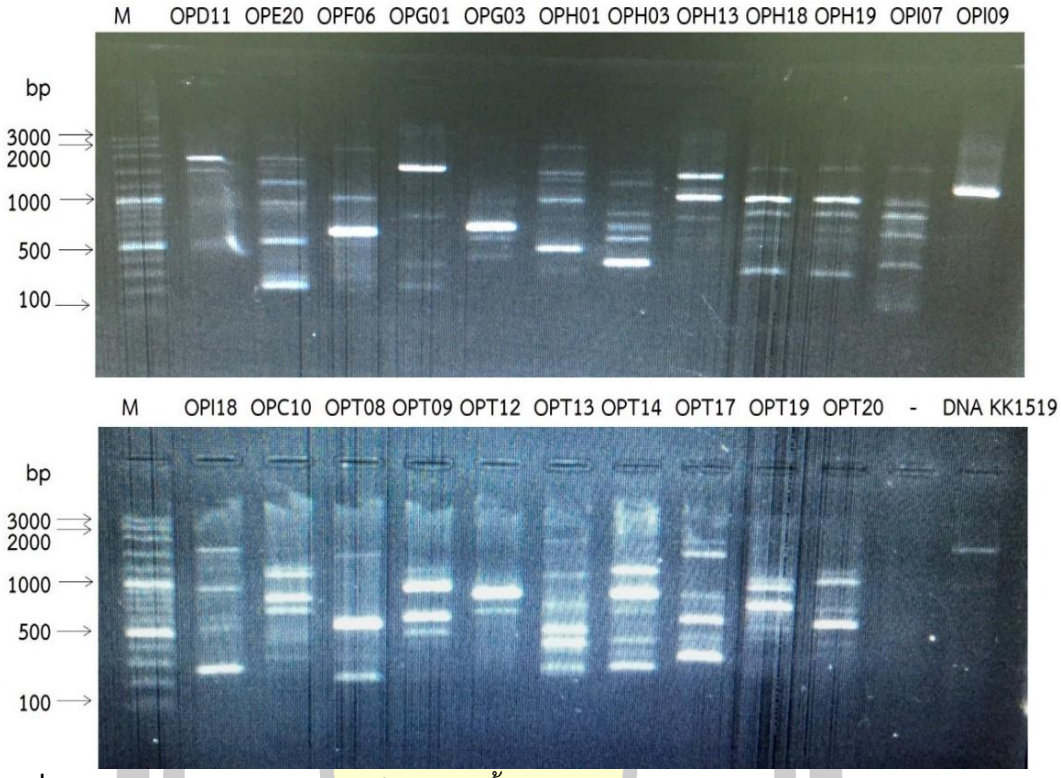
4.6 การออกแบบเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับระบุชนิดของเชื้อรา *O. sobolifera*

4.6.1 การสกัดดีเอ็นเอจากเส้นใยและการทดสอบหาไพร์เมอร์ที่เหมาะสมต่อการศึกษาลักษณะความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอของเชื้อรา *O. sobolifera* ด้วยเทคนิค Random amplified polymorphic (RAPD)

เมื่อทำการเลี้ยงเส้นใยเชื้อรา *O. sobolifera* ในแต่ละไอโซเลทบนอาหารเหลวสูตร PDB บ่มที่อุณหภูมิ 25-28°C เป็นเวลา 20 วัน จากนั้นทำการเก็บเส้นใยเชื้อราและบดเส้นใยให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว นำเส้นใยที่บดละเอียดไปสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดทดสอบ plant DNA extraction kit (Vivantis, USA) ขั้นตอนการสกัดทำตามวิธีการในชุดทดสอบ นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจหาขนาดของดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 1% และวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง nanodrop ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และทำการเก็บดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ –20°C เพื่อใช้ในการศึกษาขั้นตอนต่อไป พบว่าทุกไอโซเลททั้ง 44 ไอโซเลท สามารถสกัดดีเอ็นเอของเชื้อราได้ทุกไอโซเลท โดยมีความเข้มข้นของปริมาณดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 1-10 นาโนกรัม/ไมโครลิตร

นำ genomic DNA ของเชื้อรา *O. sobolifera* ไอโซเลท Cod-KK1519 ที่สกัดได้มาทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการศึกษาและคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมต่อลักษณะความแตกต่างของแถบแบนดีเอ็นเอของเชื้อรา *O. sobolifera* ด้วยเทคนิค RAPD โดยเลือกใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม (random primer) จำนวนทั้งหมด 22 ไพรเมอร์ พบว่า ไพรเมอร์ที่นำมาทำการศึกษาทั้ง 22 ไพรเมอร์ สามารถเพิ่มจำนวน genomic DNA ของเชื้อรา *O. sobolifera* ไอโซเลท Cod-KK1519 ได้ โดยสามารถให้แถบดีเอ็นเอแตกต่างกันตามชนิดของไพรเมอร์ เมื่อพิจารณาไพรเมอร์ที่สามารถให้แถบดีเอ็นเอตั้งแต่

5-15 แถบขึ้นไป พบว่า มีจำนวน 5 ไพรเมอร์ ได้แก่ OPE20 OPH03 OPT13 OPT14 และ OPT17 ที่มีคุณสมบัติดังกล่าว จึงทำการคัดเลือกสำหรับใช้ศึกษาในขั้นตอนต่อไป (ดังภาพที่ 25)

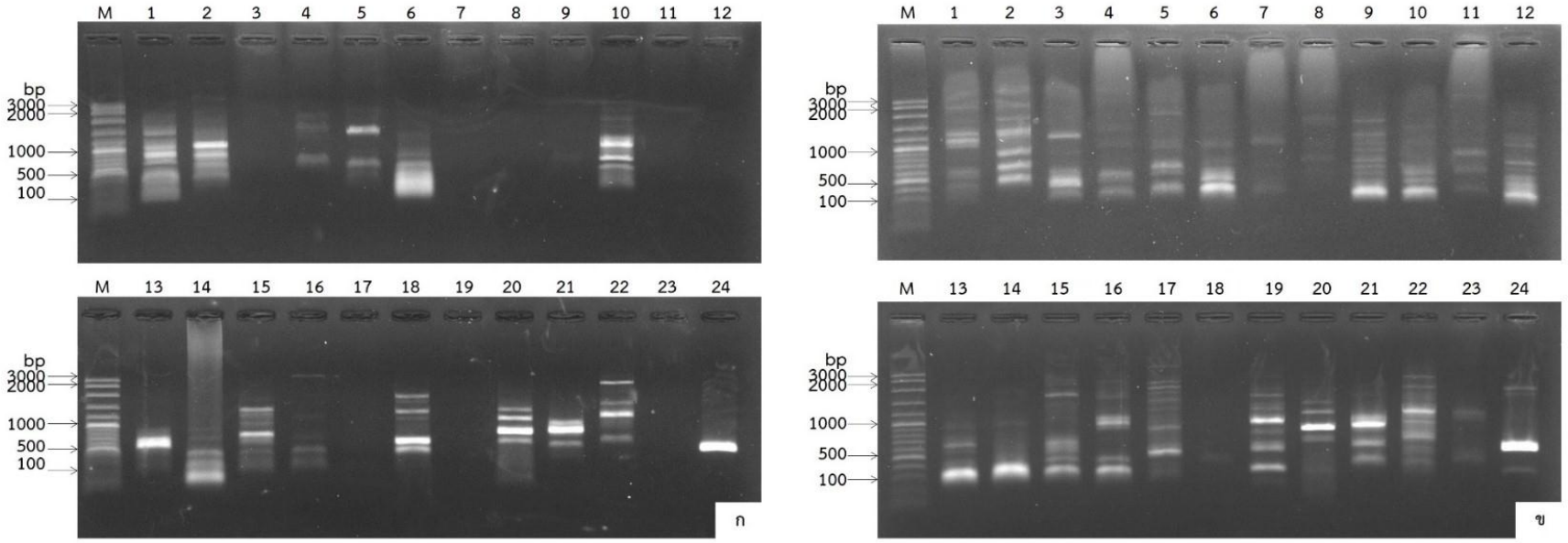


ภาพที่ 25 ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอของเชื้อรา *O. sobolifera* ไอโซเลท Cod-KK1519 จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์จำเพาะ 22 ไพร์เมอร์ ด้วยเทคนิค RAPD

และเมื่อนำไพรเมอร์ทั้ง 5 ไพรเมอร์ มาทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของเชื้อทดสอบ จำนวน 3 กลุ่ม ประกอบด้วย (1) ดีเอ็นเอของเชื้อรา *O. sobolifera* กลุ่ม active isolate จำนวน 16 ไอโซเลท (2) ดีเอ็นเอของเชื้อรา *O. sobolifera* กลุ่ม non-active isolate จำนวน 4 ไอโซเลท และ (3) ดีเอ็นเอของเชื้อราแมลงชนิดอื่นที่ไม่ใช่ *O. sobolifera* ที่พบเจริญบนตัวอ่อนจักจั่น จำนวน 4 ไอโซเลท (เชื้อรา *Simplicilium* sp. ไอโซเลท Cod-MK1311 เชื้อรา *Polycephalomyces nipponicus* ไอโซเลท Cod-MK1319 เชื้อรา *O. longissima* ไอโซเลท Cod-Loei 1301 และเชื้อรา *Metacordyceps chalamydosporia* ไอโซเลท Cod-NN1302) และทำการปรับสภาวะของอุณหภูมิช่วง annealing ที่เหมาะสมต่อไพรเมอร์แต่ละชนิด พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณแถบดีเอ็นเอของเชื้อราทดสอบได้แตกต่างกัน และพบแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏมีความแตกต่างทั้งขนาดและจำนวนแถบดีเอ็นเอระหว่างเชื้อรา *O. sobolifera* กลุ่ม active isolated และกลุ่ม non-active isolate รวมทั้งไพรเมอร์ทดสอบทั้ง 5 คู่ ยังสามารถทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างระหว่างกลุ่มเชื้อรา

O. sobolifera และกลุ่มเชื้อราแมลงชนิดอื่นที่พบบนตัวอ่อนจักจั่นอีกด้วย โดยไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่เป็นโพลิมอฟิกมากที่สุด จำนวน 5-15 แถบ (0.3-3 kb) คือ OPT13 ที่สภาวะอุณหภูมิ annealing 36°C รองลงมาคือ OPE20 OPH03 OPT14 และ OPT17 ตามลำดับ (ภาพที่ 26-30) นอกจากนี้ไพรเมอร์ OPT13 ยังให้แถบดีเอ็นเอเฉพาะและพบเฉพาะในเชื้อรา *O. sobolifera* เท่านั้น ดังนั้นไพรเมอร์ OPT13 จึงถูกคัดเลือกเพื่อใช้ในการพัฒนาเป็นเครื่องหมายโมเลกุล (DNA marker) ต่อไป

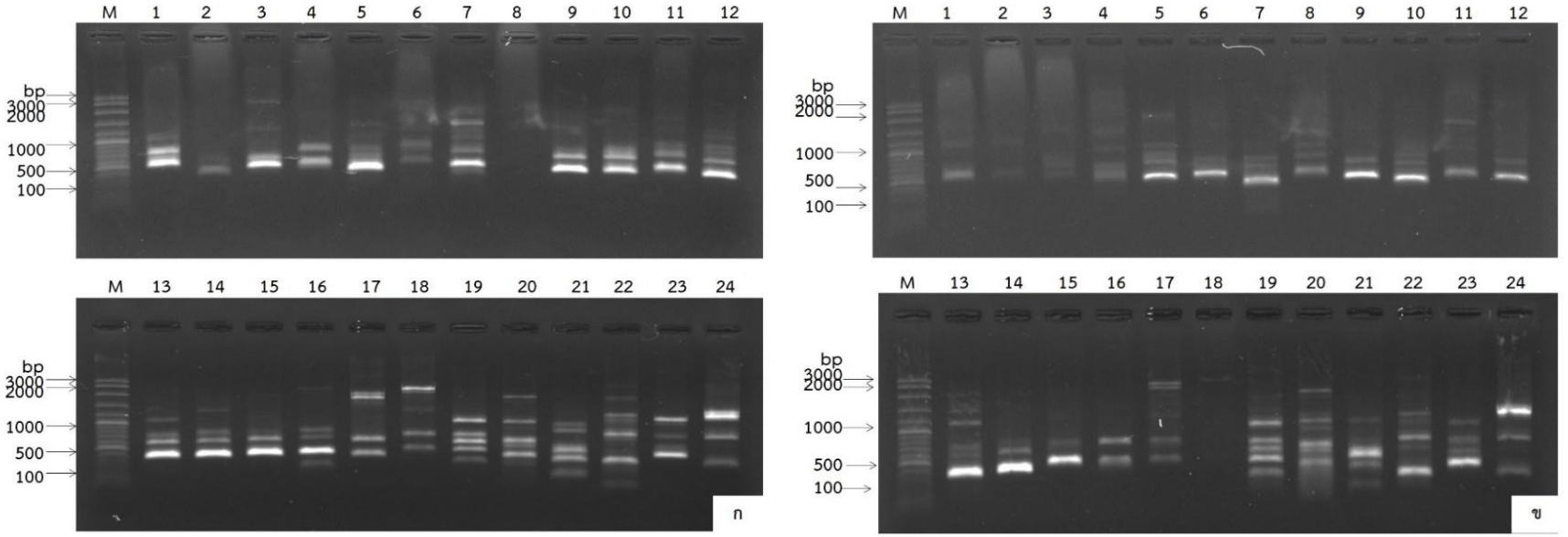
พหูน ปณ ฑิโต ชีเว



ภาพที่ 26 ลักษณะแถบดีเอ็นเอของเชื้อรา *O. sobolifera* แต่ละไอโซเลทจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพร์เมอร์ OPE20 โดยเทคนิค RAPD (ก) ภายใต้สภาวะอุณหภูมิ annealing ที่ 36°C และ (ข) ภายใต้สภาวะอุณหภูมิ annealing ที่ 38°C

M = 100 bp plus DNA ladder

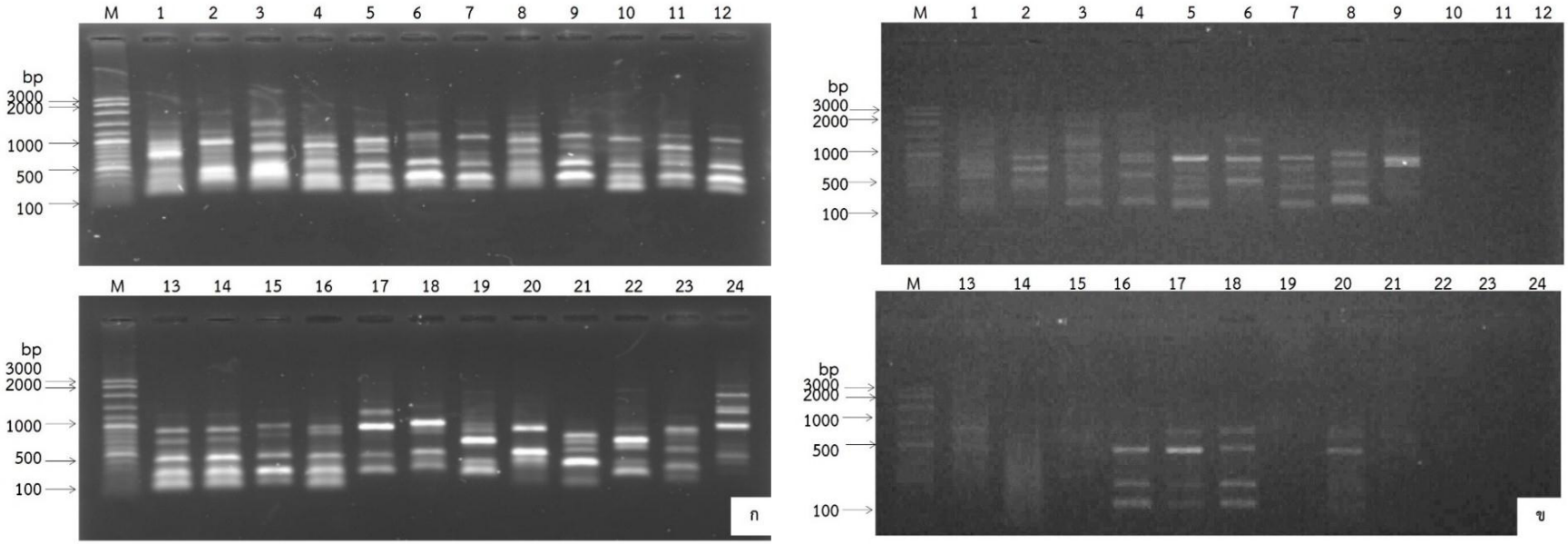
1 = Cod-NB1302	2 = Cod-KK1501	3 = Cod-KK1502	4 = Cod-KK1503	5 = Cod-KK1505	6 = Cod-KK1506
7 = Cod-KK1507	8 = Cod-KK1510	9 = Cod-KK1511	10 = Cod-KK1512	11 = Cod-KK1513	12 = Cod-KK1514
13 = Cod-KK1515	14 = Cod-KK1522	15 = Cod-KK1523	16 = Cod-KK1524	17 = Cod-KK1517	18 = Cod-KK1519
19 = Cod-KK1529	20 = Cod-KK1533	21 = Cod-MK1311	22 = Cod-MK1319	23 = Cod-Loei1301	24 = Cod-NN1302



ภาพที่ 27 ลักษณะแถบดีเอ็นเอของเชื้อรา *O. sobolifera* แต่ละไอโซเลทจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพร์เมอร์ OPH03 โดยเทคนิค RAPD (ก) ภายใต้สภาวะอุณหภูมิ annealing ที่ 36°C และ (ข) ภายใต้สภาวะอุณหภูมิ annealing ที่ 38°C

M = 100 bp plus DNA ladder

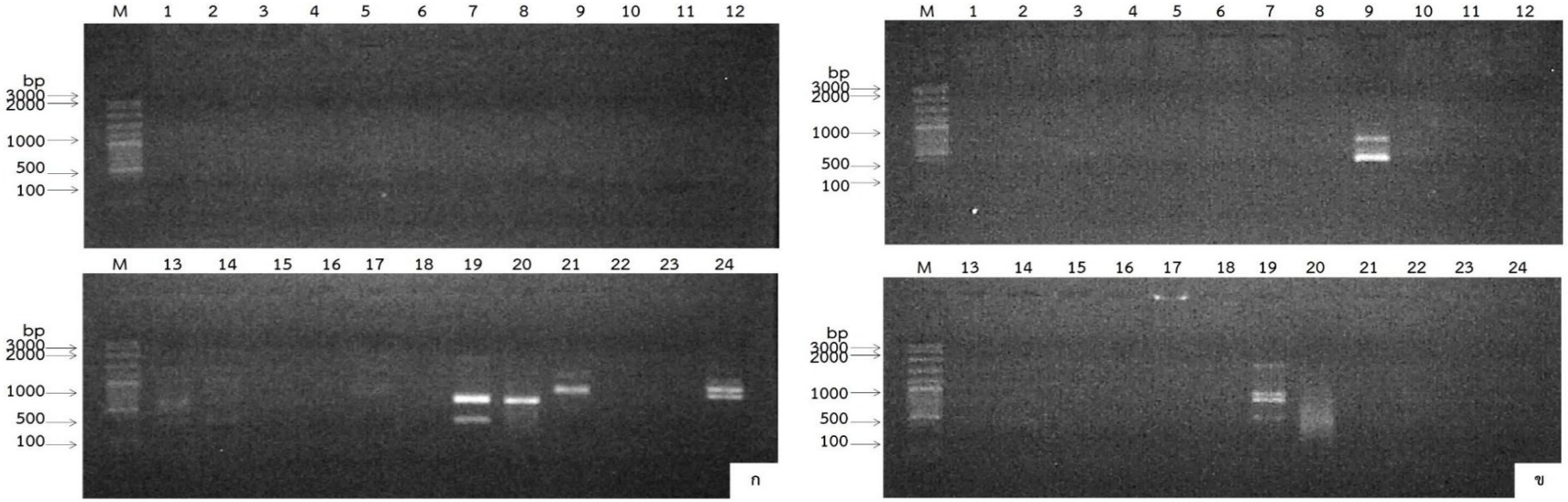
1 = Cod-NB1302	2 = Cod-KK1501	3 = Cod-KK1502	4 = Cod-KK1503	5 = Cod-KK1505	6 = Cod-KK1506
7 = Cod-KK1507	8 = Cod-KK1510	9 = Cod-KK1511	10 = Cod-KK1512	11 = Cod-KK1513	12 = Cod-KK1514
13 = Cod-KK1515	14 = Cod-KK1522	15 = Cod-KK1523	16 = Cod-KK1524	17 = Cod-KK1517	18 = Cod-KK1519
19 = Cod-KK1529	20 = Cod-KK1533	21 = Cod-MK1311	22 = Cod-MK1319	23 = Cod-Loei1301	24 = Cod-NN1302



ภาพที่ 28 ลักษณะแถบดีเอ็นเอของเชื้อรา *O. sobolifera* แต่ละไอโซเลทจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพร์เมอร์ OPT13 โดยเทคนิค RAPD (ก) ภายใต้สภาวะอุณหภูมิ annealing ที่ 36°C และ (ข) ภายใต้สภาวะอุณหภูมิ annealing ที่ 38°C

M = 100 bp plus DNA ladder

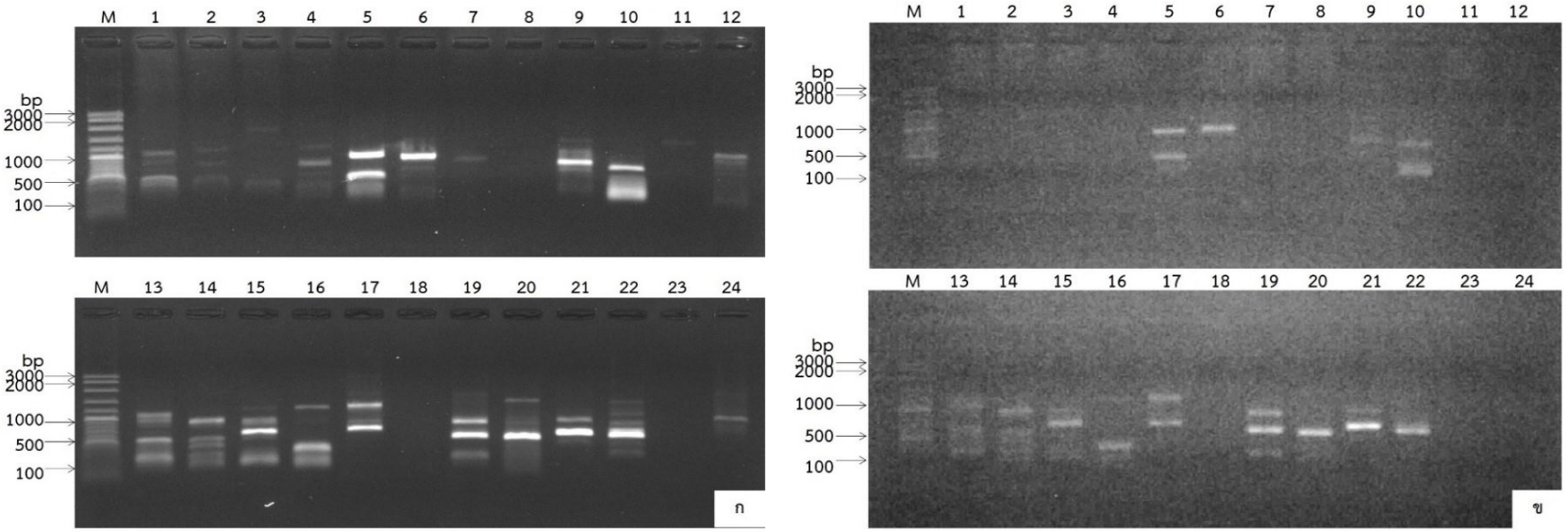
1 = Cod-NB1302	2 = Cod-KK1501	3 = Cod-KK1502	4 = Cod-KK1503	5 = Cod-KK1505	6 = Cod-KK1506
7 = Cod-KK1507	8 = Cod-KK1510	9 = Cod-KK1511	10 = Cod-KK1512	11 = Cod-KK1513	12 = Cod-KK1514
13 = Cod-KK1515	14 = Cod-KK1522	15 = Cod-KK1523	16 = Cod-KK1524	17 = Cod-KK1517	18 = Cod-KK1519
19 = Cod-KK1529	20 = Cod-KK1533	21 = Cod-MK1311	22 = Cod-MK1319	23 = Cod-Loei1301	24 = Cod-NN1302



ภาพที่ 29 ลักษณะแถบดีเอ็นเอของเชื้อรา *O. sobolifera* แต่ละไอโซเลทจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพร์เมอร์ OPT14 โดยเทคนิค RAPD (ก) ภายใต้สภาวะอุณหภูมิ annealing ที่ 36°C และ (ข) ภายใต้สภาวะอุณหภูมิ annealing ที่ 38°C

M = 100 bp plus DNA ladder

1 = Cod-NB1302	2 = Cod-KK1501	3 = Cod-KK1502	4 = Cod-KK1503	5 = Cod-KK1505	6 = Cod-KK1506
7 = Cod-KK1507	8 = Cod-KK1510	9 = Cod-KK1511	10 = Cod-KK1512	11 = Cod-KK1513	12 = Cod-KK1514
13 = Cod-KK1515	14 = Cod-KK1522	15 = Cod-KK1523	16 = Cod-KK1524	17 = Cod-KK1517	18 = Cod-KK1519
19 = Cod-KK1529	20 = Cod-KK1533	21 = Cod-MK1311	22 = Cod-MK1319	23 = Cod-Loei1301	24 = Cod-NN1302



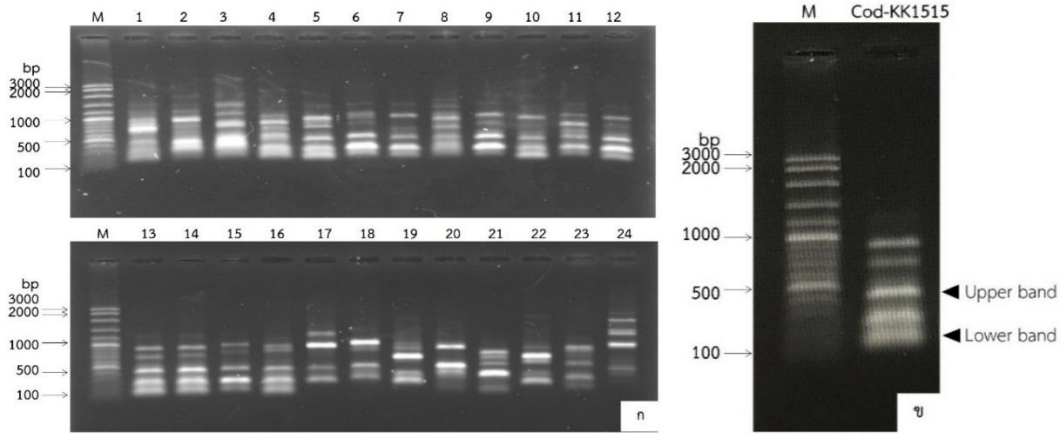
ภาพที่ 30 ลักษณะแถบดีเอ็นเอของเชื้อรา *O. sobolifera* แต่ละไอโซเลทจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพร์เมอร์ OPT17 โดยเทคนิค RAPD (ก) ภายใต้สภาวะอุณหภูมิ annealing ที่ 36°C และ (ข) ภายใต้สภาวะอุณหภูมิ annealing ที่ 38°C

M = 100 bp plus DNA ladder

1 = Cod-NB1302	2 = Cod-KK1501	3 = Cod-KK1502	4 = Cod-KK1503	5 = Cod-KK1505	6 = Cod-KK1506
7 = Cod-KK1507	8 = Cod-KK1510	9 = Cod-KK1511	10 = Cod-KK1512	11 = Cod-KK1513	12 = Cod-KK1514
13 = Cod-KK1515	14 = Cod-KK1522	15 = Cod-KK1523	16 = Cod-KK1524	17 = Cod-KK1517	18 = Cod-KK1519
19 = Cod-KK1529	20 = Cod-KK1533	21 = Cod-MK1311	22 = Cod-MK1319	23 = Cod-Loei1301	24 = Cod-NN1302

4.6.2 การออกแบบเครื่องหมาย DNA สำหรับระบุชนิดเชื้อรา *O. sobolifera*

เมื่อนำไพรเมอร์ OPT13 มาเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของเชื้อรา *O. sobolifera* แล้วตัดแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างที่สามารถนำไปออกแบบเครื่องหมายโมเลกุล RAPD-SCAR marker จำนวน 2 แถบ คือ (1) แถบดีเอ็นเอขนาด 153 bp ซึ่งพบปรากฏเฉพาะเชื้อราในกลุ่ม *O. sobolifera* ที่จัดเป็นกลุ่ม active isolate (กลุ่มที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียดีที่สุด) เรียกแถบดีเอ็นเอที่คัดเลือกนี้ว่า “Lower band” และ (2) แถบดีเอ็นเอขนาด 373 bp ซึ่งพบเฉพาะในกลุ่มเชื้อรา *O. sobolifera* ซึ่งไม่พบในเชื้อราชนิดอื่นที่เจริญบนตัวอ่อนจักจั่น เรียกแถบดีเอ็นเอที่คัดเลือกนี้ว่า “Upper band” (ภาพที่ 31) จึงทำการโคลนชิ้นดีเอ็นเอ upper band และ lower band เข้าสู่พลาสมิด *E.coli* JM109 เพื่อวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์และออกแบบเพื่อสังเคราะห์ RAPD-SCAR primer ในการระบุชนิดของเชื้อรา *O. sobolifera*



ภาพที่ 31 แถบดีเอ็นเอจากการเพิ่มปริมาณจีโนมิกดีเอ็นเอของเชื้อรา *O. sobolifera* ด้วยวิธี RAPD (ก) แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ OPT-13 กลุ่ม active (เลน 1- 16) กลุ่ม non-active (เลน 17- 20) เชื้อราอื่นๆ ที่พบบนตัวอ่อนจักจั่น (เลน 21- 23) และ (ข) แถบดีเอ็นเอที่คัดเลือกเพื่อใช้ออกแบบเครื่องหมายโมเลกุล

M = 100 bp plus DNA ladder

1 = Cod-NB1302 2 = Cod-KK1501 3 = Cod-KK1502 4 = Cod-KK1503

5 = Cod-KK1505 6 = Cod-KK1506 7 = Cod-KK1507 8 = Cod-KK1510

9 = Cod-KK1511 10 = Cod-KK1512 11 = Cod-KK1513 12 = Cod-KK1514

13 = Cod-KK1515 14 = Cod-KK1522 15 = Cod-KK1523 16 = Cod-KK1524

17 = Cod-KK1517 18 = Cod-KK1519 19 = Cod-KK1529 20 = Cod-KK1533

21 = Cod-MK1311 22 = Cod-MK1319 23 = Cod-Loei1301 24 = Cod-NN1302

จากผลการโคลนยีนของเชื้อรา *O. sobolifera* ไอโซเลท Cod-KK1515 เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในการใช้ออกแบบเครื่องหมายโมเลกุลชนิด RAPD-SCAR marker สำหรับการระบุชนิดของเชื้อรา *O. sobolifera* พบว่าสามารถทำการออกแบบและสังเคราะห์ไพรเมอร์ได้ทั้งหมด 4 คู่ ได้แก่ ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อชิ้นดีเอ็นเอชนิด Upper band ประกอบด้วยไพรเมอร์จำนวน 2 คู่ คือ ไพรเมอร์ SpsoU_f01/SpsoU_r01 และ ไพรเมอร์ SpsoU_f02/SpsoU_r01 ส่วนไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อชิ้นดีเอ็นเอชนิด Lower band มีจำนวน 2 คู่ ได้แก่ ไพรเมอร์ SpsoL_f01/SpsoL_r01 และไพรเมอร์ SpsoL_f01/SpsoL_r02 ซึ่งมีลำดับเบสดังข้อมูลในตารางที่ 15

ตารางที่ 15 รายละเอียด RAPD-SCAR primer ที่ออกแบบขึ้นจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อรา *O. sobolifera* ไอโซเลท Cod-KK1515

ไพรเมอร์		ลำดับเบส (5′→3′)	ขนาดของ Amplicon size	ค่า Tm
1	SpsoU_f01	CCGCTCACAATTCCACACAAC	183 bp	55.9
	SpsoU_r01	AATACGCAAACCGCCTCTCC		
2	SpsoU_f02	AATTCCACACAACATACGAGCC	175 bp	55.4
	SpsoU_r01	AATACGCAAACCGCCTCTCC		
3	SpsoL_f01	GATTAGGACTGCCATTGGATAC	118 bp	53.8
	SpsoL_r01	CATTGCGTTGAAGAGGGAG		
4	SpsoL_f01	GATTAGGACTGCCATTGGATAC	116 bp	53.8
	SpsoL_r02	TTGCGTTGAAGAGGGAGAG		

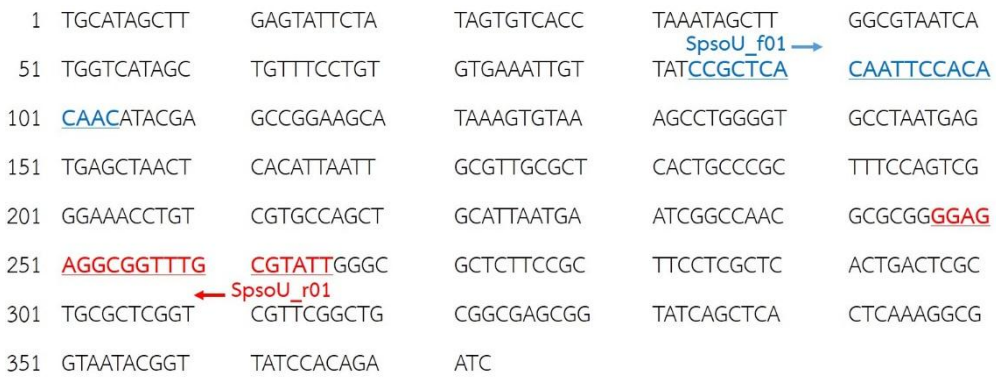
โดยไพรเมอร์แต่ละคู่มีบริเวณที่จับกับดีเอ็นเอเป้าหมายของเชื้อรา *O. sobolifera* ไอโซเลท Cod-KK1515 ของไพรเมอร์แต่ละคู่ ดังนี้

1) ไพรเมอร์คู่ที่ 1 คือ SpsoU_f01/ SpsoU_r01 ออกแบบมาจากลำดับเบสของ upper band เข้าจับที่ตำแหน่งเบสที่ 83-266 ได้ขนาด PCR product เท่ากับ 183 bp (ภาพที่ 32)

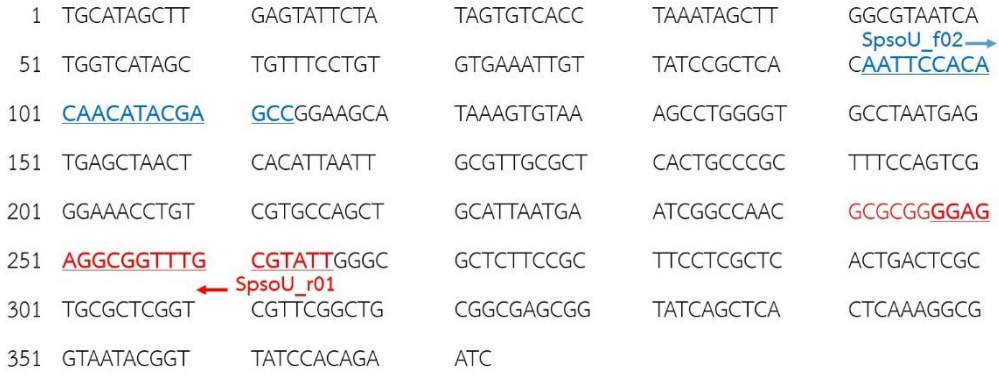
2) ไพรเมอร์คู่ที่ 2 คือ SpsoU_f02/ SpsoU_r01 ออกแบบมาจากลำดับเบสของ upper band เข้าจับที่ตำแหน่งเบสที่ 91-266 ได้ขนาด PCR product เท่ากับ 175 bp (ภาพที่ 33)

3) ไพรเมอร์คู่ที่ 3 คือ SpsoL_f01/ SpsoL_r01 ออกแบบมาจากลำดับเบสของ lower band เข้าจับที่ตำแหน่งเบสที่ 2-119 ได้ขนาด PCR product เท่ากับ 118 bp (ภาพที่ 34)

4) ไพรเมอร์คู่ที่ 4 คือ SpsoL_f01/ SpsoL_r02 ออกแบบมาจากลำดับเบสของ lower band เข้าจับที่ตำแหน่งเบสที่ 2-117 ได้ขนาด PCR product เท่ากับ 116 bp (ภาพที่ 35)



ภาพที่ 32 ตำแหน่งการจับของไพร์เมอร์ RAPD-SCAR ชนิด SpsoU_f01/ SpsoU_r01 บนลำดับเบสของเชื้อรา *O. sobolifera* ไอโซเลท Cod-KK1515 จากตำแหน่งปลาย 5´→3´ (PCR product=183 bp) เมื่ออักษรสีน้ำเงินตัวหนาขีดเส้นใต้ คือ ไพรเมอร์ SpsoU_f01 (forward primer) และอักษรสีแดงตัวหนาขีดเส้นใต้ คือ ไพรเมอร์ SpsoU_r01 (reverse primer)



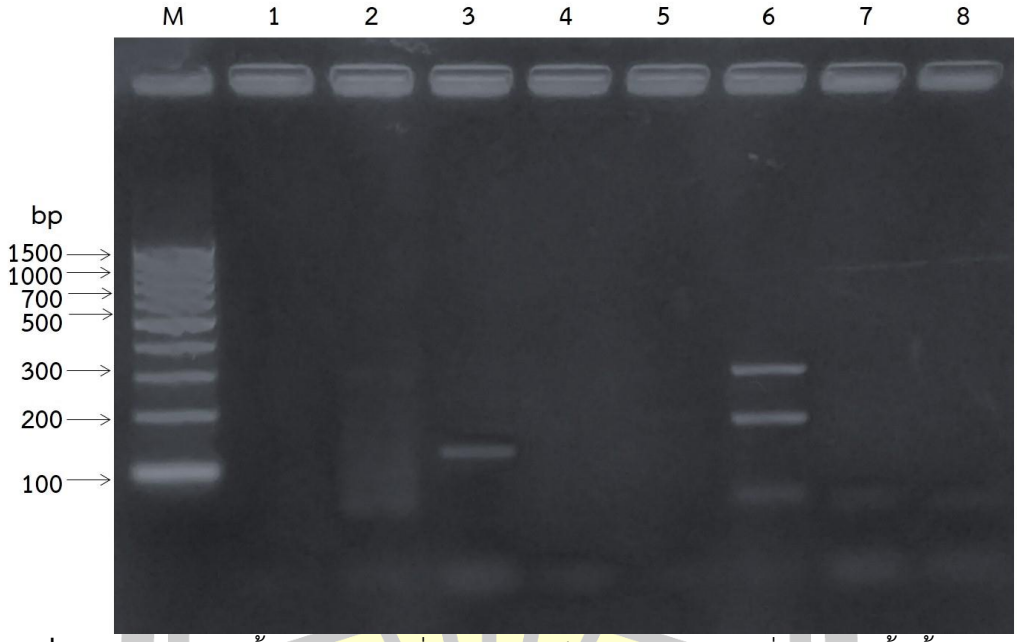
ภาพที่ 33 ตำแหน่งการจับของไพร์เมอร์ RAPD-SCAR ชนิด SpsoU_f02/ SpsoU_r01 บนลำดับเบสของเชื้อรา O. sobolifera ไอโซเลท Cod-KK1515 จากตำแหน่งปลาย 5´→3´ (PCR product=175 bp) เมื่ออักษรสีน้ำเงินตัวหนาขีดเส้นใต้ คือ ไพรเมอร์ SpsoU_f02 (forward primer) และอักษรสีแดงตัวหนาขีดเส้นใต้ คือ ไพรเมอร์ SpsoU_r01 (reverse primer)

ภาพที่ 34 ตำแหน่งการจับของไพร์เมอร์ RAPD-SCAR ชนิด SpsoL_f01/ SpsoL_r01 บนลำดับเบสของเชื้อรา *O. sobolifera* ไอโซเลท Cod-KK1515 จากตำแหน่งปลาย 5´→3´ (PCR product=118 bp) เมื่ออักษรสีน้ำเงินตัวหนาขีดเส้นใต้ คือ ไพรเมอร์ SpsoL_f01 (forward primer) และอักษรสีแดงตัวหนาขีดเส้นใต้ คือ ไพรเมอร์ SpsoL_r01 (reverse primer)

ภาพที่ 35 ตำแหน่งการจับของไพร์เมอร์ RAPD-SCAR ชนิด SpsoL_f01/ SpsoL_r02 บนลำดับเบสของเชื้อรา *O. sobolifera* ไอโซเลท Cod-KK1515 จากตำแหน่งปลาย 5´→3´ (PCR product=116 bp) เมื่ออักษรสีน้ำเงินตัวหนาขีดเส้นใต้ คือ ไพรเมอร์ SpsoL_f01 (forward primer) และอักษรสีแดงตัวหนาขีดเส้นใต้ คือ ไพรเมอร์ SpsoL_r02 (reverse primer)

เมื่อพิจารณาค่า Tm ของไพรเมอร์แต่ละชนิดในตารางที่ 15 พบว่า มีค่า Tm อยู่ในช่วงระหว่างอุณหภูมิ 53-55°C จึงได้ทำการทดสอบเบื้องต้นในการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อรา *O. sobolifera* ไอโซเลท Cod-KK1515 ของไพรเมอร์ทั้ง 4 คู่ โดยเลือกอุณหภูมิในขั้นตอน annealing เท่ากับ 50°C ภายใต้สภาวะกำหนดด้วยเทคนิค PCR ดังนี้ เติม genomic DNA (50 ng) ปริมาตร 2 µl, 10x Taq buffer ปริมาตร 2.5 µl, 25 mM $MgCl_2$ ปริมาตร 2.5 µl, 2.5 mM dNTPs ปริมาตร 2.5 µl, 10mM forward primer ปริมาตร 2 µl, 10mM reverse primer ปริมาตร 2 µl, sterile distill water ปริมาตร 13.25 µl และ 5U/µl *Taq* polymerase (Invitrogen, Australia) ปริมาตร 0.25 µl ผสมสารดังกล่าวในปริมาตรรวม 25 µl ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอภายใต้สภาวะที่กำหนด คือ ขั้นตอนที่ 1: อุณหภูมิ 95°C นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบ ขั้นตอนที่ 2: อุณหภูมิ 95°C นาน 1 นาที อุณหภูมิ 50°C นาน 1 นาที และอุณหภูมิ 72°C นาน 2

นาที จำนวน 35 รอบ และขั้นตอนที่ 3: อุณหภูมิ 72°C นาน 10 นาที จำนวน 1 รอบ ด้วยเครื่อง Thermal cycler (Veriti 96-well Thermal cycler, Applied Biosystems, USA) และทำการตรวจสอบขนาดแถบดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 1% พบว่าที่อุณหภูมิ annealing เท่ากับ 50°C ไพรเมอร์ RAPD-SCAR marker ที่ออกแบบได้ทั้ง 4 คู่ มีเพียงไพรเมอร์ชนิด SpsoL_f01/SpsoL_r01 ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อราทดสอบได้ต่อไป โดยทำให้เกิดขนาดของ PCR product ที่เกิดขึ้น มีขนาดแถบดีเอ็นเอประมาณ 118 bp (ภาพที่ 36) ดังนั้นจึงเลือกใช้ไพรเมอร์ชนิด SpsoL_f01/SpsoL_r01 ในการทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุล RAPD-SCAR marker ที่ถูกออกแบบเพื่อใช้ในการระบุชนิดของเชื้อรา *O. sobolifera*



ภาพที่ 36 การทดสอบเบื้องต้นในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไพร์เมอร์ที่ออกแบบขึ้นทั้ง 4 คู่ โดยทดสอบเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อรา *O. sobolifera* ไอโซเลท Cod-KK1515 ด้วยเทคนิค RAPD-SCAR

M = 100 bp DNA ladder

1 = SpsoU_f01/SpsoU_r01 5 = negative ของ SpsoU_f01/SpsoU_r01

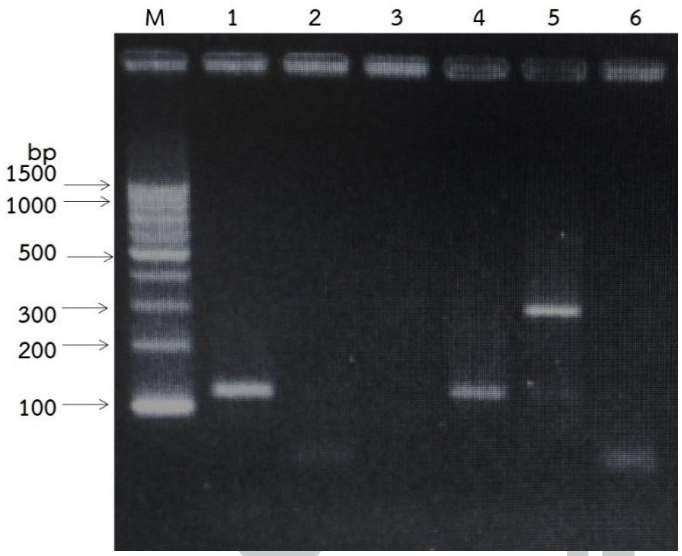
2 = SpsoU_f02/SpsoU_r01 6 = negative ของ SpsoU_f02/SpsoU_r01

3 = SpsoL_f01/SpsoL_r01 7 = negative ของ SpsoL_f01/SpsoL_r01

4 = SpsoL_f01/SpsoL_r02 8 = negative ของ SpsoL_f01/SpsoL_r02

4.7 การทดสอบความจำเพาะของเครื่องหมายโมเลกุล RAPD-SCAR ที่ออกแบบขึ้น (specificity of primer)

เมื่อนำเครื่องหมายโมเลกุล RAPD-SCAR marker สำหรับเชื้อรา *O. sobolifera* ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้คือ ไพรเมอร์ SpsoL_f01/SpsoL_r01 มาทดสอบความจำเพาะต่อเชื้อรา *O. sobolifera* ด้วยวิธีการ PCR ภายใต้สภาวะที่กำหนด และทำการตรวจสอบขนาดแถบดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 1% พบว่า ที่อุณหภูมิ annealing เท่ากับ 50°C ไพรเมอร์ชนิด SpsoL_f01/SpsoL_r01 สามารถเพิ่มจำนวนแถบดีเอ็นเอของเชื้อรา *O. sobolifera* ไอโซเลท Cod-KK1515 ได้ โดยทำให้เกิดขนาดของ PCR product ที่เกิดขึ้นเพียงแถบเดียวที่มีขนาดประมาณ 118 bp (ภาพที่ 37 เลนที่ 1) โดยไม่เกิดแถบดีเอ็นเอกับเชื้อชนิดอื่นที่ทดสอบ ยกเว้น *Ophiocordyceps longissima* (*O. longissima*) ไอโซเลท Cod-Loei 1301 (ภาพที่ 37 เลนที่ 4) และไอโซเลท Cod-NN1302 ที่ถูกระบุชนิดเป็น *Metacordyceps* sp. (ภาพที่ 37 เลนที่ 5) พบแถบดีเอ็นเอ 1 แถบเช่นเดียวกันแต่มีขนาดแตกต่างจากขนาดของแถบดีเอ็นเอที่พบในเชื้อรา *O. sobolifera* ในขณะที่เชื้อราแมลงที่พบบนตัวอ่อนจักจั่นสปีชีส์อื่นที่ไม่ใช่เชื้อราสกุล *Ophiocordyceps* ได้แก่ ไอโซเลท Cod-MK1311 ที่ถูกระบุชนิดเป็น *Simplicilium* sp. และ Cod-MK1319 ที่ถูกระบุชนิดเป็น *Polycephalomyces nipponicus* (*P. nipponicus*) ไม่พบแถบดีเอ็นเอดังกล่าวจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อราด้วยไพร์เมอร์ดังกล่าว (ภาพที่ 37 เลนที่ 2 และ 3 ตามลำดับ)



ภาพที่ 37 การทดสอบความจำเพาะของเครื่องหมายโมเลกุล RAPD-SCAR ชนิด SpsoL_f01/SpsoL_r01 ที่ออกแบบขึ้นสำหรับระบุชนิดเชื้อรา *O. sobolifera*

M = 100 bp DNA ladder

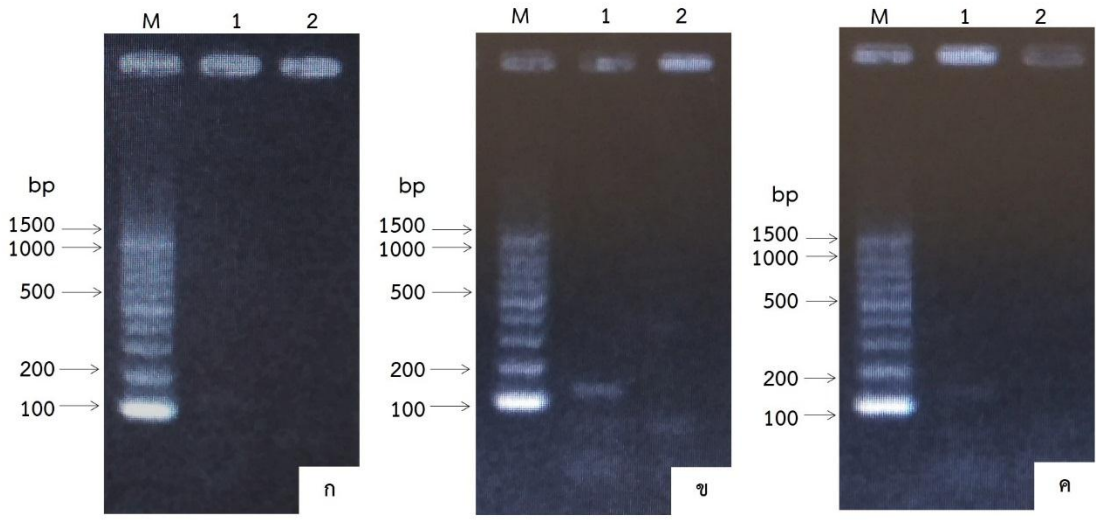
1 = Cod-KK1515 2 = Cod-MK1311 3 = Cod-MK1319

4 = Cod-Loei 1301 5 = Cod-NN1302 6 = negative

4.8 การหาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่องหมายโมเลกุล RAPD-SCAR ที่ออกแบบขึ้น (validation of primer)

4.8.1 การหาสภาวะอุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสม

เมื่อทดสอบสภาวะอุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสมต่อไพรเมอร์ที่ถูกออกแบบขึ้น โดยปรับช่วงอุณหภูมิ annealing ที่ 3 ระดับ คือ 48, 50 และ 52°C พบว่า ช่วงอุณหภูมิ annealing ที่สามารถทำให้ไพรเมอร์ SpsoL_f01/SpsoL_r01 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อรา *O. sobolifera* ได้คือ อุณหภูมิ 50°C และ 52°C โดยที่อุณหภูมิ 52°C พบแถบดีเอ็นเอจางกว่าที่อุณหภูมิ 50°C (ภาพที่ 38) ดังนั้น อุณหภูมิ annealing ที่ 50°C จึงเป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา PCR ในการใช้สำหรับระบุชนิดของเชื้อรา *O. sobolifera*



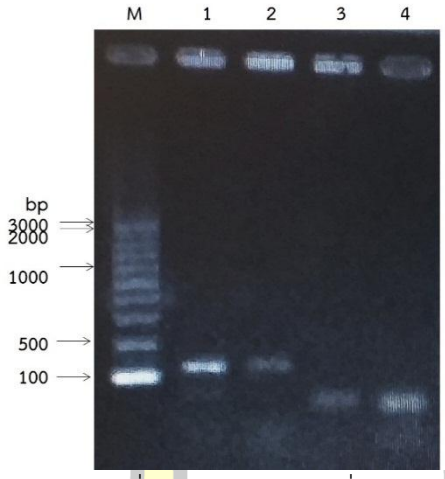
ภาพที่ 38 การทดสอบช่วงอุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อรา *O. sobolifera* ไอโซเลท Cod-KK1515 ด้วยเครื่องหมาย RAPD-SCAR ที่ออกแบบขึ้น (ก) อุณหภูมิ annealing ที่ 48°C (ข) อุณหภูมิ annealing ที่ 50°C และ (ค) อุณหภูมิ annealing ที่ 52°C

M = 100 bp DNA ladder 1 = SpsoL_f01/SpsoL_r01

2 = negative ของ SpsoL_f01/SpsoL_r01

4.8.2 การหาปริมาณไพร์เมอร์ที่เหมาะสม

เมื่อทดสอบปริมาณไพรเมอร์ที่เหมาะสมของไพรเมอร์ชนิด SpsoL_f01/SpsoL_r01 ต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเชื้อรา *O. sobolifera* ไอโซเลท Cod-KK1515 โดยปรับปริมาณความเข้มข้นของไพรเมอร์ให้มีความเหมาะสมที่ระดับความเข้มข้น 10 mM และ 20 mM ของไพรเมอร์ พบว่าไพรเมอร์ SpsoL_f01/SpsoL_r01 ที่ปริมาณ 10 mM (1 μl ของไพรเมอร์) และ 20 mM (2 μl ของไพรเมอร์) สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อราทดสอบได้ที่ซึ่งพบ PCR product ที่เกิดขึ้นมีขนาดแถบดีเอ็นเอประมาณ 118 bp โดยเมื่อเปรียบเทียบขนาดแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นพบว่า ที่ความเข้มข้น 10 mM ของปริมาณไพรเมอร์มีความเข้มมากกว่าระดับความเข้มข้น 20 mM นอกจากนี้ยังพบปริมาณไพรเมอร์ที่เหลือจากการทำปฏิกิริยาในปริมาณที่น้อยกว่า ดังนั้นปริมาณไพรเมอร์ที่เหมาะสมที่สุดในการใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อรา *O. sobolifera* ไอโซเลท Cod-KK1515 คือที่ระดับปริมาณ 10 mM ของไพรเมอร์ (ภาพที่ 39)



ภาพที่ 39 การทดสอบหาปริมาณไพร์เมอร์ที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อรา *O. sobolifera* ไอโซเลท Cod-KK1515 ด้วยเครื่องหมาย RAPD-SCAR ที่ออกแบบขึ้น

M = 100 bp DNA ladder

1 = 10 mM (1 µl ของไพรเมอร์) ของ SpsoU_f01/SpsoU_r01

2 = 20 mM (2 µl ของไพรเมอร์) ของ SpsoU_f02/SpsoU_r01

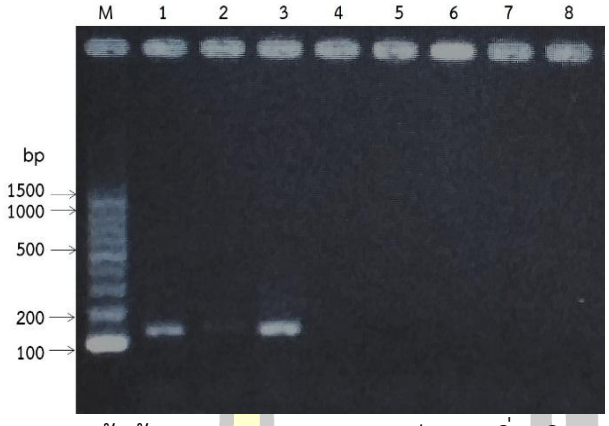
3 = negative ของ 10 mM (1 µl ของไพรเมอร์) ของ SpsoU_f01/SpsoU_r01

4 = negative ของ 20 mM (2 µl ของไพรเมอร์) ของ SpsoU_f02/SpsoU_r01

4.8.3 การทดสอบหาปริมาณความเข้มข้นของแมกนีเซียยมคลอไรด์ ($MgCl_2$) ที่เหมาะสม

เมื่อทดสอบปริมาณแมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) ที่เหมาะสมของไพรเมอร์ชนิด SpsoL_f01/SpsoL_r01 ต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเชื้อรา *O. sobolifera* ไอโซเลท Cod-KK1515 โดยปรับปริมาณความเข้มข้นของของ $MgCl_2$ ได้แก่ 1 mM 2mM 2.5 mM และ 3 mM $MgCl_2$ พบว่า ที่ระดับความเข้มข้นของ $MgCl_2$ เท่ากับ 2.5 mM $MgCl_2$ เป็นปริมาณที่เหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยา PCR เพิ่มปริมาณทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 118 bp ตามที่ต้องการ ขณะที่ความเข้มข้นอื่นไม่สามารถเพิ่มปริมาณแถบดีเอ็นเอขนาด 118 bp ได้ (ภาพที่ 40)

พหุน ปณ ฑิโต ชีเว



ภาพที่ 40 การหาปริมาณความเข้มข้นของ $MgCl_2$ เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อรา *O. sobolifera* ไอโซเลท Cod-KK1515 ด้วยเครื่องหมาย RAPD-SCAR ชนิด SpsoL_f01/SpsoL_r01

M = 100 bp DNA ladder

1 = 1 mM $MgCl_2$ 2 = 2 mM $MgCl_2$

3 = 2.5 mM $MgCl_2$ 4 = 3 mM $MgCl_2$

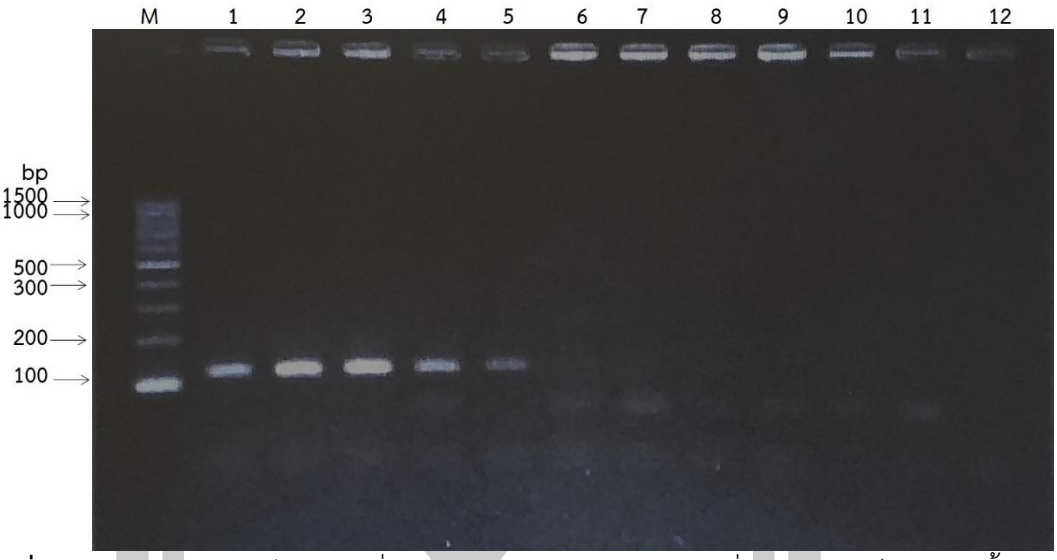
5 = negative ของ 1 mM $MgCl_2$ 6 = negative ของ 2 mM $MgCl_2$

7 = negative ของ 2.5 mM $MgCl_2$ 8 = negative ของ 3 mM $MgCl_2$

ดังนั้นจากผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของในการนำเครื่องหมายโมเลกุล RAPD-SCAR marker มาใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและระบุชนิดของเชื้อรา *O. sobolifera* คือ การใช้ไพรเมอร์ที่ SpsoL_f01/SpsoL_r01 ภายใต้สภาวะอุณหภูมิ annealing ที่ 50°C และในปฏิกิริยาต้องเติมไพรเมอร์ forward และ reverse ปริมาณ 10 mM และปริมาณ $MgCl_2$ ความเข้มข้น 2.5 mM

4.9 การทดสอบความไวของเครื่องหมายโมเลกุล RAPD-SCAR ที่ออกแบบขึ้น (sensitivity of primer)

เมื่อทำการทดสอบความไวของไพรเมอร์ชนิด SpsoL_f01/SpsoL_r01 ในการตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อรา *O. sobolifera* ไอโซเลท Cod-KK1515 ที่ โดยการเจือจางความเข้มข้นของดีเอ็นเอเชื้อทดสอบในแต่ละระดับ (5.84 pg - 58.4 ng) พบว่า ไพรเมอร์ SpsoL_f01/SpsoL_r01 สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อรา *O. sobolifera* ได้ตั้งแต่ระดับความเข้มข้นของดีเอ็นเอในหน่วยนาโนกรัม (ng) จนถึงระดับพิโคกรัม (pg) ได้ โดยปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อรา *O. sobolifera* ต่ำสุดที่ไพรเมอร์ชนิดนี้สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้เท่ากับ 5.84 พิโคกรัม (ภาพที่ 41)



ภาพที่ 41 การทดสอบความไวของเครื่องหมาย RAPD-SCAR ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อรา *O. sobolifera* ไอโซเลท Cod-KK1515 ที่ระดับความเจือจางต่างๆ

M = 100 bp DNA ladder

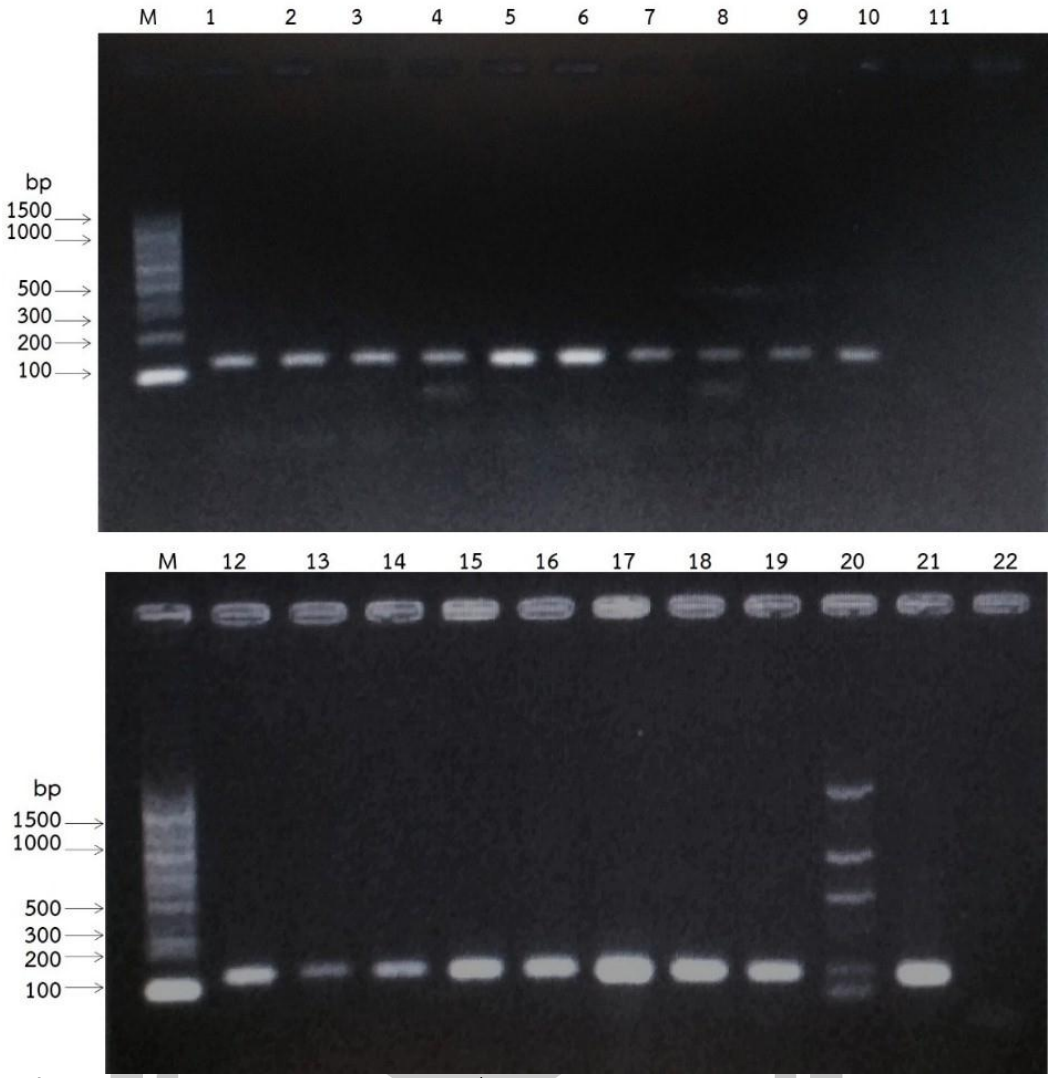
1 = Cod-KK1515 (58.4 µg)	2 = Cod-KK1515 (5.84 µg)
3 = Cod-KK1515 (0.584 µg)	4 = Cod-KK1515 (0.0584 µg)
5 = Cod-KK1515 (5.84 pg)	6 = Cod-KK1515 (0.584 pg)
7 = Cod-KK1515 (0.0584 pg)	8 = Cod-KK1515 (5.84 fg)
9 = Cod-KK1515 (0.584 fg)	10 = Cod-KK1515 (0.0584 fg)
11 = Cod-KK1515 (0.00584 fg)	12 = negative

4.10 การนำเครื่องหมายโมเลกุล RAPD-SCAR ที่ออกแบบขึ้นไปใช้ในการระบุชนิดเชื้อรา *O. sobolifera*

จากผลการออกแบบเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับเชื้อรา *O. sobolifera* ด้วยวิธี RAPD-SCAR แล้วจึงนำมาประยุกต์ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเส้นใยของเชื้อรา *O. sobolifera* ที่ทำการศึกษาทั้งหมดทุกไอโซเลทด้วยวิธี PCR ด้วยไพรเมอร์ SpsoL_r01/ SpsoL_f01 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ดังนี้ เติม genomic DNA (50 ng) ปริมาตร 2 µl, 10x Taq buffer ปริมาตร 2.5 µl, 25 mM $MgCl_2$ ปริมาตร 2.5 µl, 2.5 mM dNTPs ปริมาตร 2.5 µl, 10mM forward primer (SpsoL_f01) ปริมาตร 1 µl, 10mM reverse primer (SpsoL_r01) ปริมาตร 1 µl, sterile distill water ปริมาตร 13.25 µl และ 5U/µl *Taq* polymerase (Invitrogen, Australia) ปริมาตร 0.25 µl ผสมสารดังกล่าวในปริมาตรรวม 25 µl ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอภายใต้สภาวะที่กำหนด คือ

ขั้นตอนที่ 1: อุณหภูมิ 95°C นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบ ขั้นตอนที่ 2: อุณหภูมิ 95°C นาน 1 นาที อุณหภูมิช่วง annealing ที่ 50°C นาน 1 นาที และอุณหภูมิ 72°C นาน 2 นาที จำนวน 35 รอบ และขั้นตอนที่ 3: อุณหภูมิ 72°C นาน 10 นาที จำนวน 1 รอบ ด้วยเครื่อง Thermal cycler (Veriti 96-well Thermal cycler, Applied Biosystems, USA) พบว่าเครื่องหมายโมเลกุล RAPD-SCAR marker ที่ถูกออกแบบขึ้นสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายจากเส้นใยของเชื้อราชนิด *O. sobolifera* ได้ทุกไอโซเลท ซึ่งให้ขนาดของแถบดีเอ็นเอมีขนาดประมาณ 118 bp (ภาพที่ 42)

พหูน ปณ ฑิโต ชีเว



ภาพที่ 42 การทดสอบประสิทธิภาพการนำเครื่องหมายโมเลกุล RAPD-SCAR marker ที่ถูกออกแบบขึ้นไปใช้ในการระบุชนิดเชื้อรา *O. sobolifera*

M = 100 bp DNA ladder

1 = Cod-NB1302	2 = Cod-KK1501	3 = Cod-KK1502
4 = Cod-KK1503	5 = Cod-KK1505	6 = Cod-KK1506
7 = Cod-KK1507	8 = Cod-KK1510	9 = Cod-KK1512
10 = Cod-KK1513	11 = negative	12 = Cod-KK1513
13 = Cod-KK1514	14 = Cod-KK1515	15 = Cod-KK1522
16 = Cod-KK1523	17 = Cod-KK1524	18 = Cod-KK1517
19 = Cod-KK1519	20 = Cod-KK1529	21 = Cod-KK1533

22 = negative

พหุปณฑิต ชีว

บทที่ 5
อภิปราย สรุป และข้อเสนอแนะ

5.1 อภิปรายผลการทดลอง

5.1.1. การคัดแยกเชื้อราและการระบุชนิดของเชื้อรา *O. sobolifera*

เชื้อราแมลงที่พบทำลายตัวอ่อนจักจั่นจากที่มีการรายงาน ส่วนใหญ่พบในประเทศในแถบเอเชีย แอฟริกา อเมริกาใต้ ซึ่งพบเป็นเชื้อราในกลุ่ม *Ophiocordyceps* sp. (*O. sobolifera O. longgissima* และ *O. yakusinensis*) *Metarhizium* sp. *Polycephalomyces nipponicus Cordyceps polycephala* และ*Tolypocladium paradoxum* เป็นต้น (B Shrestha et al., 2017) ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้เก็บตัวอย่างตัวอ่อนจักจั่นที่ถูกเชื้อราแมลงเข้าทำลายที่เก็บตัวอย่างมาจากพื้นที่จังหวัดขอนแก่น นำมาทำการแยกเชื้อราและระบุชนิดด้วยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนยีน Internal transcribed spacer (ITS) สามารถระบุชนิดได้เป็นเชื้อรา *O. sobolifera* ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับเชื้อรา *O. sobolifera* ไอโซเลท Cod-NB1302 (KT281884.1) (เปอร์เซนต์ความเหมือนระหว่าง 90-99%) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Jaihan et al (2016) และมีจำนวน 2 ไอโซเลท ที่ถูกระบุชนิดเป็นเชื้อราชนิดอื่นที่ไม่ใช่เชื้อรา *O. sobolifera* ได้แก่ (1) ไอโซเลท Cod-KK1533 มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับเชื้อรา *Beauveria* sp. ATT050 (HQ607818.1) (เปอร์เซนต์ความเหมือนเท่ากับ 100%) ซึ่งถือเป็นระยะ anamorph ของเชื้อราในสกุล *Ophiocordyceps* sp. และ (2) ไอโซเลท Cod-KK1545 ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับเชื้อรา *Simplicillium obclavatum* strain SO2 (KC403970.1) (เปอร์เซนต์ความเหมือนระหว่าง 92%) ดังนั้นจากผลการศึกษาครั้งนี้จึงสามารถระบุชนิดของเชื้อรา *O.sobolifera* ได้ด้วยยีน ITS เนื่องจากยีน ITS มีความจำเพาะในแต่ละสปีชส์ และบอกความแปรผันในระหว่างสปีชีส์ จึงสามารถนำมาใช้ในการระบุชนิดของเชื้อราในการศึกษาครั้งนี้ได้ (Y.-Q. Chen, et al., 2001) (Liang et al., 2008)

5.1.2 ลักษณะสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อรา *O. sobolifera* บนอาหารสูตรสังเคราะห์

เมื่อนำตัวอย่างของเชื้อรา *O. sobolifera* มาศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกและภายในพบว่า เชื้อราดังกล่าวมีโครงสร้างที่พบเป็นลักษณะเด่นคือ สโตรมาพบงอกออกมาจากบริเวณส่วนหัวของโฮสต์ส่วนใหญ่พบ 1 อัน ยกเว้นบางไอโซเลทมีมากกว่า 1 ซึ่งอาจเกิดจากความแปรผันของลักษณะสัณฐานวิทยาที่พบในเชื้อรา *O. sobolifera* ที่พบในแต่ละไอโซเลทมีความแตกต่างกัน ซึ่ง สโตรมามีรูปร่างทรงกระบองยาว (cylindric) ส่วนปลายพองออกเป็นกระเปาะที่มีรูปร่างค่อนข้างกลม (subglobose) มีสีน้ำตาลอมชมพู มีผิวสัมผัสขรุขระคล้ายเม็ดทรายละเอียด และพบเส้นใยของเชื้อรามีสีขาวเจริญปกคลุมทั่วตัวอ่อนของจักจั่น เมื่อศึกษาโครงสร้างภายใน พบส่วนเพอริทีเชียมี

รูปร่างคล้ายรูปคนโทหรือรูปไข่หรือคล้ายหยดน้ำ ฝังตัวอยู่ภายในสโตรมาทั้งหมด (immersed perithecia) ภายในเพอริทีเชียมีถุงหุ้มสปอร์ รูปร่างทรงกระบอกยาว ใสไม่มีสี มีผนังชั้นเดียว (unitunicate) ภายในมีแอสโคสปอร์บรรจุอยู่ และบริเวณส่วนปลายของถุงหุ้มสปอร์ มีช่องเปิดรูปร่างคล้ายหมวกปิด เมื่อมีการแตกหักของแอสโคสปอร์จะพบเป็นท่อนสั้นๆ เซลล์เดียว (part-spore) ทำการศึกษาลักษณะเส้นใยโคโลนีที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อพบเส้นใยแบบมีผนังกั้น (septae hypha) และมีโคนิเดียรูปร่างรีคล้ายเม็ดข้าวสาร ซึ่งสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *O. sobolifera* ที่พบในครั้งนี้มีลักษณะสอดคล้องกับการรายงานของ Kobayasi & Shimizu (1963) และของ Imtiaj & Ohga (2014) ที่ได้มีการรายงานลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *O. sobolifera* ที่พบในตัวอย่างเชื้อราจากประเทศเกาหลี และการรายงานของ Sangdee et al (2017) ที่ได้รายงานความแปรผันของลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราแมลงชนิด *P. nipponicus* ที่แยกได้จากภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ซึ่งพบความแตกต่างในส่วนสโตรมาของเชื้อรา โดยพบสโตรมาของเชื้อรางอกจากบริเวณส่วนหัวของตัวอ่อนจักจั่น (host) มีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของโฮสต์ สายพันธุ์ของเชื้อรา สภาพแวดล้อมและบริเวณที่พบตัวอย่างเชื้อรา

นอกจากลักษณะสัณฐานวิทยาที่มีความแตกต่างกันในแต่ละไอโซเลท ยังพบลักษณะของโคโลนีของเชื้อรา *O. sobolifera* ที่เจริญบนอาหารสูตรสังเคราะห์มีลักษณะที่แตกต่างกัน พบว่าโคโลนีเชื้อราส่วนใหญ่มีสีชมพู อัดแน่นคล้ายกำมะหยี่ เจริญช้า เมื่อแก่จะพบการสร้าง spore mass สีน้ำตาล บริเวณกึ่งกลางโคโลนี แต่บางไอโซเลทมีโคโลนีสีชมพูหรือสีขาว แต่ไม่พบการสร้าง spore mass ซึ่งความแตกต่างของลักษณะโคโลนีในแต่ละไอโซเลทบนอาหารสูตรสังเคราะห์ของเชื้อรา *O. sobolifera* นี้ขึ้นกับสายพันธุ์ของเชื้อรา และความสามารถในการเจริญของเชื้อราแต่ละไอโซเลทบนสูตรอาหารสังเคราะห์ ซึ่งความแตกต่างของลักษณะสัณฐานวิทยาของตัวอย่างเชื้อราที่ศึกษาดังกล่าวนี้มีความสอดคล้องกับการรายงานของ Sangdee et al (2017) ที่รายงานลักษณะความแตกต่างของโคโลนีของเชื้อรา *P. nipponicus* ที่เจริญบนสูตรอาหารสังเคราะห์มีความแตกต่างกัน ทำให้สามารถแยกเชื้อราดังกล่าวออกเป็นแต่ละกลุ่มได้ตามลักษณะความแปรผันที่เกิดขึ้น

5.1.3 การศึกษาคุณสมบัติการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากเชื้อรา *O. sobolifera*

จากการศึกษาคุณสมบัติการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากเชื้อรา *O. sobolifera* ที่คัดแยกได้จากตัวอ่อนจักจั่น พบว่าสารสกัดเส้นใยเชื้อรา *O. sobolifera* ในกลุ่ม active และกลุ่ม non-active ให้ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่แตกต่างกัน โดยสารสกัดในกลุ่ม active สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคสายพันธุ์มาตรฐานและสายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากผู้ป่วยในเบื้องต้นได้ โดยสามารถยับยั้งได้ทั้งในแบคทีเรียกลุ่มแกรมบวกและแกรมลบ โดยไอโซเลทที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ดีที่สุด คือ *O. sobolifera* ไอโซเลท Cod-NB1302 โดยสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* สายพันธุ์ดื้อยา (MRSA), *S. aureus* สายพันธุ์ไวต่อยา (MSSA) และ *B. cereus* ในขณะที่

ยาปฏิชีวนะที่ใช้เป็นชุดควบคุมโดยเฉพาะยา ciprofloxacin ไม่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มดื้อยาได้กล่าวได้ ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ และ ImtiaJ & Lee (2007) ที่รายงานพบว่าสารสกัดจากเส้นใยของเชื้อรา *C. sobolifera* สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* และการรายงานผลการศึกษาของ Sangdee et al (2018) ที่พบว่าสารสกัดจากเส้นใยเชื้อรา *O. sobolifera* ที่คัดแยกได้ในประเทศไทย สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบได้ นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับการรายงานของ Thammawat et al (2017) ที่รายงานการศึกษาผลของสารสกัดจากเชื้อรา *P. nipponicus* ไอโซเลท Cod-MK1201 ที่แยกได้จากตัวอ่อนจักจั่น สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ได้ทั้งสายพันธุ์ที่ไว (MSSA) และดื้อต่อยา (MRSA) แต่สิ่งที่น่าสนใจจากผลการศึกษาคือสารสกัดจากเชื้อรา *O. sobolifera* สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกมากกว่าแกรมลบ ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากความแตกต่างของโครงสร้างส่วนผนังเซลล์ชั้นนอกของแบคทีเรียแกรมลบที่มีผลต่อการแพร่ของสารเข้าสู่เซลล์ จึงมีผลทำให้สารออกฤทธิ์เข้าทำลายแบคทีเรียแกรมลบได้น้อย จึงมีผลการยับยั้งแกรมบวกมากกว่าแกรมลบ (Denyer, Hodges, & Gorman, 2008) ซึ่งกลไกในการยับยั้งยังจำเป็นต้องศึกษาต่อไป เพื่อทราบกลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราของสารสกัด

เมื่อทำการแยกขนาดและศึกษาชนิดของโปรตีนที่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียจากสารสกัดโปรตีนจากเชื้อรา *O. sobolifera* แสดงให้เห็นว่า แถบโปรตีนที่มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่ม active และ non-active ขนาด 30 kDa มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนในเอนไซม์ superoxide dismutase -1 (SOD1) ที่พบในเชื้อรา *Sordaria fimicola* isolate SFECSOD1-N6 (KM282180.1) (เท่ากับ 80%) *C. militaris* (AY822477.1) (เท่ากับ 66%) และเชื้อราชนิดอื่นๆ (ระหว่าง 65-79%) ซึ่งพบว่าเอนไซม์ superoxide dismutase -1 (SOD1) เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทในการป้องกันการเกิดภาวะ oxidative stress เพื่อสลายอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นและป้องกันตนเองจากภาวะเสียสมดุล โดยเอนไซม์ SOD1 จะทำหน้าที่เปลี่ยน O_2• (O_2 ในสภาวะอนุมูลอิสระ) ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ที่เข้ารวมกับโมเลกุลของ H_2O เกิดเป็น H_2O_2 สำหรับ H_2O_2 ที่เกิดขึ้นนี้จะถูกกำจัดต่อด้วยเอนไซม์ catalase ให้สลายกลายเป็น H_2O และ O_2 ในภาวะปกติ (Rosen & Klebanoff, 1979) ส่วนกลไกของโปรตีน SOD1 ที่แยกได้จากของโปรตีนจากเชื้อรา *O. sobolifera* ในกลุ่ม active isolate ในครั้งนี้ที่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียยังไม่ทราบแน่ชัด ยังจำเป็นต้องศึกษาต่อไป

5.1.4 การออกแบบเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับระบุชนิดของเชื้อรา *O. sobolifera* ด้วยวิธี RAPD

จากการศึกษาออกแบบเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับระบุชนิดของเชื้อรา *O. sobolifera* ด้วยวิธี RAPD ชี้ให้เห็นว่า ไพรเมอร์ OPT13 สามารถเพิ่มจำนวน genomic DNA ของเชื้อรา *O. sobolifera* ไอโซเลท Cod-KK1515 ได้ดีที่สุด โดยให้แถบดีเอ็นเอที่เป็นโพลิมอฟิซึม (polymorphism) มากที่สุด ที่แตกต่างระหว่างกลุ่ม active isolate และ non-active isolate

รวมทั้งเชื้อรากลุ่มอื่นที่พบเจริญบนตัวอ่อนของจักจั่น โดยมีแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างที่สามารถนำไปออกแบบเครื่องหมายโมเลกุล RAPD-SCAR marker จำนวน 2 แถบ คือ (1) แถบดีเอ็นเอขนาด 153 bp (lower band) และ (2) แถบดีเอ็นเอขนาด 373 bp (upper band) จึงนำแถบดีเอ็นเอทั้งสองไปใช้ในการออกแบบเพื่อสังเคราะห์เครื่องหมาย RAPD-SCAR สำหรับใช้ในการระบุชนิดของเชื้อรา *O. sobolifera* ซึ่งผลจากการออกแบบและทดสอบไพรเมอร์ แสดงให้เห็นว่ามีเพียงไพรเมอร์ SpsoL_f01/SpsoL_r01 ที่ออกแบบขึ้นสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่พบเฉพาะในเชื้อรา *O. sobolifera* ได้ โดยทำให้เกิดขนาดของ PCR product เพียงแถบเดียวที่มีขนาดประมาณ 118 bp โดยไม่พบขนาดและแถบของดีเอ็นเอดังกล่าวในการตรวจหาจากเชื้อราชนิดอื่น ยกเว้นเชื้อรา *O. longissima* ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Lam et al (2015) ที่ได้พัฒนาออกแบบเครื่องหมายโมเลกุลชนิด RAPD-SCAR marker เพื่อใช้ในการระบุชนิดเชื้อรา *C. sinensis* พบว่า สามารถระบุชนิดของเชื้อรา *C. sinensis* ได้โดยอาศัยลำดับเบสในส่วนยีน ITS และพัฒนาออกแบบ RAPD-SCAR marker จากเทคนิค RAPD สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อรา *C. sinensis* ได้ โดยมีไพรเมอร์ที่ออกแบบขึ้นมีความจำเพาะต่อเชื้อราชนิดเชื้อรา *C. sinensis* ได้ จากการออกแบบเครื่องหมาย RAPD-SCAR ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ยังพบว่า เครื่องหมาย RAPD-SCAR ที่ได้สามารถแยกชนิดระหว่าง *O. sobolifera* กับ *O. longissima* ได้ในเบื้องต้น ซึ่งเครื่องหมายดังกล่าวให้แถบที่จำเพาะต่อ *O. sobolifera* ในขณะที่ *O. longissima* ให้แถบที่ไม่เท่ากัน ซึ่งอาจเป็นผลจากลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกของเชื้อราทั้งสองชนิดมีความคล้ายคลึงกัน โดยเมื่อเปรียบเทียบลักษณะโครงสร้างสัณฐานวิทยาภายนอกระหว่างเชื้อรา *O. sobolifera* กับ *O. longissima* พบว่า เชื้อรา *O. sobolifera* จะมีสโตรมาโผล่พ้นจากบริเวณส่วนหัวของโฮสต์สามารถพบ 1-3 อัน สโตรมารูปทรงกระบองส่วนปลายพองออกเป็นกระเปาะรูปร่างค่อนข้างกลม ความยาวเฉลี่ย 3-8 เซนติเมตร มีสีน้ำตาลอมชมพู และพบส่วน fertile part อยู่บริเวณกึ่งกลางของสโตรมา ในขณะที่ *O. longissima* มีสโตรมาโผล่จากบริเวณส่วนหัวและด้านหลังของโฮสต์ พบสโตรมา 1-5 อันหรือมากกว่านั้น สโตรมามีลักษณะรูปทรงกระบองเรียวยาวเช่นเดียวกันแต่มีความยาวมากกว่าโดยมีความยาวเฉลี่ย 5-20 เซนติเมตร มีสีน้ำตาลเข้มถึงดำ และส่วน fertile part มักไม่พบหรือไม่ค่อยเด่นชัด (Sung, et al., 2011) ดังนั้นจากการทดลองหากต้องการเพิ่มประสิทธิภาพของ RAPD-SCAR marker ที่ได้เพื่อใช้ในการระบุชนิดของเชื้อรา *O. sobolifera* อาจจำเป็นต้องอาศัยการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกร่วมด้วย ได้แก่ ลักษณะของโฮสต์ ลักษณะส่วนสโตรมา และโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อแยกเชื้อรา *O. sobolifera* ออกจาก *O. longissima*

อย่างไรก็ตามจากการศึกษาครั้งนี้จึงช่วยยืนยันได้ว่าการเทคนิค RAPD ในการออกแบบเครื่องหมายโมเลกุลสามารถทำได้ และสามารถใช้ตรวจหาชนิดของเชื้อรา *O. sobolifera* ได้ โดยไม่

ทำให้เกิด non-specific และสามารถตรวจหาปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อราได้ในระดับต่ำ (พิโคกรัม: pg) ซึ่งเป็นต้นแบบในการใช้ออกแบบเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับใช้ตรวจเชื้อราชนิดอื่นๆ ได้

5.2 สรุปผลการทดลอง

จากผลการศึกษาในครั้งนี้สามารถสรุปผลการทดลองเกี่ยวกับสัณฐานวิทยา คุณสมบัติการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับระบุเชื้อรา *O. sobolifera* ดังนี้

5.2.1 จากผลการศึกษาตัวอย่างตัวอ่อนจักจั่นที่ถูกเชื้อราแมลงเข้าทำลายจำนวนทั้งหมดที่เก็บมาจากพื้นที่จังหวัดขอนแก่น (KK isolate) สามารถแยกและระบุชนิดเป็นเชื้อรา *O. sobolifera* จำนวน 42 ไอโซเลท โดยอาศัยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนยีน ITS ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับ *O. sobolifera* ไอโซเลท Cod-NB1302 (KT281884.1) ที่มีการรายงานมาก่อนในฐานข้อมูล GenBank (เปอร์เซนต์ความเหมือนระหว่าง 90-99%) และมีจำนวน 2 ไอโซเลทที่ถูกระบุชนิดเป็นเชื้อราชนิดอื่นที่ไม่ใช่เชื้อรา *O. sobolifera*

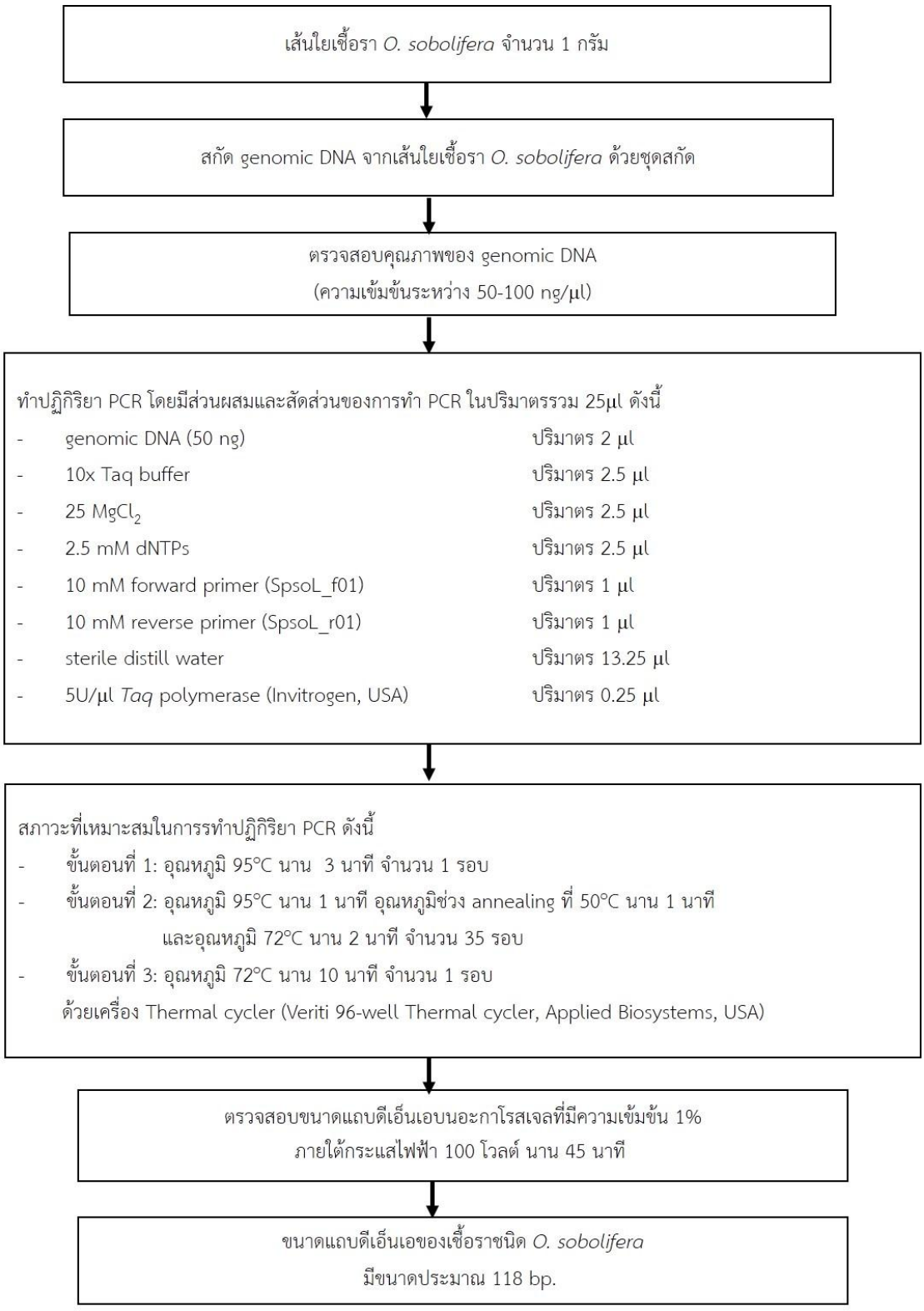
5.2.2 จากผลการศึกษาสัณฐานวิทยาภายนอกและภายในของเชื้อรา *O. sobolifera* พบตัวอย่างเชื้อรามีลักษณะแปรผันขึ้นกับไอโซเลทของเชื้อ โดยลักษณะเด่นของเชื้อราชนิดนี้พบส่วนสโตรมาออกมาจากบริเวณส่วนหัวของโฮสต์ในกลุ่มจักจั่น โดยสามารถพบ 1-3 อัน มีรูปร่างทรงกระบองยาว (cylindric) ส่วนปลายพองออกเป็นกระเปาะรูปร่างค่อนข้างกลม (subglobose) มีสีน้ำตาลอมชมพู พบเส้นใยของเชื้อรามีสีขาวเจริญปกคลุมทั่วตัวอ่อนของจักจั่น ภายในสโตรมาพบเพอริทีเชียรูปร่างคล้ายรูปคนโทหรือคล้ายหยดน้ำ ฝังตัวอยู่ภายในสโตรมาทั้งหมด ด้านบนของโครงสร้างเพอริทีเซียมีช่องเปิดสำหรับปล่อยสปอร์ ภายในเพอริทีเชียมีถุงหุ้มสปอร์รูปร่างทรงกระบอกยาว ใสไม่มีสี มีผนังชั้นเดียว ภายในมีแอสโคสปอร์บรรจุอยู่ และพบการหักออกของสปอร์เป็นท่อนสั้นๆ เซลล์เดียว (part-spore) บรรจุอยู่ภายในถุงแอสคัส ขณะที่สามารถพบสปอร์ในระยะที่ไม่อาศัยเพศ มีลักษณะมีรูปร่างรีคล้ายเม็ดข้าวสาร ภายในสปอร์มีผนังกั้นสปอร์แบบตามขวาง และพบเส้นใยเชื้อราแบบมีผนังกั้น

5.2.3 เมื่อศึกษาลักษณะของเส้นใยเชื้อรา *O. sobolifera* ที่เจริญบนอาหารสูตรสังเคราะห์พบลักษณะโคโลนีของเชื้อราที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อมีความแตกต่างกัน 4 แบบ คือ (1) โคโลนีสีชมพู อัดแน่นคล้ายกำมะหยี่ และพบการสร้าง spore mass สีน้ำตาลบริเวณกึ่งกลางโคโลนี (2) โคโลนีมีสีชมพู ฟู กระจาย และไม่พบการสร้าง spore mass (3) โคโลนีสีขาว ฟู หนาแน่นและกระจาย และไม่พบการสร้าง spore mass และ (4) โคโลนีสีขาว ฟู บางและไม่กระจาย และไม่พบการสร้าง spore mass

5.2.4 จากผลการศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดเส้นใยเชื้อรา *O. sobolifera* สามารถแบ่งกลุ่มได้เป็นกลุ่มที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค (active isolate) ที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และกลุ่ม (non-active isolate) ที่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย โดยสารสกัดจากเชื้อรายับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก และแบคทีเรียแกรมลบ โดยมีค่า MIC และ MBC ค่อนข้างต่ำ (MIC อยู่ในช่วงระหว่าง 0.781-12.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ MBC อยู่ในช่วงระหว่าง 0.312-25.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ) ซึ่งสารสกัดที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อได้ดีที่สุด คือ สารสกัดจากเชื้อรา *O. sobolifera* ไอโซเลท Cod-NB1302 และเมื่อนำโปรตีนจากเชื้อรามาวิเคราะห์ด้วยวิธี SDS-PAGE พบความแตกต่างระหว่างแถบโปรตีนของเชื้อรา *O. sobolifera* ซึ่งพบแถบโปรตีนขนาด 30 kDa (เฉพาะในกลุ่มเชื้อที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย) และมีลำดับกรดอะมิโนความคล้ายคลึงกับเอนไซม์ superoxide dismutase -1 (SOD1) (เท่ากับ 80 เปอร์เซ็นต์)

5.2.5 จากการออกแบบเครื่องหมายโมเลกุลด้วยเทคนิค RAPD-SCAR พบว่าไพรเมอร์ OPT13 ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่อเชื้อรา *O. sobolifera* โดยให้แถบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะจำนวน 2 ขนาด คือ (1) แถบดีเอ็นเอขนาด 153 bp (lower band) และ (2) แถบดีเอ็นเอขนาด 373 bp (upper band) สำหรับนำมาออกแบบพัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรม โดยวิธีการดังนี้

พหูน ปณ ฑิโต ชีเว


เส้นใยเชื้อรา O. sobolifera จำนวน 1 กรัม
สกัด genomic DNA จากเส้นใยเชื้อรา O. sobolifera ด้วยชุดสกัด
ตรวจสอบคุณภาพของ genomic DNA
(ความเข้มข้นระหว่าง 50-100 ng/µl)
ทำปฏิกิริยา PCR โดยมีส่วนผสมและสัดส่วนของการทำ PCR ในปริมาตรรวม 25µl ดังนี้
- genomic DNA (50 ng) ปริมาตร 2 µl
- 10x Taq buffer ปริมาตร 2.5 µl
- 25 MgCl2 ปริมาตร 2.5 µl
- 2.5 mM dNTPs ปริมาตร 2.5 µl
- 10 mM forward primer (SpsoL_f01) ปริมาตร 1 µl
- 10 mM reverse primer (SpsoL_r01) ปริมาตร 1 µl
- sterile distill water ปริมาตร 13.25 µl
- 5U/µl Taq polymerase (Invitrogen, USA) ปริมาตร 0.25 µl
สภาวะที่เหมาะสมในการรทำปฏิกิริยา PCR ดังนี้
- ขั้นตอนที่ 1: อุณหภูมิ 95°C นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบ
- ขั้นตอนที่ 2: อุณหภูมิ 95°C นาน 1 นาที อุณหภูมิช่วง annealing ที่ 50°C นาน 1 นาที
และอุณหภูมิ 72°C นาน 2 นาที จำนวน 35 รอบ
- ขั้นตอนที่ 3: อุณหภูมิ 72°C นาน 10 นาที จำนวน 1 รอบ
ด้วยเครื่อง Thermal cycler (Veriti 96-well Thermal cycler, Applied Biosystems, USA)
ตรวจสอบขนาดแถบดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 1%
ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 45 นาที
ขนาดแถบดีเอ็นเอของเชื้อราชนิด O. sobolifera
มีขนาดประมาณ 118 bp.

5.3 ข้อเสนอแนะ

5.3.1 ขั้นตอนการหาสภาวะที่เหมาะสมของไพรเมอร์ RAPD-SCAR ที่ถูกออกแบบขึ้น ยังทำการหาสภาวะขององค์ประกอบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อทดสอบ ควรทดลองปรับเพิ่มปริมาณของ DNA template และปริมาณของ *Taq* polymerase เพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะสมของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไพรเมอร์ที่ออกแบบขึ้น

5.3.2 ขั้นตอนการนำไพรเมอร์ที่ถูกออกแบบขึ้นไปใช้ประโยชน์ (application) ควรทดลองนำไปใช้กับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ได้จากส่วนสโตรมาของเชื้อรา *O. sobolifera* และเชื้อราแมลงชนิดอื่นๆ

พหูน ปณ ฑิโต ชีเว

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

Araújo, J. P. M., Evans, H. C., Geiser, D. M., Mackay, W. P., & Hughes, D. P. (2015). Unravelling the diversity behind the *Ophiocordyceps unilateralis* (Ophiocordycipitaceae) complex: Three new species of zombie-ant fungi from the Brazilian Amazon. *Phytotaxa, 220*(3), 224-238.

Artjariyasripong, S., Mitchell, J. I., Hywel-Jones, N. L., & 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*(6), 503-517.

Avise, J. C. (2012). *Molecular markers, natural history and evolution*: Springer Science & Business Media.

Buenz, E., Bauer, B., Osmundson, T., & Motley, T. (2005). The traditional Chinese medicine *Cordyceps sinensis* and its effects on apoptotic homeostasis. *Journal of Ethnopharmacology, 96*(1-2), 19-29.

Chan, W.-H., Ling, K.-H., Chiu, S.-W., Shaw, P.-C., & But, P. P.-H. (2011). Molecular Analyses of *Cordyceps gunnii* in China. *Journal of Food & Drug Analysis, 19*(1).

Chen, C.-S., Hseu, R.-S., & Huang, C.-T. (2011). Quality control of *Cordyceps sinensis* teleomorph, anamorph, and its products. *Quality Control of Herbal Medicines and Related Areas*: InTech.

Chen, Y.-Q., Wang, N., Qu, L.-H., Li, T.-H., & Zhang, W.-M. (2001). Determination of the anamorph of *Cordyceps sinensis* inferred from the analysis of the ribosomal DNA internal transcribed spacers and 5.8 S rDNA. *Biochemical Systematics and Ecology, 29*(6), 597-607.

Chen, Y., Zhang, Y.-P., Yang, Y., & Yang, D. (1999). Genetic diversity and taxonomic implication of *Cordyceps sinensis* as revealed by RAPD markers. *Biochemical Genetics, 37*(5-6), 201-213.

Cheng, D., Ding, Z., Lin, M., Pan, P., & Chen, Y. (2006). Isolation and fermentation culture of fungi from *Cordyceps soofifera*. *Zhong yao cai= Zhongyaocai= Journal of Chinese Medicinal Materials, 29*(2), 99-101.

บรรณานุกรม (ต่อ)

Cheng, K.-T., Su, C.-H., Chang, H.-C., & Huang, J.-Y. (1998). Differentiation of genuines and counterfeits of *Cordyceps* species using random amplified polymorphic DNA. *Planta Medica, 64*(05), 451-453.

Chiu, C.-H., Chyau, C.-C., Chen, C.-C., Lin, C.-H., Cheng, C.-H., & Mong, M.-C. (2014). Polysaccharide extract of *Cordyceps sobolifera* attenuates renal injury in endotoxemic rats. *Food and Chemical Toxicology, 69*, 281-288.

Chung, C., Niemela, S. L., & Miller, R. H. (1989). One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 86*(7), 2172-2175.

Clarkson, J. M., & Charnley, A. K. (1996). New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. *Trends in Microbiology, 4*(5), 197-203.

Denyer, S. P., Hodges, N. A., & Gorman, S. P. (2008). *Hugo and Russell's Pharmaceutical Microbiology*: John Wiley & Sons.

Fujita, T., Inoue, K., Yamamoto, S., Ikumoto, T., Sasaki, S., Toyama, R., & Okumoto, T. (1994). Fungal metabolites. Part 11. A potent immunosuppressive activity found in *Isaria sinclairii* metabolite. *The Journal of Antibiotics, 47*(2), 208-215.

Holliday, J. C., & Cleaver, M. P. (2008). Medicinal value of the caterpillar fungi species of the genus *Cordyceps* (Fr.) Link (Ascomycetes). A review. *International Journal of Medicinal Mushrooms, 10*(3).

Huang, L., Li, Q., Chen, Y., Wang, X., & Zhou, X. (2009). Determination and analysis of cordycepin and adenosine in the products of *Cordyceps* spp. *African Journal of Microbiology Research, 3*(12), 957-961.

Hywel-Jones, N. (1995). Notes on *Cordyceps* nutans and its anamorph, a pathogen of hemipteran bugs in Thailand. *Mycological Research, 99*(6), 724-726.

Hywel-Jones, N. L. (1994). *Cordyceps khaoyaiensis* and *C. pseudomilitaris*, two new pathogens of lepidopteran larvae from Thailand. *Mycological Research, 98*(8), 939-942.

บรรณานุกรม (ต่อ)

Hywel-Jones, N. L. (1996). *Cordyceps myrmecophila*-like fungi infecting ants in the leaf litter of tropical forest in Thailand. *Mycological Research, 100*(5), 613-619.

Imtiaj, A., & Lee, T.-S. (2007). Screening of antibacterial and antifungal activities from Korean wild mushrooms. *World Journal of Agricultural Sciences, 3*(3), 316-321.

Jaihan, P., Sangdee, K., & Sangdee, A. (2016). Selection of entomopathogenic fungus for biological control of chili anthracnose disease caused by *Colletotrichum* spp. *European Journal of Plant Pathology, 146*(3), 551-564.

Jaihan, P., Sangdee, K., & Sangdee, A. (2018). Disease suppressive activity of extracts from entomopathogenic fungus *Ophiocordyceps sobolifera* against chili anthracnose fungi *Colletotrichum* spp. in a pot experiment. *Journal of General Plant Pathology, 84*, 237-242.

Jang, S.-H., Kim, S.-H., Lee, H.-Y., Jang, S.-H., Jang, H., Chae, S.-W., & Sin, H.-S. (2015). Immune-modulating activity of extract prepared from mycelial culture of Chinese caterpillar mushroom, *Ophiocordyceps sinensis* (Ascomycetes). *International Journal of Medicinal Mushrooms, 17*, 1189-1199.

Jianshan, C. (2007). Application of ITS Sequences in Fungi Classification and Identification. *Journal of Anhui Agricultural Sciences, 35*(13), 3785.

Johansen, T. (1979). Utilization of adenosine triphosphate in rat mast cells during histamine release induced by the ionophore A23187. *British Journal of Pharmacology, 65*(1), 103-109.

Kepler, R., Ban, S., Nakagiri, A., Bischoff, J., Hywel-Jones, N., Owensby, C. A., & Spatafora, J. W. (2013). The phylogenetic placement of hypocrealean insect pathogens in the genus *Polycephalomyces*: an application of One Fungus One Name. *Fungal Biology, 117*(9), 611-622.

Kiho, T., Nagai, K., Miyamoto, I., Watanabe, T., & Ukai, S. (1990). Polysaccharides in fungi. XXV. Biological activities of two galactomannans from the insect-body portion of Chan hua (fungus: *Cordyceps cicadae*). *Yakugaku zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan, 110*(4), 286-288.

บรรณานุกรม (ต่อ)

Kobayasi, Y. (1981). Revision of the genus *Cordyceps* and its allies 1. *Bulletin of the National Science Museum, Tokyo, Series B, 7*, 1-13.

Kobayasi, Y. (1982). Keys to the taxa of the genera *Cordyceps* and *Torrubiella*. *Transaction of the Mycological Society of Japan*.

Kobmoo, N., Mongkolsamrit, S., Wutikhun, T., Tasanathai, K., Khonsanit, A., Thanakitpipattana, D., & Luangsa-Ard, J. J. (2015). New species of *Ophiocordyceps unilateralis*, an ubiquitous pathogen of ants from Thailand. *Fungal Biology, 119*(1), 44-52.

Korzun, V. (2002). Use of molecular markers in cereal breeding. *Cellular and Molecular Biology Letters, 7*(2B), 811-820.

Kuo, H.-C., Su, Y.-L., Yang, H.-L., & Chen, T.-Y. (2005). Identification of Chinese medicinal fungus *Cordyceps sinensis* by PCR-single-stranded conformation polymorphism and phylogenetic relationship. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53*(10), 3963-3968.

Kuo, Y., Weng, S., Chou, C., Chang, T., & Tsai, W. (2003). Activation and proliferation signals in primary human T lymphocytes inhibited by ergosterol peroxide isolated from *Cordyceps cicadae*. *British Journal of Pharmacology, 140*(5), 895-906.

Lam, K., Chan, G., Xin, G.-Z., Xu, H., Ku, C.-F., Chen, J.-P., & Tsim, K. (2015). Authentication of *Cordyceps sinensis* by DNA analyses: Comparison of ITS sequence analysis and RAPD-derived molecular markers. *Molecules, 20*(12), 22454-22462.

Liang, H.-H., Cheng, Z., Yang, X.-L., Li, S., Ding, Z.-Q., Zhou, T.-S., & Chen, J.-K. (2008). Genetic diversity and structure of *Cordyceps sinensis* populations from extensive geographical regions in China as revealed by inter-simple sequence repeat markers. *The Journal of Microbiology, 46*(5), 549-556.

บรรณานุกรม (ต่อ)

Lin, Q.-Y., Long, L.-K., Zhuang, Z.-H., Wu, L.-L., Wu, S.-L., & Zhang, W.-M. (2018). Antioxidant activity of water extract from fermented mycelia of *Cordyceps sobolifera* (Ascomycetes) in caenorhabditis elegans. *International Journal of Medicinal Mushrooms, 20*(1).

Liu, H., Li, T., Zhao, Y., Zhang, J., & Wang, Y. (2011). Determination of some metabolites of *Cordyceps sobolifera*. *African Journal of Microbiology Research, 5*(30), 5518-5522.

Liu, Z., Liang, Z., Whalley, A., Liu, A., & Yao, Y. (2001). A new species of *Beauveria*, the anamorph of *Cordyceps sobolifera*. *Fungal Diversity, 7*, 61-70.

Lu, J., Gu, G., Hao, L., Jin, Z., & Wang, X. (2016). Characterization and In vitro Antioxidant Activity of a Polysaccharide from *Cordyceps sobolifera*. *Journal of Food Processing and Preservation, 40*(3), 447-452.

Luangsa-ard, J., Tasanathai, K., Mongkolsamrit, S., & Hywel-Jones, N. (2007). Atlas of Invertebrate-Pathogenic Fungi of Thailand, vol. 1. *National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, National Science and Technology Development Agency, Pathum Thani, Thailand*.

Luangsa-Ard, J. J., Ridkaew, R., Tasanathai, K., Thanakitpipattana, D., & Hywel-Jones, N. (2011). *Ophiocordyceps halabalaensis*: a new species of *Ophiocordyceps* pathogenic to *Camponotus gigas* in Hala Bala Wildlife Sanctuary, Southern Thailand. *Fungal Biology, 115*(7), 608-614.

Luangsa-ard, J. J., Tasanathai, K., Mongkolsamrit, S., & Hywel-Jones, N. (2009). Atlas of Invertebrate-Pathogenic Fungi of Thailand (Volume 2).

Miyake, Y., Kozutsumi, Y., Nakamura, S., Fujita, T., & Kawasaki, T. (1995). Serine palmitoyltransferase is the primary target of a sphingosine-like immunosuppressant, ISP-1/myriocin. *Biochemical and Biophysical Research Communications, 211*(2), 396-403.

บรรณานุกรม (ต่อ)

Mongkolsamrit, S., Kobmoo, N., Tasanathai, K., Khonsanit, A., Noisripoom, W., Srikitikulchai, P., & Luangsa-Ard, J. (2012). Life cycle, host range and temporal variation of *Ophiocordyceps unilateralis/Hirsutella formicarum* on *Formicine* ants. *Journal of Invertebrate Pathology, 111*(3), 217-224.

Mongkolsamrit, S., Luangsa-Ard, J., Tasanathai, K., & Sivichai, S. (2010). Invertebrate-Pathogenic Fungi of Thailand. *National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, National Science and Technology Development Agency, Pathum Thani, Thailand*.

Mueller, U. G., & Wolfenbarger, L. L. (1999). AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends in Ecology & Evolution, 14*(10), 389-394.

Nilsson, R. H., Kristiansson, E., Ryberg, M., Hallenberg, N., & Larsson, K.-H. (2008). Intraspecific ITS variability in the kingdom Fungi as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification. *Evolutionary Bioinformatics, 4*, EBO. S653.

Rasmussen, H. B. (2012). Restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified fragments (PCR-RFLP) and gel electrophoresis-valuable tool for genotyping and genetic fingerprinting. In S. Magdeldin (Ed.), *Gel Electrophoresis-Principles and Basics* (pp. 314-334): InTechopen.

Rathor, R., Mishra, K. P., Pal, M., Vats, P., Kirar, V., Negi, P. S., & Misra, K. (2014). Scientific validation of the Chinese caterpillar medicinal mushroom, *Ophiocordyceps sinensis* (Ascomycetes) from India: immunomodulatory and antioxidant activity. *International Journal of Medicinal Mushrooms, 16*(6).

Ren, S.-Y., & Yao, Y.-J. (2013). Evaluation of nutritional and physical stress conditions during vegetative growth on conidial production and germination in *Ophiocordyceps sinensis*. *FEMS Microbiology Letters, 346*(1), 29-35.

Rosen, H., & Klebanoff, S. J. (1979). Bactericidal activity of a superoxide anion-generating system. A model for the polymorphonuclear leukocyte. *Journal of Experimental Medicine, 149*(1), 27-39.

บรรณานุกรม (ต่อ)

Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*: Cold spring harbor laboratory press.

Sangdee, A., & Sangdee, K. (2013). Isolation, identification, culture and production of adenosine and cordycepin from cicada larva infected with entomopathogenic fungi in Thailand. *African Journal of Microbiology Research, 7*(2), 137-146.

Sangdee, A., Sangdee, K., Buranrat, B., & Thammawat, S. (2018). Effects of mycelial extract and crude protein of the medicinal mushroom, *Ophiocordyceps sobolifera*, on the pathogenic fungus, *Candida albicans*. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 17*(12), 2449-2454.

Sangdee, A., Sangdee, K., Seephonkai, P., Jaihan, P., & Kanyaphum, T. (2017). Colony characteristics, nucleoside analog profiles, and genetic variations of medicinal fungus *Polycephalomyces nipponicus* (Ascomycetes) isolates from northeast Thailand. *International Journal of Medicinal Mushrooms, 19*(5), 445-455.

Sangdee, K., Buranrat, B., Jaihan, P., Thongchai, S., & Sangdee, A. (2018). Evaluation of antibacterial and anticancer activities of the medicinal fungus *Ophiocordyceps sobolifera* (Ascomycetes) from Thailand. *International Journal of Medicinal Mushrooms, 20*(5), 471-484.

Sangdee, K., Nakbanpote, W., & Sangdee, A. (2015). Isolation of the entomopathogenic fungal strain Cod-MK1201 from a cicada nymph and assessment of its antibacterial activities. *International Journal of Medicinal Mushrooms, 17*(1), 51-63.

Shrestha, B., & Sung, J.-M. (2005). Notes on *Cordyceps* species collected from the central region of Nepal. *Mycobiology, 33*(4), 235-239.

Shrestha, B., Tanaka, E., Hyun, M., Han, J., Kim, C., Jo, J., & Sung, G. (2017). Mycosphere Essay 19. *Cordyceps* species parasitizing hymenopteran and hemipteran insects. *Mycosphere, 8*(9), 1424-1442.

บรรณานุกรม (ต่อ)

Spatafora, J. W., Quandt, C. A., Kepler, R. M., Sung, G.-H., Shrestha, B., Hywel-Jones, N. L., & Luangsa-ard, J. J. (2015). New 1F1N species combinations in Ophiocordycipitaceae (Hypocreales). *IMA fungus, 6*(2), 357-362.

Sung, G.-H., Hywel-Jones, N. L., Sung, J.-M., Luangsa-ard, J. J., Shrestha, B., & Spatafora, J. W. (2007). Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. *Studies in Mycology, 57*, 5-59.

Sung, G.-H., Shrestha, B., Han, S.-K., & Sung, J.-M. (2011). Growth and cultural characteristics of *Ophiocordyceps longissima* collected in Korea. *Mycobiology, 39*(2), 85-91.

Sung, G.-H., Sung, J.-M., Hywel-Jones, N. L., & Spatafora, J. W. (2007). A multi-gene phylogeny of Clavicipitaceae (Ascomycota, Fungi): Identification of localized incongruence using a combinational bootstrap approach. *Molecular Phylogenetics and Evolution, 44*(3), 1204-1223.

Takano, F., Yahagi, N., Yahagi, R., Takada, S., Yamaguchi, M., Shoda, S., & Ohta, T. (2005). The liquid culture filtrates of *Paecilomyces tenuipes* (Peck) Samson (= I*saria japonica* Yasuda) and *Paecilomyces cicadae* (Miquel) Samson (= *Isaria sinclairii* (Berk.) Llond) regulate Th1 and Th2 cytokine response in murine Peyer's patch cells in vitro and ex vivo. *International Immunopharmacology, 5*(5), 903-916.

Tasanathai, K., Luangsa-ard, J., Mongkolsamrit, S., & Hywel-Jones, N. (2010). Atlas of invertebrate-pathogenic fungi of Thailand. . *National Center for Genetic Engineering and Biotechnology*, *75*.

Thammawat, S., Sangdee, K., & Sangdee, A. (2017). Time-kill profiles and cell-surface morphological effects of crude *Polycephalomyces nipponicus* Cod-MK1201 mycelial extract against antibiotic-sensitive and-resistant *Staphylococcus aureus*. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 16*(2), 407-412.

Vega, F. E. (2008). Insect pathology and fungal endophytes. *Journal of Invertebrate Pathology, 98*(3), 277-279.

บรรณานุกรม (ต่อ)

Vega, F. E., Goettel, M. S., Blackwell, M., Chandler, D., Jackson, M. A., Keller, S., & Ownley, B. H. (2009). Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. *Fungal Ecology, 2*(4), 149-159.

Vega, F. E., Meyling, N. V., Luangsa-ard, J. J., & Blackwell, M. (2012). Fungal entomopathogens. *Insect Pathology, 2*, 171-220.

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Lee, T. v. d., Hornes, M., & Kuiper, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research, 23*(21), 4407-4414.

Wang, S.-X., Liu, Y., Zhang, G.-Q., Zhao, S., Xu, F., Geng, X.-L., & Wang, H.-X. (2012). Cordysobin, a novel alkaline serine protease with HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activity from the medicinal mushroom *Cordyceps sobolifera*. *Journal of Bioscience and Bioengineering, 113*(1), 42-47.

Wang, X. L., Yang, R. H., & Yao, Y. J. (2011). Development of microsatellite markers for *Ophiocordyceps sinensis* (Ophiocordycipitaceae) Using an ISSR-TAIL-PCR method. *American Journal of Botany, 98*(12), e391-e394.

Wu, M.-F., Li, P.-C., Chen, C.-C., Ye, S.-S., Chien, C.-T., & Yu, C.-C. (2011). *Cordyceps sobolifera* extract ameliorates lipopolysaccharide-induced renal dysfunction in the rat. *The American Journal of Chinese Medicine, 39*(03), 523-535.

Xing, X., & Guo, S. (2008). The structure and histochemistry of sclerotia of *Ophiocordyceps sinensis*. *Mycologia, 100*(4), 616-625.

Yao, Y., Gao, L., Li, Y., Ma, S., Wu, Z., Tan, N., & Zhu, J. (2014). Amplicon density-weighted algorithms for analyzing dissimilarity and dynamic alterations of RAPD polymorphisms of Cordyceps sinensis. *Beijing Da Xue Xue Bao. Yi Xue Ban= Journal of Peking University., 46*(4), 618-628.

Yip, P. Y., Chau, C. F., Mak, C. Y., & Kwan, H. S. (2007). DNA methods for identification of Chinese medicinal materials. *Chinese Medicine, 2*(1), 9.

บรรณานุกรม (ต่อ)

Yue, K., Ye, M., Lin, X., & Zhou, Z. (2013). The artificial cultivation of medicinal caterpillar fungus, *Ophiocordyceps sinensis* (Ascomycetes): A review. *International Journal of Medicinal Mushrooms, 15*(5), 425-434.

Zhou, X.-W., Li, L.-J., & Tian, E.-W. (2014). Advances in research of the artificial cultivation of *Ophiocordyceps sinensis* in China. *Critical Reviews in Biotechnology, 34*(3), 233-243.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในการระบุชนิดของเชื้อรา *O. sobolifera*

การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในการระบุชนิดของเชื้อรา *O. sobolifera*

ตารางภาคผนวก ฉ-1 แสดงการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในการระบุชนิดของเชื้อรา *O. sobolifera* โดยใช้ยีน ITS เพิ่มจำนวนด้วยไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 ของแต่ละไอโซเลทที่คัดแยกได้จากตัวอ่อนจักจั่นที่พบในพื้นที่จังหวัดขอนแก่น (KK isolate)

ไอโซเลท	การเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank		
	ชนิดของเชื้อราที่เหมือนมากที่สุด	NCBI accession number	เปอร์เซนต์ความเหมือน
Cod-NB1302	*Ophiocordyceps sobolifera* isolate Cod-NB1302 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	KT281884.1	100%
Cod-KK1501	*Ophiocordyceps sobolifera* isolate Cod-NB1302 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	KT281884.1	96%
Cod-KK1502	*Ophiocordyceps sobolifera* isolate Cod-NB1302 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	KT281884.1	96%
Cod-KK1503	*Ophiocordyceps sobolifera* isolate Cod-NB1302 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	KT281884.1	96%
Cod-KK1504	*Ophiocordyceps sobolifera* isolate Cod-NB1302 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	KT281884.1	96%

ไอโซเลท	การเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank		
	ชนิดของเชื้อราที่เหมือนมากที่สุด	NCBI accession number	เปอร์เซนต์ความเหมือน
Cod-KK1505	*Ophiocordyceps sobolifera* isolate Cod-NB1302 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	KT281884.1	96%
Cod-KK1506	*Ophiocordyceps sobolifera* isolate Cod-NB1302 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	KT281884.1	96%
Cod-KK1507	*Ophiocordyceps sobolifera* isolate Cod-NB1302 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	KT281884.1	96%
Cod-KK1508	*Ophiocordyceps sobolifera* isolate Cod-NB1302 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	KT281884.1	96%
Cod-KK1509	*Ophiocordyceps sobolifera* isolate Cod-NB1302 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	KT281884.1	95%
Cod-KK1510	*Ophiocordyceps sobolifera* isolate Cod-NB1302 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	KT281884.1	97%

ไอโซเลท	การเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank		
	ชนิดของเชื้อราที่เหมือนมากที่สุด	NCBI accession number	เปอร์เซนต์ความเหมือน
Cod-KK1511	*Ophiocordyceps sobolifera* isolate Cod-NB1302 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	KT281884.1	96%
Cod-KK1512	*Ophiocordyceps sobolifera* isolate Cod-NB1302 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	KT281884.1	96%
Cod-KK1513	*Ophiocordyceps sobolifera* isolate Cod-NB1302 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	KT281884.1	96%
Cod-KK1514	*Ophiocordyceps sobolifera* isolate Cod-NB1302 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	KT281884.1	96%
Cod-KK1515	*Ophiocordyceps sobolifera* isolate Cod-NB1302 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	KT281884.1	96%
Cod-KK1517	*Ophiocordyceps sobolifera* isolate Cod-NB1302 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	KT281884.1	93%

ไอโซเลท	การเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank		
	ชนิดของเชื้อราที่เหมือนมากที่สุด	NCBI accession number	เปอร์เซนต์ความเหมือน
Cod-KK1518	*Ophiocordyceps sobolifera* isolate Cod-NB1302 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	KT281884.1	96%
Cod-KK1519	*Ophiocordyceps sobolifera* isolate Cod-NB1302 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	KT281884.1	96%
Cod-KK1520	*Ophiocordyceps sobolifera* isolate Cod-NB1302 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	KT281884.1	96%
Cod-KK1521	*Ophiocordyceps sobolifera* isolate Cod-NB1302 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	KT281884.1	96%
Cod-KK1522	*Ophiocordyceps sobolifera* isolate Cod-NB1302 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	KT281884.1	87%
Cod-KK1523	*Ophiocordyceps sobolifera* isolate Cod-NB1302 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	KT281884.1	96%

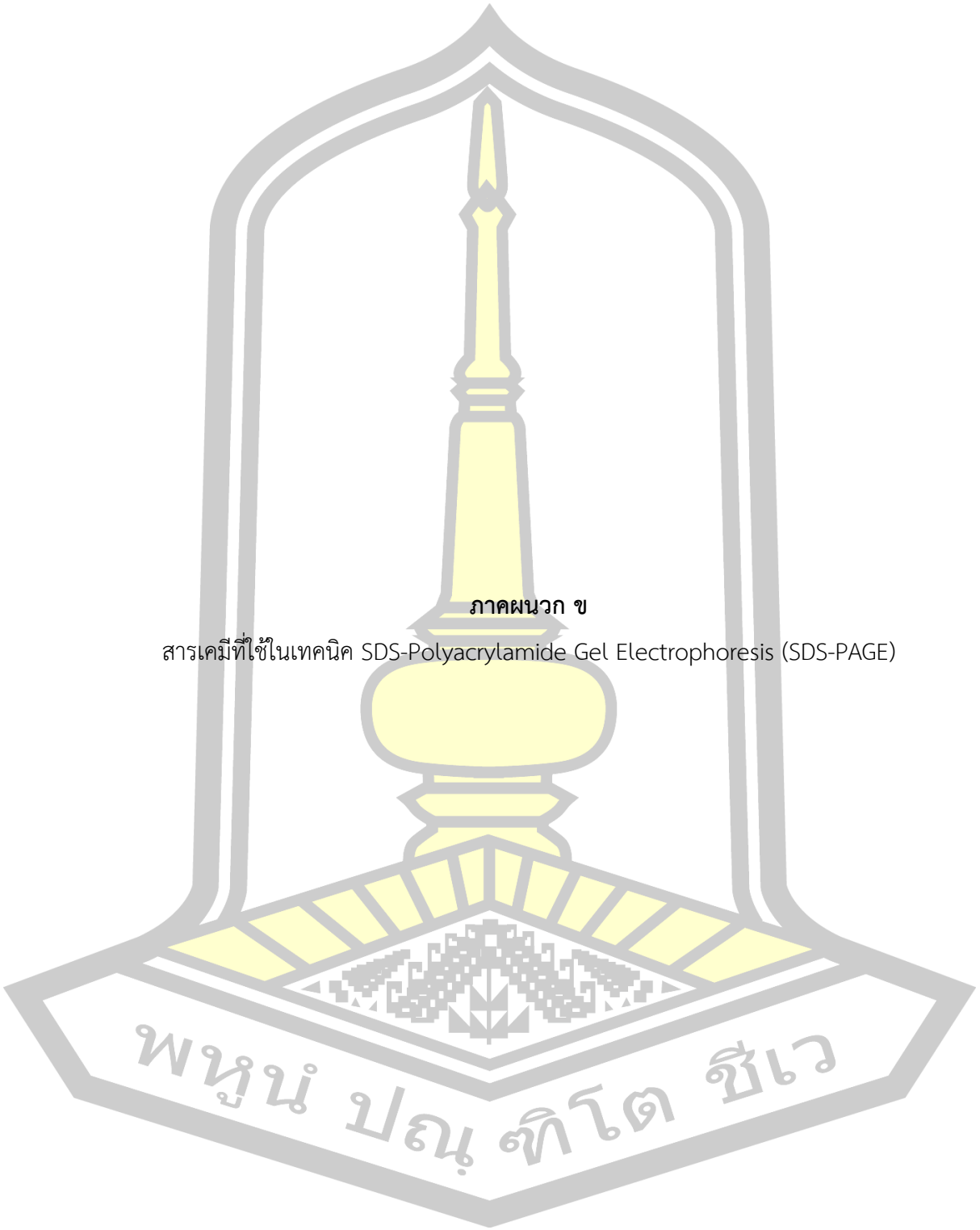
ไอโซเลท	การเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank		
	ชนิดของเชื้อราที่เหมือนมากที่สุด	NCBI accession number	เปอร์เซนต์ความเหมือน
Cod-KK1524	*Ophiocordyceps sobolifera* isolate Cod-NB1302 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	KT281884.1	96%
Cod-KK1525	*Ophiocordyceps sobolifera* isolate Cod-NB1302 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	KT281884.1	96%
Cod-KK1526	*Ophiocordyceps sobolifera* isolate Cod-NB1302 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	KT281884.1	96%
Cod-KK1527	*Ophiocordyceps sobolifera* isolate Cod-NB1302 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	KT281884.1	93%
Cod-KK1528	*Ophiocordyceps sobolifera* isolate Cod-NB1302 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	KT281884.1	97%
Cod-KK1530	*Ophiocordyceps sobolifera* isolate Cod-NB1302 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	KT281884.1	96%

ไอโซเลท	การเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank		
	ชนิดของเชื้อราที่เหมือนมากที่สุด	NCBI accession number	เปอร์เซนต์ความเหมือน
Cod-KK1531	*Ophiocordyceps sobolifera* isolate Cod-NB1302 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	KT281884.1	96%
Cod-KK1532	*Ophiocordyceps sobolifera* isolate Cod-NB1302 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	KT281884.1	96%
Cod-KK1533	*Beauveria* sp. ATT050 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	HQ607818.1	100%
Cod-KK1535	*Ophiocordyceps sobolifera* genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and complete sequence	AB027374.1	91%
Cod-KK1536	*Ophiocordyceps sobolifera* strain KEW 78842 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	JN049855.1	90%
Cod-KK1537	*Ophiocordyceps sobolifera* isolate Cod-NB1302 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	KT281884.1	93%

ไอโซเลท	การเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank		
	ชนิดของเชื้อราที่เหมือนมากที่สุด	NCBI accession number	เปอร์เซนต์ความเหมือน
Cod-KK1538	*Ophiocordyceps sobolifera* isolate Cod-NB1302 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	KT281884.1	96%
Cod-KK1539	*Ophiocordyceps sobolifera* isolate Cod-NB1302 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	KT281884.1	94%
Cod-KK1540	*Ophiocordyceps sobolifera* isolate Cod-NB1302 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	KT281884.1	91%
Cod-KK1541	*Ophiocordyceps sobolifera* isolate Cod-NB1302 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	KT281884.1	92%
Cod-KK1542	*Ophiocordyceps sobolifera* isolate Cod-NB1302 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	KT281884.1	96%
Cod-KK1543	*Ophiocordyceps sobolifera* isolate Cod-NB1302 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	KT281884.1	96%

ไอโซเลท	การเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank		
	ชนิดของเชื้อราที่เหมือนมากที่สุด	NCBI accession number	เปอร์เซนต์ความเหมือน
Cod-KK1545	*Simplicillium obclavatum* strain SO2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	KC403970.1	92%
Cod-KK1546	*Ophiocordyceps sobolifera* isolate Cod-NB1302 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	KT281884.1	94%
Cod-KK1547	*Ophiocordyceps sobolifera* isolate Cod-NB1302 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	KT281884.1	92%
Cod-KK1548	*Ophiocordyceps sobolifera* isolate Cod-NB1302 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	KT281884.1	96%

พหุน ปณ ฑิโต ชีเว



ภาคผนวก ข

สารเคมีที่ใช้ในเทคนิค SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

สารเคมีที่ใช้ในเทคนิค SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

1. 30% acrylamide mix (เตรียมปริมาตร 50 มิลลิลิตร)

1.1 Acrylamide 14.5 กรัม

1.2 Bis-Acrylamide 0.5 กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย 30% acrylamide mix (การละลายสารในน้ำอุ่นช่วยให้การละลายได้ดีขึ้น) ไม่ควรเตรียมในปริมาณที่มากๆ เพราะจะสามารถเก็บสารไว้ได้ประมาณ 1 เดือน ถ้าหากเกินกว่านี้คุณสมบัติของสารจะลดลง ควรเก็บสารในขวดที่แสงเข้าไม่ถึง (dark bottles) และเก็บที่อุณหภูมิห้อง

ข้อควรระวัง Acrylamide และ Bis-Acrylamide เป็นสารประเภท neurotoxins สามารถดูดซึมทางผิวหนัง ได้ ควรสวมถุงมือและใส่หน้ากากเมื่อทำการชั่งสารเคมีหรือเตรียมสารเคมี

2. 1.0 M Tris (pH 6.8) เตรียมปริมาตร 200 มิลลิลิตร

โดย 1M Tris (MW. = 121.14) ถ้าเตรียมสารละลาย 1,000 มิลลิลิตร ต้องชั่งสารมา 121.14 กรัม ต้องการเตรียมสารละลาย 200มิลลิลิตร ต้องชั่งสารมา (200x121.14)/1,000 = 24.228 กรัม ฉะนั้นต้องชั่ง Tris มา 24.23 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 150 มิลลิลิตร นำไปปรับค่า pH ด้วยสาร HCl ให้ได้ 6.8 แล้วจึงปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 200 มิลลิลิตร

3. 1.5 M Tris (pH 8.8) เตรียมปริมาตร 200 มิลลิลิตร

ต้องเตรียมสารละลาย 1.5 M Tris ต้องชั่งสารมา 1.5X121.14 = 181.71 กรัม ถ้าเตรียมสารละลาย 1,000 มิลลิลิตร ต้องชั่งสารมา 181.71 กรัม ต้องเตรียมสารละลาย 200 มิลลิลิตร ต้องชั่งสารมา (200x181.71)/1,000 = 36.34 กรัม ฉะนั้นต้องชั่ง Tris มา 36.34 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 150 มิลลิลิตร นำไปปรับค่า pH ด้วยสาร HCl ให้ได้ 8.8 แล้วจึงปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 200 มิลลิลิตร

4. 10% ammonium persulfate (APS)

ชั่งสารมา 0.1 กรัม ใช้น้ำกลั่นละลายให้ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เตรียมก่อนไว้ใช้งาน ถ้าหากต้องการเก็บไว้ใช้ต่อ ควรเก็บไว้ในตู้เย็น (4°C) ไว้ได้นานประมาณ 1 สัปดาห์

5. 10% Sodium dodecyl sulfate (SDS)

ชั่งสารมา 1 กรัม ใช้น้ำกลั่นละลายให้ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

6.TEMED (N,N,N′,N′,-tetramethylendiamine)

ควรเก็บไว้ในตู้เย็น (4°C) ในขวดสีชา

7. Sample buffer

7.1 63 mM Tris-HCl, pH 6.8

7.2 2% Sodium dodecyl sulfate (SDS)

7.3 5% 2-Mercaptoethanol

7.4 10% glycerol

นำสารมาละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

8. Tris-glycine electrophoresis buffer (Running buffer) เตรียม 1,000 มิลลิลิตร

8.1 Tris 3.02 กรัม (25 mM)

8.2 glycine (electrophoresis grade) (pH 6.3) 14.4 กรัม (250 mM)

8.3 SDS 1.0 กรัม (0.1%)

นำสารมาละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

9. SDS gel-loading buffer

9.1 53 mM Tris (pH 6.8)

9.2 100 mM dithiothreitol

9.3 2% SDS

9.4 10% glycerol

นำสารมาละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

10. Coomassie brilliant blue R-250 stanining solution

10.1 Coomassie brilliant blue (R-250) 1 กรัม (0.1%)

10.2 Methanol 500 มิลลิลิตร (50%)

10.3 Aectic acid 100 มิลลิลิตร (10%)

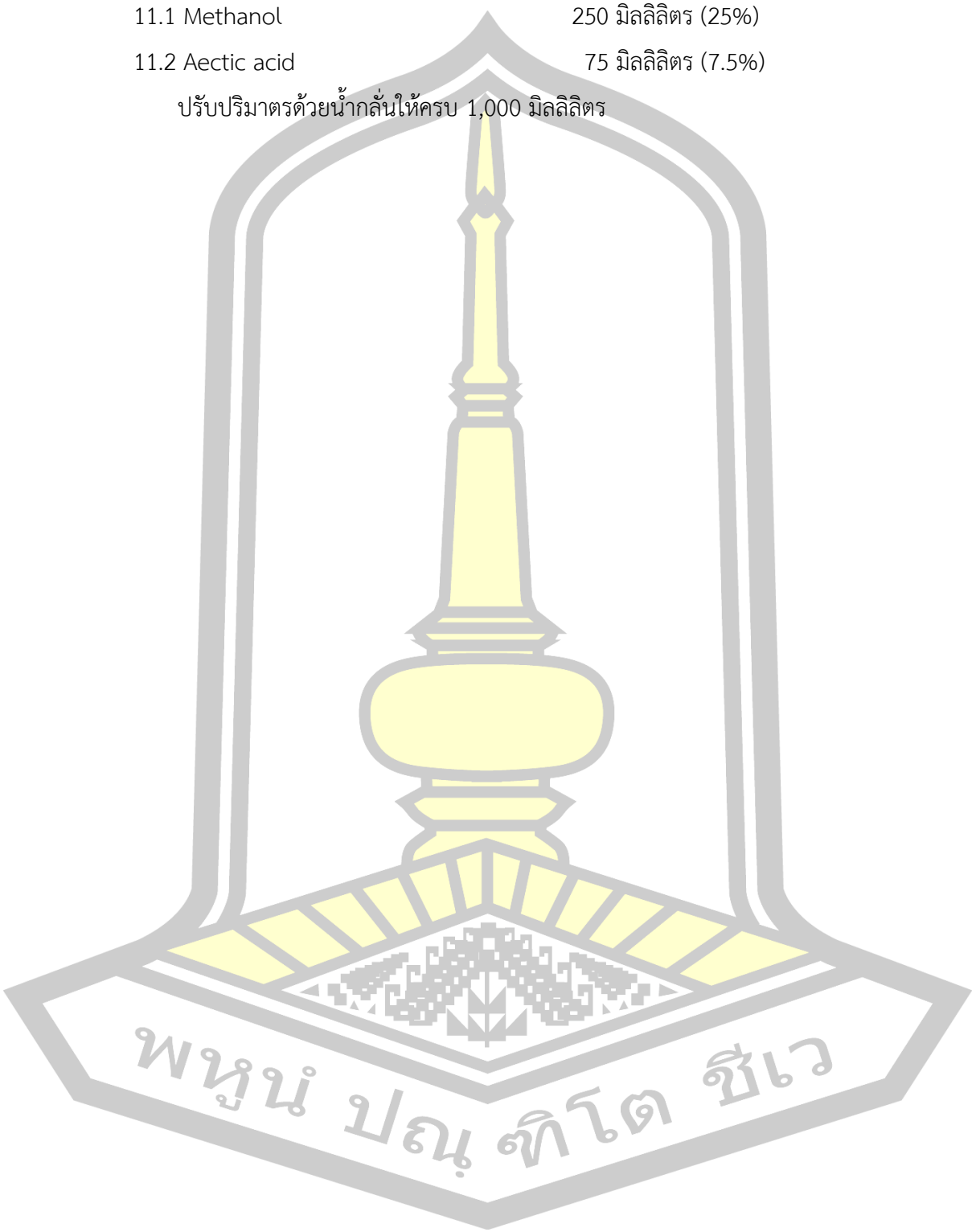
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

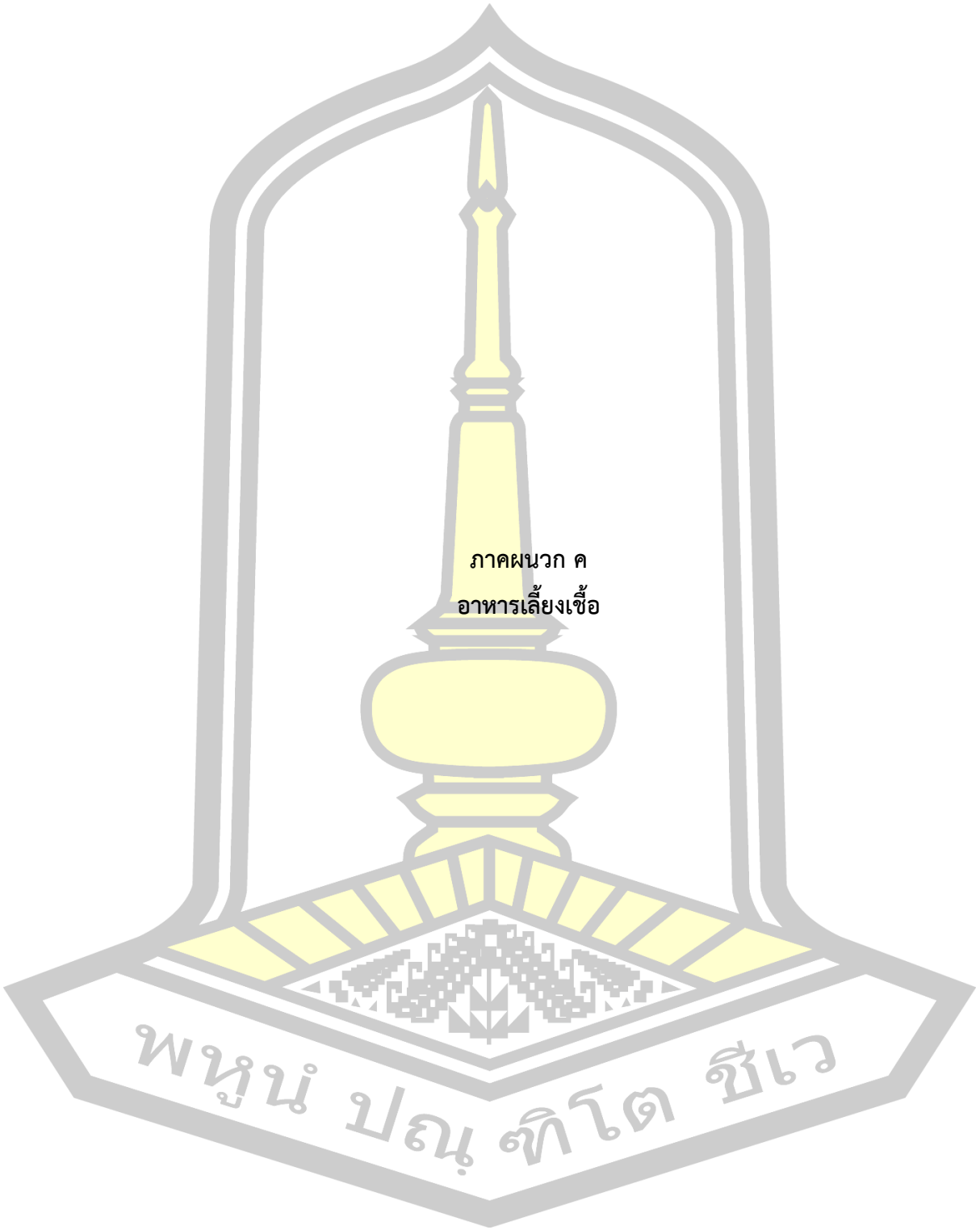
11. Destaning solution

11.1 Methanol 250 มิลลิลิตร (25%)

11.2 Aectic acid 75 มิลลิลิตร (7.5%)

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร





ภาคผนวก ค

อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Homogenized died cricket glucose agar (HCGA)

ทำการปั่นแมลง (จิ้งหรีด, จักจั่น) ในน้ำกลั่น อัตราส่วน 1:2 ปั่นพอละเอียด จากนั้นกรองด้วยผ้าขาวบาง จะได้สารละลายแมลงปั่น เก็บไว้ที่ -20°C เพื่อใช้เตรียมอาหาร HCGA มีส่วนผสมดังนี้

สารละลายแมลงปั่น	25 มิลลิลิตร
D-glucose	2 กรัม
Agar	1.5 กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ให้ครบ 100 มิลลิลิตร คนสารให้เข้ากัน นำไปต้มด้วยความร้อนให้ผงอาหารสำเร็จรูปละลาย นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121°C นาน 15 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Potato dextrose agar (PDA)

ชั่งผงอาหารสำเร็จรูป ชนิด PDA ปริมาณ 39 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตร คนสารให้เข้ากัน นำไปต้มด้วยความร้อนให้ผงอาหารสำเร็จรูปละลาย นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121°C นาน 15 นาที

3. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Oat meal agar (OMA)

ชั่งผงอาหารสำเร็จรูป ชนิด OMA ปริมาณ 72.5 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตร คนสารให้เข้ากัน นำไปต้มด้วยความร้อนให้ผงอาหารสำเร็จรูปละลาย นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121°C นาน 15 นาที

4. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Malt extract agar (MEA)

ชั่งผงอาหารสำเร็จรูป ชนิด MEA ปริมาณ 50 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตร คนสารให้เข้ากัน นำไปต้มด้วยความร้อนให้ผงอาหารสำเร็จรูปละลาย นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121°C นาน 15 นาที

5. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Sabouraud dextrose agar (SDA)

ชั่งผงอาหารสำเร็จรูป ชนิด SDA ปริมาณ 65 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตร คนสารให้เข้ากัน นำไปต้มด้วยความร้อนให้ผงอาหารสำเร็จรูปละลาย นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121°C นาน 15 นาที

6. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Yeast malt agar (YMA)

ชั่งผงอาหารสำเร็จรูป ชนิด YMA ปริมาณ 20.5 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ครบ 490 มิลลิลิตร คนสารให้เข้ากัน นำไปต้มด้วยความร้อนให้ผงอาหารสำเร็จรูปละลาย นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121°C นาน 15 นาที

7. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Czapek-Dox agar (CDA)

ชั่งผงอาหารสำเร็จรูป ชนิด CDA ปริมาณ 49.01 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตร คนสารให้เข้ากัน นำไปต้มด้วยความร้อนให้ผงอาหารสำเร็จรูปละลาย นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121°C นาน 15 นาที

8. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Mueller-Hinton broth (MHB)

ชั่งผงอาหารสำเร็จรูป ชนิด MHB ปริมาณ 21 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตร คนสารให้เข้ากัน นำไปต้มด้วยความร้อนให้ผงอาหารสำเร็จรูปละลาย นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121°C นาน 15 นาที

9. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Mueller-Hinton agar (MHA)

Mueller-Hinton broth (MHB) 21 กรัม

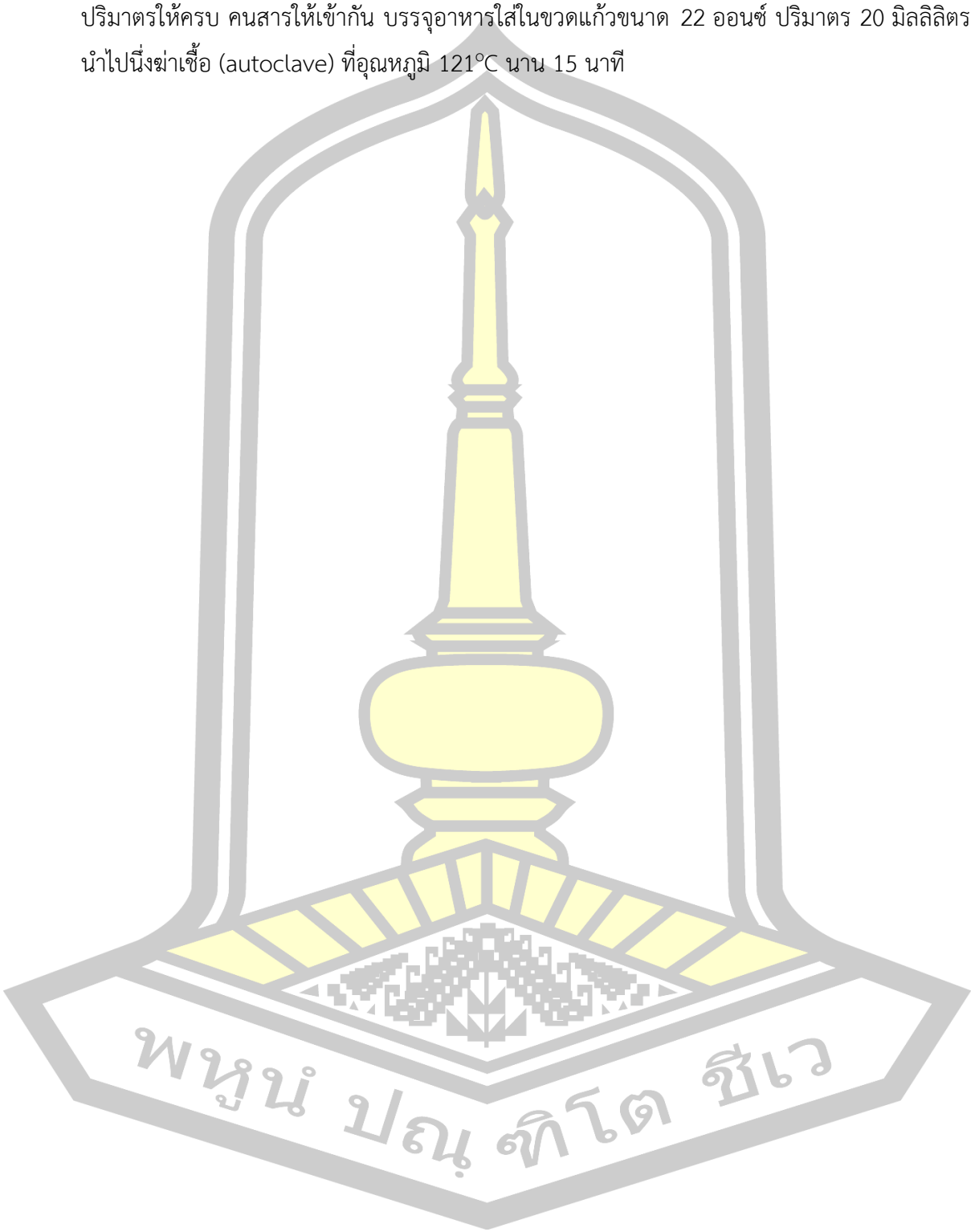
Agar 15 diy,

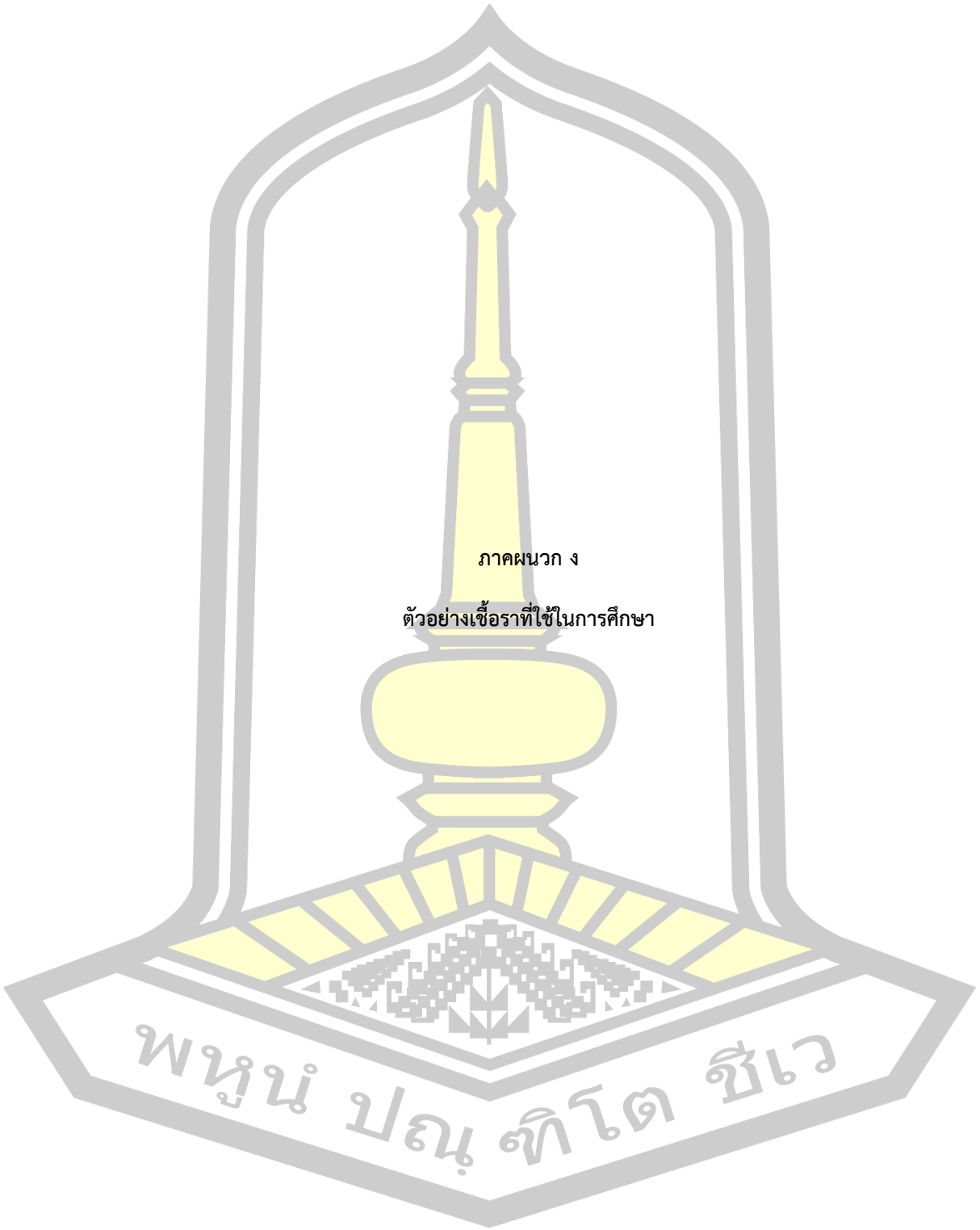
ชั่งผงอาหารสำเร็จรูป ชนิด MHB ปริมาณ 21 กรัม ผสมกับผงวุ้น 15 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตร คนสารให้เข้ากัน นำไปต้มด้วยความร้อนให้ผงอาหารสำเร็จรูปและผงวุ้นละลาย นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121°C นาน 15 นาที

10. อาหารเลี้ยงเชื้อรา สูตร Induce medium

สารเคมี	**ปริมาณสารที่ต้องเตรียม (กรัม: g)**					
Sucrose	17.5	24.5	35	42	52.5	70
Peptone	2.5	3.5	5	6	7.5	10
Yeast extract	1.25	1.75	2.5	3	3.75	5
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.493	0.69602	0.986	1.1832	1.78	1.98
KH_2PO_4	05	0.7	1	1.2	1.8	2
Thiamine (Vitamin B1)	0.025	0.035	0.05	0.06	0.09	0.1
DW (มิลลิลิตร)	500	700	1000	1200	1500	2000

เตรียมส่วนผสมของอาหารสูตร Induce medium ตามตาราง ละลายด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ครบ คนสารให้เข้ากัน บรรจุอาหารใส่ในขวดแก้วขนาด 22 ออนซ์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121°C นาน 15 นาที





ภาคผนวก ง

ตัวอย่างเชื้อราที่ใช้ในการศึกษา

Natural Medicinal Mushroom Museum

Faculty of Science, Mahasarakham University

THAILAND

***Ophiocordyceps* Herbarium**

MSUT_7241

Collector No. *Sangdee*-01

Sci.name: *Ophiocordyceps sobolifera* (= *Cordyceps sobolifera*) (Hill ex Watson) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora

Family: Ophiocordycipitaceae

Collecting locality: THAILAND: Khon Kaen Province, Muang District, Si La Sub-district, 16° 29′ 2.784″ N, 102° 49′ 55.206″ E

Altitude: 160 m

Substrate:

Forest type: mixed deciduous forest

Collector: *A. Sangdee*

Date of coll. 16 Jun. 2015

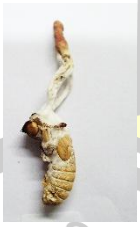
Determined by: *A. Sangdee*

Natural Medicinal Mushroom Museum

Faculty of Science, Mahasarakham University

THAILAND

***Ophiocordyceps* Herbarium**



MSUT_7242

Collector No. *Sangdee*-02

Sci.name: *Ophiocordyceps sobolifera* (= *Cordyceps sobolifera*) (Hill ex Watson) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora

Family: Ophiocordycipitaceae

Collecting locality: THAILAND: Khon Kaen Province, Muang District, Si La Sub-district, 16° 29′ 2.784″ N, 102° 49′ 55.206″ E

Altitude: 160 m

Substrate:

Forest type: mixed deciduous forest

Collector: *A. Sangdee*

Date of coll. 16 Jun. 2015

Determined by: *A. Sangdee*

Natural Medicinal Mushroom Museum

Faculty of Science, Mahasarakham University

THAILAND

***Ophiocordyceps* Herbarium**

MSUT_7243

Collector No. *Sangdee*-03

Sci.name: *Ophiocordyceps sobolifera* (= *Cordyceps sobolifera*) (Hill ex Watson) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora

Family: Ophiocordycipitaceae

Collecting locality: THAILAND: Khon Kaen Province, Muang District, Si La Sub-district, 16° 29′ 2.784″ N, 102° 49′ 55.206″ E

Altitude: 160 m

Substrate:

Forest type: mixed deciduous forest

Collector: *A. Sangdee*

Date of coll. 16 Jun. 2015

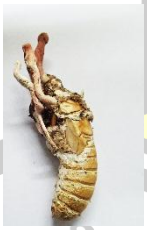
Determined by: *A. Sangdee*

Natural Medicinal Mushroom Museum

Faculty of Science, Mahasarakham University

THAILAND

***Ophiocordyceps* Herbarium**



MSUT_7244

Collector No. *Sangdee*-04

Sci.name: *Ophiocordyceps sobolifera* (= *Cordyceps sobolifera*) (Hill ex Watson) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora

Family: Ophiocordycipitaceae

Collecting locality: THAILAND: Khon Kaen Province, Muang District, Si La Sub-district, 16° 29′ 2.784″ N, 102° 49′ 55.206″ E

Altitude: 160 m

Substrate:

Forest type: mixed deciduous forest

Collector: *A. Sangdee*

Date of coll. 16 Jun. 2015

Determined by: *A. Sangdee*

Natural Medicinal Mushroom Museum

Faculty of Science, Mahasarakham University

THAILAND

***Ophiocordyceps* Herbarium**

MSUT_7245

Collector No. *Sangdee*-05

Sci.name: *Ophiocordyceps sobolifera* (= *Cordyceps sobolifera*) (Hill ex Watson) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora

Family: Ophiocordycipitaceae

Collecting locality: THAILAND: Khon Kaen Province, Muang District, Si La Sub-district, 16° 29′ 2.784″ N, 102° 49′ 55.206″ E

Altitude: 160 m

Substrate:

Forest type: mixed deciduous forest

Collector: *A. Sangdee*

Date of coll. 16 Jun. 2015

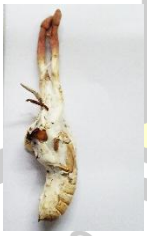
Determined by: *A. Sangdee*

Natural Medicinal Mushroom Museum

Faculty of Science, Mahasarakham University

THAILAND

***Ophiocordyceps* Herbarium**



MSUT_7246

Collector No. *Sangdee*-06

Sci.name: *Ophiocordyceps sobolifera* (= *Cordyceps sobolifera*) (Hill ex Watson) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora

Family: Ophiocordycipitaceae

Collecting locality: THAILAND: Khon Kaen Province, Muang District, Si La Sub-district, 16° 29′ 2.784″ N, 102° 49′ 55.206″ E

Altitude: 160 m

Substrate:

Forest type: mixed deciduous forest

Collector: *A. Sangdee*

Date of coll. 16 Jun. 2015

Determined by: *A. Sangdee*

Natural Medicinal Mushroom Museum

Faculty of Science, Mahasarakham University

THAILAND

***Ophiocordyceps* Herbarium**

MSUT_7247

Collector No. *Sangdee*-07

Sci.name: *Ophiocordyceps sobolifera* (= *Cordyceps sobolifera*) (Hill ex Watson) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora

Family: Ophiocordycipitaceae

Collecting locality: THAILAND: Khon Kaen Province, Muang District, Si La Sub-district, 16° 29′ 2.784″ N, 102° 49′ 55.206″ E

Altitude: 160 m

Substrate:

Forest type: mixed deciduous forest

Collector: *A. Sangdee*

Date of coll. 16 Jun. 2015

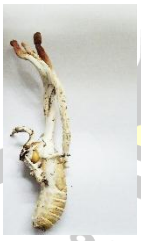
Determined by: *A. Sangdee*

Natural Medicinal Mushroom Museum

Faculty of Science, Mahasarakham University

THAILAND

***Ophiocordyceps* Herbarium**



MSUT_7248

Collector No. *Sangdee*-08

Sci.name: *Ophiocordyceps sobolifera* (= *Cordyceps sobolifera*) (Hill ex Watson) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora

Family: Ophiocordycipitaceae

Collecting locality: THAILAND: Khon Kaen Province, Muang District, Si La Sub-district, 16° 29′ 2.784″ N, 102° 49′ 55.206″ E

Altitude: 160 m

Substrate:

Forest type: mixed deciduous forest

Collector: *A. Sangdee*

Date of coll. 16 Jun. 2015

Determined by: *A. Sangdee*

Natural Medicinal Mushroom Museum

Faculty of Science, Mahasarakham University

THAILAND

***Ophiocordyceps* Herbarium**

MSUT_7249

Collector No. *Sangdee*-09

Sci.name: *Ophiocordyceps sobolifera* (= *Cordyceps sobolifera*) (Hill ex Watson) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora

Family: Ophiocordycipitaceae

Collecting locality: THAILAND: Khon Kaen Province, Muang District, Si La Sub-district, 16° 29′ 2.784″ N, 102° 49′ 55.206″ E

Altitude: 160 m

Substrate:

Forest type: mixed deciduous forest

Collector: *A. Sangdee*

Date of coll. 16 Jun. 2015

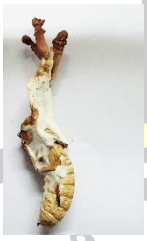
Determined by: *A. Sangdee*

Natural Medicinal Mushroom Museum

Faculty of Science, Mahasarakham University

THAILAND

***Ophiocordyceps* Herbarium**



MSUT_7250

Collector No. *Sangdee*-10

Sci.name: *Ophiocordyceps sobolifera* (= *Cordyceps sobolifera*) (Hill ex Watson) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora

Family: Ophiocordycipitaceae

Collecting locality: THAILAND: Khon Kaen Province, Muang District, Si La Sub-district, 16° 29′ 2.784″ N, 102° 49′ 55.206″ E

Altitude: 160 m

Substrate:

Forest type: mixed deciduous forest

Collector: *A. Sangdee*

Date of coll. 16 Jun. 2015

Determined by: *A. Sangdee*

Natural Medicinal Mushroom Museum

Faculty of Science, Mahasarakham University

THAILAND

***Ophiocordyceps* Herbarium**

MSUT_7251

Collector No. *Sangdee*-11

Sci.name: *Ophiocordyceps sobolifera* (= *Cordyceps sobolifera*) (Hill ex Watson) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora

Family: Ophiocordycipitaceae

Collecting locality: THAILAND: Khon Kaen Province, Muang District, Si La Sub-district, 16° 29′ 2.784″ N, 102° 49′ 55.206″ E

Altitude: 160 m

Substrate:

Forest type: mixed deciduous forest

Collector: *A. Sangdee*

Date of coll. 16 Jun. 2015

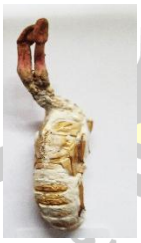
Determined by: *A. Sangdee*

Natural Medicinal Mushroom Museum

Faculty of Science, Mahasarakham University

THAILAND

***Ophiocordyceps* Herbarium**



MSUT_7252

Collector No. *Sangdee*-12

Sci.name: *Ophiocordyceps sobolifera* (= *Cordyceps sobolifera*) (Hill ex Watson) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora

Family: Ophiocordycipitaceae

Collecting locality: THAILAND: Khon Kaen Province, Muang District, Si La Sub-district, 16° 29′ 2.784″ N, 102° 49′ 55.206″ E

Altitude: 160 m

Substrate:

Forest type: mixed deciduous forest

Collector: *A. Sangdee*

Date of coll. 16 Jun. 2015

Determined by: *A. Sangdee*

Natural Medicinal Mushroom Museum

Faculty of Science, Mahasarakham University

THAILAND

***Ophiocordyceps* Herbarium**

MSUT_7253

Collector No. *Sangdee*-13

Sci.name: *Ophiocordyceps sobolifera* (= *Cordyceps sobolifera*) (Hill ex Watson) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora

Family: Ophiocordycipitaceae

Collecting locality: THAILAND: Khon Kaen Province, Muang District, Si La Sub-district, 16° 29′ 2.784″ N, 102° 49′ 55.206″ E

Altitude: 160 m

Substrate:

Forest type: mixed deciduous forest

Collector: *A. Sangdee*

Date of coll. 16 Jun. 2015

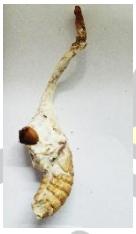
Determined by: *A. Sangdee*

Natural Medicinal Mushroom Museum

Faculty of Science, Mahasarakham University

THAILAND

***Ophiocordyceps* Herbarium**



MSUT_7254

Collector No. *Sangdee*-14

Sci.name: *Ophiocordyceps sobolifera* (= *Cordyceps sobolifera*) (Hill ex Watson) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora

Family: Ophiocordycipitaceae

Collecting locality: THAILAND: Khon Kaen Province, Muang District, Si La Sub-district, 16° 29′ 2.784″ N, 102° 49′ 55.206″ E

Altitude: 160 m

Substrate:

Forest type: mixed deciduous forest

Collector: *A. Sangdee*

Date of coll. 16 Jun. 2015

Determined by: *A. Sangdee*

Natural Medicinal Mushroom Museum

Faculty of Science, Mahasarakham University

THAILAND

***Ophiocordyceps* Herbarium**

MSUT_7255

Collector No. *Sangdee*-15

Sci.name: *Ophiocordyceps sobolifera* (= *Cordyceps sobolifera*) (Hill ex Watson) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora

Family: Ophiocordycipitaceae

Collecting locality: THAILAND: Khon Kaen Province, Muang District, Si La Sub-district, 16° 29′ 2.784″ N, 102° 49′ 55.206″ E

Altitude: 160 m

Substrate:

Forest type: mixed deciduous forest

Collector: *A. Sangdee*

Date of coll. 16 Jun. 2015

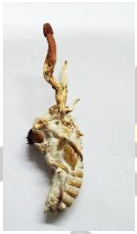
Determined by: *A. Sangdee*

Natural Medicinal Mushroom Museum

Faculty of Science, Mahasarakham University

THAILAND

***Ophiocordyceps* Herbarium**



MSUT_7256

Collector No. *Sangdee*-16

Sci.name: *Ophiocordyceps sobolifera* (= *Cordyceps sobolifera*) (Hill ex Watson) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora

Family: Ophiocordycipitaceae

Collecting locality: THAILAND: Khon Kaen Province, Muang District, Si La Sub-district, 16° 29′ 2.784″ N, 102° 49′ 55.206″ E

Altitude: 160 m

Substrate:

Forest type: mixed deciduous forest

Collector: *A. Sangdee*

Date of coll. 16 Jun. 2015

Determined by: *A. Sangdee*

Natural Medicinal Mushroom Museum

Faculty of Science, Mahasarakham University

THAILAND

***Ophiocordyceps* Herbarium**

MSUT_7257

Collector No. *Sangdee*-17

Sci.name: *Ophiocordyceps sobolifera* (= *Cordyceps sobolifera*) (Hill ex Watson) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora

Family: Ophiocordycipitaceae

Collecting locality: THAILAND: Khon Kaen Province, Muang District, Si La Sub-district, 16° 29′ 2.784″ N, 102° 49′ 55.206″ E

Altitude: 160 m

Substrate:

Forest type: mixed deciduous forest

Collector: *A. Sangdee*

Date of coll. 16 Jun. 2015

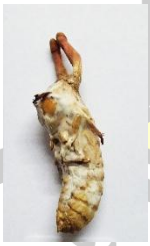
Determined by: *A. Sangdee*

Natural Medicinal Mushroom Museum

Faculty of Science, Mahasarakham University

THAILAND

***Ophiocordyceps* Herbarium**



MSUT_7258

Collector No. *Sangdee*-18

Sci.name: *Ophiocordyceps sobolifera* (= *Cordyceps sobolifera*) (Hill ex Watson) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora

Family: Ophiocordycipitaceae

Collecting locality: THAILAND: Khon Kaen Province, Muang District, Si La Sub-district, 16° 29′ 2.784″ N, 102° 49′ 55.206″ E

Altitude: 160 m

Substrate:

Forest type: mixed deciduous forest

Collector: *A. Sangdee*

Date of coll. 16 Jun. 2015

Determined by: *A. Sangdee*

Natural Medicinal Mushroom Museum

Faculty of Science, Mahasarakham University

THAILAND

***Ophiocordyceps* Herbarium**

MSUT_7259

Collector No. *Sangdee*-19

Sci.name: *Ophiocordyceps sobolifera* (= *Cordyceps sobolifera*) (Hill ex Watson) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora

Family: Ophiocordycipitaceae

Collecting locality: THAILAND: Khon Kaen Province, Muang District, Si La Sub-district, 16° 29′ 2.784″ N, 102° 49′ 55.206″ E

Altitude: 160 m

Substrate:

Forest type: mixed deciduous forest

Collector: *A. Sangdee*

Date of coll. 16 Jun. 2015

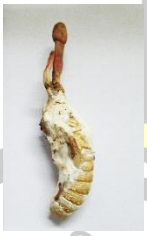
Determined by: *A. Sangdee*

Natural Medicinal Mushroom Museum

Faculty of Science, Mahasarakham University

THAILAND

***Ophiocordyceps* Herbarium**



MSUT_7260

Collector No. *Sangdee*-20

Sci.name: *Ophiocordyceps sobolifera* (= *Cordyceps sobolifera*) (Hill ex Watson) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora

Family: Ophiocordycipitaceae

Collecting locality: THAILAND: Khon Kaen Province, Muang District, Si La Sub-district, 16° 29′ 2.784″ N, 102° 49′ 55.206″ E

Altitude: 160 m

Substrate:

Forest type: mixed deciduous forest

Collector: *A. Sangdee*

Date of coll. 16 Jun. 2015

Determined by: *A. Sangdee*

Natural Medicinal Mushroom Museum

Faculty of Science, Mahasarakham University

THAILAND

***Ophiocordyceps* Herbarium**

MSUT_7261

Collector No. *Sangdee*-21

Sci.name: *Ophiocordyceps sobolifera* (= *Cordyceps sobolifera*) (Hill ex Watson) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora

Family: Ophiocordycipitaceae

Collecting locality: THAILAND: Khon Kaen Province, Muang District, Si La Sub-district, 16° 29′ 2.784″ N, 102° 49′ 55.206″ E

Altitude: 160 m

Substrate:

Forest type: mixed deciduous forest

Collector: *A. Sangdee*

Date of coll. 16 Jun. 2015

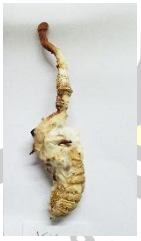
Determined by: *A. Sangdee*

Natural Medicinal Mushroom Museum

Faculty of Science, Mahasarakham University

THAILAND

***Ophiocordyceps* Herbarium**



MSUT_7262

Collector No. *Sangdee*-22

Sci.name: *Ophiocordyceps sobolifera* (= *Cordyceps sobolifera*) (Hill ex Watson) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora

Family: Ophiocordycipitaceae

Collecting locality: THAILAND: Khon Kaen Province, Muang District, Si La Sub-district, 16° 29′ 2.784″ N, 102° 49′ 55.206″ E

Altitude: 160 m

Substrate:

Forest type: mixed deciduous forest

Collector: *A. Sangdee*

Date of coll. 16 Jun. 2015

Determined by: *A. Sangdee*

Natural Medicinal Mushroom Museum

Faculty of Science, Mahasarakham University

THAILAND

***Ophiocordyceps* Herbarium**

MSUT_7263

Collector No. *Sangdee*-23

Sci.name: *Ophiocordyceps sobolifera* (= *Cordyceps sobolifera*) (Hill ex Watson) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora

Family: Ophiocordycipitaceae

Collecting locality: THAILAND: Khon Kaen Province, Muang District, Si La Sub-district, 16° 29′ 2.784″ N, 102° 49′ 55.206″ E

Altitude: 160 m

Substrate:

Forest type: mixed deciduous forest

Collector: *A. Sangdee*

Date of coll. 16 Jun. 2015

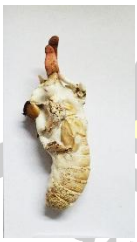
Determined by: *A. Sangdee*

Natural Medicinal Mushroom Museum

Faculty of Science, Mahasarakham University

THAILAND

***Ophiocordyceps* Herbarium**



MSUT_7264

Collector No. *Sangdee*-24

Sci.name: *Ophiocordyceps sobolifera* (= *Cordyceps sobolifera*) (Hill ex Watson) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora

Family: Ophiocordycipitaceae

Collecting locality: THAILAND: Khon Kaen Province, Muang District, Si La Sub-district, 16° 29′ 2.784″ N, 102° 49′ 55.206″ E

Altitude: 160 m

Substrate:

Forest type: mixed deciduous forest

Collector: *A. Sangdee*

Date of coll. 16 Jun. 2015

Determined by: *A. Sangdee*

Natural Medicinal Mushroom Museum

Faculty of Science, Mahasarakham University

THAILAND

***Ophiocordyceps* Herbarium**

MSUT_7265

Collector No. *Sangdee*-25

Sci.name: *Ophiocordyceps sobolifera* (= *Cordyceps sobolifera*) (Hill ex Watson) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora

Family: Ophiocordycipitaceae

Collecting locality: THAILAND: Khon Kaen Province, Muang District, Si La Sub-district, 16° 29′ 2.784″ N, 102° 49′ 55.206″ E

Altitude: 160 m

Substrate:

Forest type: mixed deciduous forest

Collector: *A. Sangdee*

Date of coll. 16 Jun. 2015

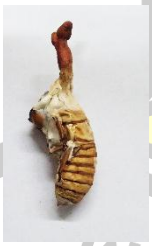
Determined by: *A. Sangdee*

Natural Medicinal Mushroom Museum

Faculty of Science, Mahasarakham University

THAILAND

***Ophiocordyceps* Herbarium**



MSUT_7266

Collector No. *Sangdee*-26

Sci.name: *Ophiocordyceps sobolifera* (= *Cordyceps sobolifera*) (Hill ex Watson) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora

Family: Ophiocordycipitaceae

Collecting locality: THAILAND: Khon Kaen Province, Muang District, Si La Sub-district, 16° 29′ 2.784″ N, 102° 49′ 55.206″ E

Altitude: 160 m

Substrate:

Forest type: mixed deciduous forest

Collector: *A. Sangdee*

Date of coll. 16 Jun. 2015

Determined by: *A. Sangdee*

Natural Medicinal Mushroom Museum

Faculty of Science, Mahasarakham University

THAILAND

***Ophiocordyceps* Herbarium**

MSUT_7267

Collector No. *Sangdee*-27

Sci.name: *Ophiocordyceps sobolifera* (= *Cordyceps sobolifera*) (Hill ex Watson) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora

Family: Ophiocordycipitaceae

Collecting locality: THAILAND: Khon Kaen Province, Muang District, Si La Sub-district, 16° 29′ 2.784″ N, 102° 49′ 55.206″ E

Altitude: 160 m

Substrate:

Forest type: mixed deciduous forest

Collector: *A. Sangdee*

Date of coll. 16 Jun. 2015

Determined by: *A. Sangdee*

Natural Medicinal Mushroom Museum

Faculty of Science, Mahasarakham University

THAILAND

***Ophiocordyceps* Herbarium**

MSUT_7268

Collector No. *Sangdee*-28

Sci.name: *Ophiocordyceps sobolifera* (= *Cordyceps sobolifera*) (Hill ex Watson) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora

Family: Ophiocordycipitaceae

Collecting locality: THAILAND: Khon Kaen Province, Muang District, Si La Sub-district, 16° 29′ 2.784″ N, 102° 49′ 55.206″ E

Altitude: 160 m

Substrate:

Forest type: mixed deciduous forest

Collector: *A. Sangdee*

Date of coll. 16 Jun. 2015

Determined by: *A. Sangdee*

Natural Medicinal Mushroom Museum

Faculty of Science, Mahasarakham University

THAILAND

***Ophiocordyceps* Herbarium**

MSUT_7269

Collector No. *Sangdee*-29

Sci.name: *Ophiocordyceps sobolifera* (= *Cordyceps sobolifera*) (Hill ex Watson) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora

Family: Ophiocordycipitaceae

Collecting locality: THAILAND: Khon Kaen Province, Muang District, Si La Sub-district, 16° 29′ 2.784″ N, 102° 49′ 55.206″ E

Altitude: 160 m

Substrate:

Forest type: mixed deciduous forest

Collector: *A. Sangdee*

Date of coll. 16 Jun. 2015

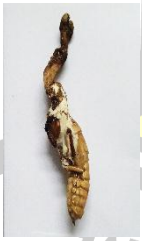
Determined by: *A. Sangdee*

Natural Medicinal Mushroom Museum

Faculty of Science, Mahasarakham University

THAILAND

***Ophiocordyceps* Herbarium**



MSUT_7270

Collector No. *Sangdee*-30

Sci.name: *Ophiocordyceps sobolifera* (= *Cordyceps sobolifera*) (Hill ex Watson) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora

Family: Ophiocordycipitaceae

Collecting locality: THAILAND: Khon Kaen Province, Muang District, Si La Sub-district, 16° 29′ 2.784″ N, 102° 49′ 55.206″ E

Altitude: 160 m

Substrate:

Forest type: mixed deciduous forest

Collector: *A. Sangdee*

Date of coll. 16 Jun. 2015

Determined by: *A. Sangdee*

Natural Medicinal Mushroom Museum

Faculty of Science, Mahasarakham University

THAILAND

***Ophiocordyceps* Herbarium**

MSUT_7271

Collector No. *Sangdee*-31

Sci.name: *Ophiocordyceps sobolifera* (= *Cordyceps sobolifera*) (Hill ex Watson) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora

Family: Ophiocordycipitaceae

Collecting locality: THAILAND: Khon Kaen Province, Muang District, Si La Sub-district, 16° 29′ 2.784″ N, 102° 49′ 55.206″ E

Altitude: 160 m

Substrate:

Forest type: mixed deciduous forest

Collector: *A. Sangdee*

Date of coll. 16 Jun. 2015

Determined by: *A. Sangdee*

Natural Medicinal Mushroom Museum

Faculty of Science, Mahasarakham University

THAILAND

***Ophiocordyceps* Herbarium**

MSUT_7272

Collector No. *Sangdee*-32

Sci.name: *Ophiocordyceps sobolifera* (= *Cordyceps sobolifera*) (Hill ex Watson) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora

Family: Ophiocordycipitaceae

Collecting locality: THAILAND: Khon Kaen Province, Muang District, Si La Sub-district, 16° 29′ 2.784″ N, 102° 49′ 55.206″ E

Altitude: 160 m

Substrate:

Forest type: mixed deciduous forest

Collector: *A. Sangdee*

Date of coll. 16 Jun. 2015

Determined by: *A. Sangdee*

Natural Medicinal Mushroom Museum

Faculty of Science, Mahasarakham University

THAILAND

***Ophiocordyceps* Herbarium**

MSUT_7273

Collector No. *Sangdee*-33

Sci.name: *Ophiocordyceps sobolifera* (= *Cordyceps sobolifera*) (Hill ex Watson) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora

Family: Ophiocordycipitaceae

Collecting locality: THAILAND: Khon Kaen Province, Muang District, Si La Sub-district, 16° 29′ 2.784″ N, 102° 49′ 55.206″ E

Altitude: 160 m

Substrate:

Forest type: mixed deciduous forest

Collector: *A. Sangdee*

Date of coll. 16 Jun. 2015

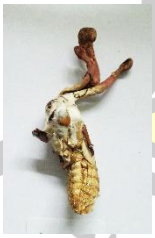
Determined by: *A. Sangdee*

Natural Medicinal Mushroom Museum

Faculty of Science, Mahasarakham University

THAILAND

***Ophiocordyceps* Herbarium**



MSUT_7274

Collector No. *Sangdee*-34

Sci.name: *Ophiocordyceps sobolifera* (= *Cordyceps sobolifera*) (Hill ex Watson) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora

Family: Ophiocordycipitaceae

Collecting locality: THAILAND: Khon Kaen Province, Muang District, Si La Sub-district, 16° 29′ 2.784″ N, 102° 49′ 55.206″ E

Altitude: 160 m

Substrate:

Forest type: mixed deciduous forest

Collector: *A. Sangdee*

Date of coll. 16 Jun. 2015

Determined by: *A. Sangdee*

Natural Medicinal Mushroom Museum

Faculty of Science, Mahasarakham University

THAILAND

***Ophiocordyceps* Herbarium**

MSUT_7275

Collector No. *Sangdee*-35

Sci.name: *Ophiocordyceps sobolifera* (= *Cordyceps sobolifera*) (Hill ex Watson) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora

Family: Ophiocordycipitaceae

Collecting locality: THAILAND: Khon Kaen Province, Muang District, Si La Sub-district, 16° 29′ 2.784″ N, 102° 49′ 55.206″ E

Altitude: 160 m

Substrate:

Forest type: mixed deciduous forest

Collector: *A. Sangdee*

Date of coll. 16 Jun. 2015

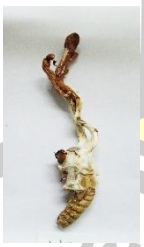
Determined by: *A. Sangdee*

Natural Medicinal Mushroom Museum

Faculty of Science, Mahasarakham University

THAILAND

***Ophiocordyceps* Herbarium**



MSUT_7276

Collector No. *Sangdee*-36

Sci.name: *Ophiocordyceps sobolifera* (= *Cordyceps sobolifera*) (Hill ex Watson) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora

Family: Ophiocordycipitaceae

Collecting locality: THAILAND: Khon Kaen Province, Muang District, Si La Sub-district, 16° 29′ 2.784″ N, 102° 49′ 55.206″ E

Altitude: 160 m

Substrate:

Forest type: mixed deciduous forest

Collector: *A. Sangdee*

Date of coll. 16 Jun. 2015

Determined by: *A. Sangdee*

Natural Medicinal Mushroom Museum

Faculty of Science, Mahasarakham University

THAILAND

***Ophiocordyceps* Herbarium**

MSUT_7277

Collector No. *Sangdee*-37

Sci.name: *Ophiocordyceps sobolifera* (= *Cordyceps sobolifera*) (Hill ex Watson) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora

Family: Ophiocordycipitaceae

Collecting locality: THAILAND: Khon Kaen Province, Muang District, Si La Sub-district, 16° 29′ 2.784″ N, 102° 49′ 55.206″ E

Altitude: 160 m

Substrate:

Forest type: mixed deciduous forest

Collector: *A. Sangdee*

Date of coll. 16 Jun. 2015

Determined by: *A. Sangdee*

Natural Medicinal Mushroom Museum

Faculty of Science, Mahasarakham University

THAILAND

***Ophiocordyceps* Herbarium**

MSUT_7278

Collector No. *Sangdee*-38

Sci.name: *Ophiocordyceps sobolifera* (= *Cordyceps sobolifera*) (Hill ex Watson) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora

Family: Ophiocordycipitaceae

Collecting locality: THAILAND: Khon Kaen Province, Muang District, Si La Sub-district, 16° 29′ 2.784″ N, 102° 49′ 55.206″ E

Altitude: 160 m

Substrate:

Forest type: mixed deciduous forest

Collector: *A. Sangdee*

Date of coll. 16 Jun. 2015

Determined by: *A. Sangdee*

Natural Medicinal Mushroom Museum

Faculty of Science, Mahasarakham University

THAILAND

***Ophiocordyceps* Herbarium**

MSUT_7279

Collector No. *Sangdee*-39

Sci.name: *Ophiocordyceps sobolifera* (= *Cordyceps sobolifera*) (Hill ex Watson) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora

Family: Ophiocordycipitaceae

Collecting locality: THAILAND: Khon Kaen Province, Muang District, Si La Sub-district, 16° 29′ 2.784″ N, 102° 49′ 55.206″ E

Altitude: 160 m

Substrate:

Forest type: mixed deciduous forest

Collector: *A. Sangdee*

Date of coll. 16 Jun. 2015

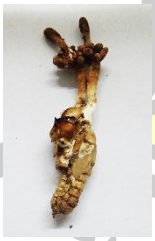
Determined by: *A. Sangdee*

Natural Medicinal Mushroom Museum

Faculty of Science, Mahasarakham University

THAILAND

***Ophiocordyceps* Herbarium**



MSUT_7280

Collector No. *Sangdee*-40

Sci.name: *Ophiocordyceps sobolifera* (= *Cordyceps sobolifera*) (Hill ex Watson) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora

Family: Ophiocordycipitaceae

Collecting locality: THAILAND: Khon Kaen Province, Muang District, Si La Sub-district, 16° 29′ 2.784″ N, 102° 49′ 55.206″ E

Altitude: 160 m

Substrate:

Forest type: mixed deciduous forest

Collector: *A. Sangdee*

Date of coll. 16 Jun. 2015

Determined by: *A. Sangdee*

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวศศิธร ธงชัย
วันเกิด	วันที่ 27 เมษายน พ.ศ.2525
สถานที่เกิด	ยโสธร
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	บ้านเลขที่ 99/66 หมู่บ้านอารียา 5 ซอย 8 ตำบลไร่น้อย อำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี 34000
ตำแหน่งหน้าที่การงาน	อาจารย์
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี เลขที่ 2 ถนนราชธานี ตำบลในเมือง อำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี 34000
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2542 สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนยโสธรพิทยาคม พ.ศ. 2546 สำเร็จการศึกษาประกาศนียบัตรวิชาชีพ (ป.วค.) สาขาวิชาชีพครู มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช พ.ศ. 2548 สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ) สาขาชีววิทยา (เกียรตินิยมอันดับสอง) มหาวิทยาลัยมหาสารคาม พ.ศ 2551 สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วท.ม.) สาขาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น พ.ศ 2562 สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (ปร.ด.) สาขาชีววิทยา มหาวิทยาลัยมหาสารคาม