

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

จากการเก็บตัวอย่างไลเคนสกุลทริพิทิเลียมในแหล่งต่างๆ ในประเทศไทยจำนวน 17 แหล่ง ได้ตัวอย่างไลเคนจำนวน 623 ตัวอย่าง สามารถแยกและเลี้ยงราที่ก่อให้เกิดไลเคนได้จำนวน 64 ไอโซเลตโดยจัดกลุ่มราที่ก่อให้เกิดไลเคนที่แยกได้อาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ ลักษณะสีของเพอริทีเซีย จำนวนผนังกันสปอร์ และผลการทำปฏิกิริยาเคมีของเพอริทีเซียกับสารละลาย 10% KOH ได้เป็น 6 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ I มีเพอริทีเซียสีเหลือง ผนังกันสปอร์จำนวน 3 ผนัง และเพอริทีเซียทำปฏิกิริยากับสารละลาย 10% KOH กลุ่มที่ II มีเพอริทีเซียสีขาว ผนังกันสปอร์จำนวน 3 ผนัง และเพอริทีเซียทำปฏิกิริยาเคมีกับสารละลาย 10% KOH กลุ่มที่ III มีเพอริทีเซียสีดำ ผนังกันสปอร์จำนวน 3 ผนัง และเพอริทีเซียไม่ทำปฏิกิริยาเคมีกับสารละลาย 10% KOH กลุ่มที่ IV มีเพอริทีเซียสีขาว ผนังกันสปอร์จำนวนมากกว่า 3 ผนัง และเพอริทีเซียทำปฏิกิริยาเคมีกับสารละลาย 10% KOH กลุ่มที่ V มีเพอริทีเซียสีดำ ผนังกันสปอร์จำนวนมากกว่า 3 ผนัง และเพอริทีเซียทำปฏิกิริยาเคมีกับสารละลาย 10% KOH และกลุ่มที่ VI มีเพอริทีเซียสีเหลือง ผนังกันสปอร์จำนวนมากกว่า 3 ผนัง และเพอริทีเซียทำปฏิกิริยาเคมีกับสารละลาย 10% KOH การแพร่กระจายพันธุ์ของราที่ก่อให้เกิดไลเคนที่แยกได้ในแต่ละกลุ่มสามารถพบได้ทั่วทุกภูมิภาคของประเทศไทยแสดงให้เห็นว่าลักษณะทางภูมิศาสตร์อาจไม่มีอิทธิพลต่อการกระจายพันธุ์ของไลเคนในสกุลทริพิทิเลียมในประเทศไทย

เมื่อใช้เทคนิค RFLP ศึกษาการแปรผันทางพันธุกรรมที่ตำแหน่ง ITS ของราที่ก่อให้เกิดไลเคนที่แยกได้ พบว่ามีความแปรผันทางพันธุกรรมที่ตำแหน่ง ITS ค่อนข้างสูงมาก ทั้งนี้แสดงให้เห็นถึงการเกิดมิวเตชันที่ตำแหน่งดังกล่าว ซึ่งการเกิดมิวเตชันมีทั้งที่เกิดจากการเพิ่มลดจำนวนเบส นิวคลีโอไทด์ และหรือการเปลี่ยนแปลงชนิดของเบส นิวคลีโอไทด์ จากราที่ก่อให้เกิดไลเคนที่แยกได้จำนวน 6 กลุ่มตามลักษณะสัณฐานวิทยา สามารถจัดกลุ่มโดยอาศัยแบบแผนของ ITS-RFLP ได้ทั้งหมด 22 จีโนไทป์ โดยพบว่าไม่มีจีโนไทป์ใดจัดอยู่ในกลุ่มที่มีลักษณะสัณฐานวิทยามากกว่าหนึ่งกลุ่มสัณฐานวิทยา ซึ่งการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาร่วมกับเทคนิค ITS-RFLP สามารถช่วยในการจัดจำแนกรวมกลุ่มราที่ก่อให้เกิดไลเคนได้ละเอียดและชัดเจนขึ้น

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของราที่ก่อให้เกิดไลเคนสกุลทริพิทิเลียมที่ตำแหน่ง ITS และตำแหน่ง mtSSU โดยมาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของราที่มีข้อมูลอยู่ในฐานข้อมูล GeneBank พบว่า ที่ตำแหน่ง ITS มีความเหมือนกับราที่ก่อให้เกิดไลเคนในอันดับ Trypetheliales Pyrenulales Pleosporales Candelariales และ Chaetothyriales โดยมีค่าความ

เหมือนอยู่ระหว่าง 82-95 เปอร์เซ็นต์ ส่วนตำแหน่ง mtSSU มีความเหมือนกับราที่ก่อให้เกิดไลเคน ในอันดับ Trypetheliales และ Pyrenulales อยู่ระหว่าง 92-100 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าข้อมูล ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งทั้งสองของราที่ก่อให้เกิดไลเคนในสกุลทริพิทีเลียมในฐานข้อมูล GenBank ที่ใช้อ้างอิงมีน้อยมากโดยเฉพาะข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง ITS พบมีเพียง ชนิดเดียว ดังนั้นข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของราที่ก่อให้เกิดไลเคนที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้จะเป็น ประโยชน์อย่างกับการจัดจำแนก และการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรของราที่ก่อให้เกิดไลเคนใน สกุลทริพิทีเลียมในระดับโมเลกุลต่อไปในอนาคต

การวิเคราะห์ห้วงศ์วานวิวัฒนาการราที่ก่อให้เกิดไลเคนที่แยกได้โดยอาศัยลำดับนิวคลีโอ- ไทด์ที่ตำแหน่ง ITS และ mtSSU พบว่า มีความสอดคล้องกัน โดยสามารถแบ่งสายพันธุ์ราที่ ก่อให้เกิดไลเคนออกเป็น 2 เคลด เคลดที่ 1 เป็นกลุ่มที่มีความใกล้ชิดกับราที่ก่อให้เกิดไลเคนใน อันดับ Pyrenulales ซึ่งสมาชิกในกลุ่มนี้ทั้งหมดมีลักษณะสัณฐานวิทยาและการทำปฏิกิริยาเคมี ของเพอริทีเซียกับสารละลาย 10% KOH ตรงกับกลุ่ม III และ เคลดที่ 2 เป็นกลุ่มที่มีความใกล้ชิด กับราที่ก่อให้เกิดไลเคนในอันดับ Trypetheliales ซึ่งสมาชิกในกลุ่มนี้มีลักษณะสัณฐานวิทยา หลากหลายโดยพบอยู่ในทุกกลุ่มและพบว่าเพอริทีเซียมักทำปฏิกิริยาเคมีกับสารละลาย 10% KOH ยกเว้น ไอโซเลต RN 5 และ SMS 17 ที่อยู่ในกลุ่ม III มีเพอริทีเซียที่ไม่ทำปฏิกิริยาเคมี ข้อมูล ที่ได้แสดงให้เห็นว่าการวิเคราะห์ห้วงศ์วานวิวัฒนาการจะสามารถแก้ปัญหาการคลุมเครือของการ จัดจำแนกราที่ก่อให้เกิดไลเคนโดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาและการทำปฏิกิริยาเคมีได้เป็นอย่างดี และเมื่อใช้ทั้งสองวิธีร่วมกันจะทำให้การจัดจำแนกราที่ก่อให้เกิดไลเคนมีความชัดเจนและแม่นยำ ยิ่งขึ้น

เมื่อวิเคราะห์ห้วงศ์วานวิวัฒนาการราที่ก่อให้เกิดไลเคนสกุลทริพิทีเลียมของไทยโดยอาศัย การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง ITS ร่วมกับ mtSSU สามารถแบ่งราทริพิทีเลียมได้ 2 เคลด 4 lineage 8 กลุ่มย่อย ประกอบไปด้วย 9 ชนิด สามารถทราบชนิดได้ 3 ชนิดโดยอาศัย ลักษณะสัณฐานวิทยาร่วมกับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง mtSSU ดังนี้คือ *Trypethelium nitidiusculum* (NSR 16) *Trypethelium tropicum* (RN 5 และ SMS 17) และ *Trypethelium eluteriae* (กลุ่ม D2 D3 และ D4) ซึ่งตัวอย่างราที่ก่อให้เกิดไลเคน *T. eluteriae* ที่ใช้ ศึกษาสามารถแบ่งแยกได้ 3 ชนิดจากการวิเคราะห์ห้วงศ์วานวิวัฒนาการโดยอาศัยลำดับนิวคลีโอ- ไทด์ที่ตำแหน่ง ITS ร่วมกับ mtSSU แสดงให้เห็นว่าควรมีการทบทวนการจัดจำแนกราที่ก่อให้เกิด ไลเคนสกุลทริพิทีเลียม รวมทั้งสกุลอื่นๆ โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะโคโลนีและ การเจริญของโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งต่างๆโดยการ สร้างวงศ์วานวิวัฒนาการ และการทำปฏิกิริยาเคมีของเพอริทีเซียกับสารละลาย 10% KOH จะช่วยให้การจัดจำแนกราที่ก่อให้เกิดไลเคนถูกต้องและน่าเชื่อถือมากยิ่งขึ้น

จากการศึกษาสารทุติยภูมิของราที่ก่อให้เกิดไลเคนที่แยกได้ด้วยวิธี TLC โดยมีเมทานอลเป็นตัวทำละลายและมีระบบตัวทำละลายเป็นไดคลอโรมีเทนและเมทานอลในอัตราส่วน 10 : 0.2 พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มสารที่ราที่ก่อให้เกิดไลเคนผลิตได้เป็น 8 กลุ่ม มีตำแหน่งค่า Rf ตั้งแต่ 0.00-0.87 เมื่อนำไปสารทุติยภูมิที่แยกองค์ประกอบได้ไปทดสอบการออกฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ 4 ชนิด ด้วยวิธีไบโอบอโตกราฟี พบว่าราที่ก่อให้เกิดไลเคนสกุล *Trichothelium* KY 418 เป็นสายพันธุ์เดียวเท่านั้นที่มีความสามารถในการออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 4 ชนิดได้ โดยที่ตำแหน่ง Rf เท่ากับ 0.09 ออกฤทธิ์ยับยั้งยีสต์ *C. albicans* และที่ตำแหน่ง Rf เท่ากับ 0.12 ออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus* และ *E. coli* ในขณะที่แถบของสารที่ตำแหน่ง Rf เท่ากับ 0.56 ออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย *E. coli* เท่านั้น ส่วนราเส้นใย *A. niger* ออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างสปอร์ในช่วงแถบของสารที่ตำแหน่ง Rf เท่ากับ 0.09 - 0.56 ดังนั้นราที่ก่อให้เกิดไลเคนสกุล *Trichothelium* KY 418 น่าสนใจที่จะทำการศึกษาค้นคว้าต่อไปเกี่ยวกับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในด้านอื่นๆ ได้แก่ ฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ ฤทธิ์ในการต้านไวรัส และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ เป็นต้น รวมทั้งการศึกษาเกี่ยวกับชนิดและโครงสร้างทางเคมีของสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่แยกได้เพื่อประยุกต์ใช้ทางเทคโนโลยีชีวภาพด้านต่างๆ ต่อไปในอนาคต