การศึกษาทางสัณฐานวิทยา ชีววิทยาโมเลกุล และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเห็ดปะการัง สกุล *Ramaria* จากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียว จังหวัดชัยภูมิ

ปริญญานิพนธ์
ของ
ณัชชา พรหมเพศ

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
กรกฎาคม 2561

การศึกษาทางสัณฐานวิทยา ชีววิทยาโมเลกุล และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเห็ดปะการัง สกุล *Ramaria* จากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียว จังหวัดชัยภูมิ

ปริญญานิพนธ์

ของ

ณัชชา พรหมเพศ

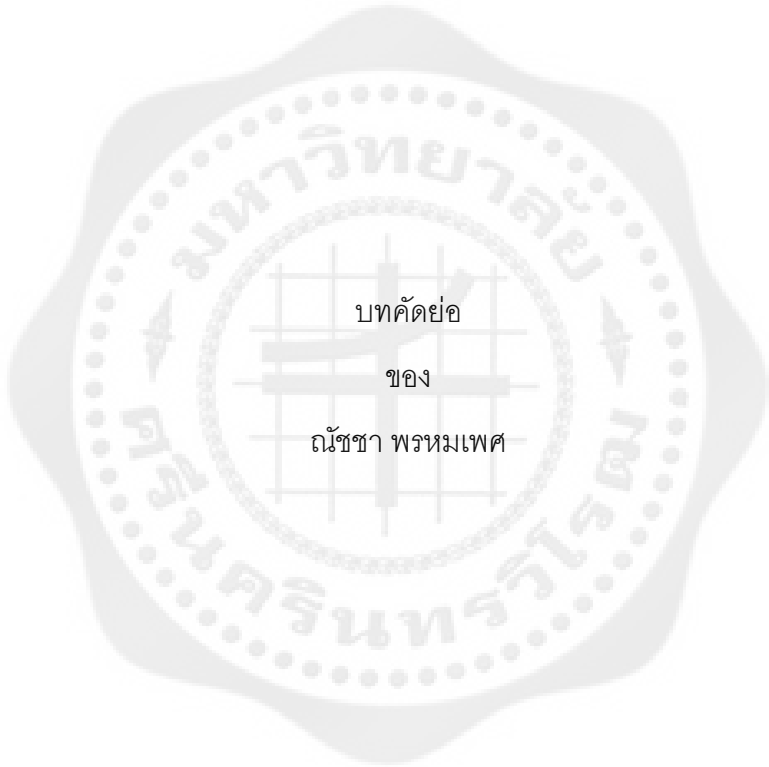
เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

กรกฎาคม 2561

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การศึกษาทางสัณฐานวิทยา ชีววิทยาโมเลกุล และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเห็ดปะการัง สกุล *Ramaria* จากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียว จังหวัดชัยภูมิ



บทคัดย่อ

ของ

ณัชชา พรหมเพศ

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทร์วิโรฒ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

กรกฎาคม 2561

ณัชชา พรหมเพศ. (2561). การศึกษาทางสัณฐานวิทยา ชีววิทยาโมเลกุล และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเห็ดปะการังสกุล *Ramaria* จากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียว จังหวัดชัยภูมิ. ปริญญานิพนธ์ วท.ม.(เทคโนโลยรชีวภาพ). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์: อาจารย์ ดร. ณัฏฐิกา สุวรรณาศรัย, อาจารย์ ดร. เชิดชัย โพธิ์ศรี.

เห็ดปะการังสกุล *Ramaria* จัดอยู่ในไฟลัม Basidiomycota มีจำนวนมากกว่า 200 สปีชีส์ทั่วโลก ในประเทศไทยมีรายงานอย่างน้อย 32 สปีชีส์ ในงานวิจัยนี้ได้รวบรวมตัวอย่างเห็ดปะการังจากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียว จังหวัดชัยภูมิ จำนวน 39 ตัวอย่าง เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ LSU rDNA และ ITS พบว่า สามารถจัดจำแนกได้ 3 สกุล 14 สปีชีส์ ได้แก่ *R. conjunctipes* var. *tsugensis*, *R.* aff. *flava* var. *aurea*, *R.* aff. *rubribrunnescens*, *R.* aff. *vinosimaculans*, *Ramaria* sp. 1, *Ramaria* sp. 2, *Ramaria* sp. 3, *Ramaria* sp. 4, *Ramaria* sp. 5, *Ramaria* sp. 6, *Ramaria* sp. 7, *Ramaria* sp. 8, *Ramaria* sp. 9, *Ramaria* sp. 10, *Phaeoclavulina cokeri* และ *Lentaria* sp. ในจำนวนนี้มีแนวโน้มเป็นสปีชีส์ใหม่ของโลกอย่างน้อย 3 สปีชีส์ จากนั้นคัดเลือกเห็ดปะการังจำนวน 10 ตัวอย่าง มาสกัดด้วยเอทานอลและเอทิลอะซิเตท เพื่อทดสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่าสารสกัดเห็ดปะการังด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบทั้ง 4 สายพันธุ์ (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa*) ได้ดีกว่าเอทิลอะซิเตท นอกจากนี้สารสกัดจากเอทานอลของเห็ดทุกสายพันธุ์ยังมีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดี เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH, ABTS และ Chelating assay ชนิดที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุด ได้แก่ *Lentaria* sp. (PKWS15-164) (IC_{50} = 0.009±0.001 mg/mL) ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับปริมาณฟลาโวนอยด์ (3,909.517±58.556 g QE/g extract) และสารประกอบฟีนอลทั้งหมด (461.955±8.783 g GAE/g extract) ที่ตรวจพบ ส่วนการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ alpha glucosidase พบว่ามีสารสกัดเห็ดเพียง 3 ชนิด เท่านั้นที่สามารถยับยั้งได้ โดยเฉพาะ *Ramaria* sp. 10 (PKWS15-181) (IC_{50} = 0.216±0.026 mg/mL) ซึ่งมีประสิทธิภาพดีไม่ต่างจากยา acarbose (IC_{50} = 33.782±0.523 mg/mL) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนผลการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA reductase พบว่า สารสกัดส่วนใหญ่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซมได้ มีค่าร้อยละของอัตราการยับยั้ง (% inhibition rate) อยู่ในช่วงร้อยละ 13.13-97.98 สายพันธุ์ที่ยับยั้งได้ดีที่สุด ได้แก่ *Lentaria* sp. (PKWS15-164) (ร้อยละ 97.98) ซึ่งมีอัตราการยับยั้งสูงกว่ายา pravastatin (ร้อยละ 95.51) อีกด้วย ผลการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลด้วยเทคนิค LC-ESI-MS พบว่าสารสกัดทุกตัวอย่างพบสารที่มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 416-416.1 m/z ซึ่งใกล้เคียงกับสาร Peururin และสาร Ramipril ซึ่งมีฤทธิ์ทางชีวภาพ นอกจากนี้ยังวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลลิก แอซิด จำนวน 7 ชนิด ได้แก่ gallic acid, salicylic acid, valnilic acid, syringic acid, valnilin, coumaric acid และ benzoic acid พบในสารสกัดเห็ดทุกตัวอย่างในปริมาณที่แตกต่างกัน ซึ่งสารดังกล่าวที่มีรายงานว่ามีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ ชะลอวัย และต้านมะเร็งได้อีกด้วย

MORPHOLOGICAL, MOLECULAR AND BIOACTIVE COMPOUND STUDIES OF CORAL MUSHROOM GENUS *RAMARIA* FROM PHU KHIEO WILDLIFE SANCTUARY, CHAIYAPHUM PROVINCE

AN ABSTRACT

BY

NATCHA PROMPHET

Present in Partial Fulfillment of Requirement for the

Master of Science in Biotechnology

at Srinakharinwirot University

July 2018

Natcha Promphet. (2018). Morphological, Molecular and Bioactive Compound Studies of Coral Mushroom Genus *Ramaria* from Phu Khieo Wildlife Sanctuary, Chaiyaphum Province. Master's thesis, Advisor committee: Dr. Nuttika Suwannasai, Dr. Cherdchai Phosri.

The coral mushroom genus *Ramaria* is the member of Phylum Basidiomycota. The genus is large, estimated to contain more than 200 species with worldwide distribution. Thirty two species are reported from Thailand. In This study, thirty-nine samples were collected from Phu Khieo Wildlife Sanctuary, Chaiyaphum province. The samples were identified by morphological characteristics and subjected to sequencing analysis of their nuclear ribosomal RNA (rDNA), the region of LSU rDNA and ITS. Based on morphological and molecular characteristics three genera (*Ramaria, Phaeoclavulina* and *Lentaria*) and fourteen species were obtained, included of *R. conjunctipes* var. *tsugensis*, *R.* aff. *flava* var. *aurea*, *R.* aff. *rubribrunnescens*, *R.* aff. *vinosimaculans*, *Ramaria* sp. 1, *Ramaria* sp. 2, *Ramaria* sp. 3, *Ramaria* sp. 4, *Ramaria* sp. 5, *Ramaria* sp. 6, *Ramaria* sp. 7, *Ramaria* sp. 8, *Ramaria* sp. 9, *Ramaria* sp. 10, *Phaeoclavulina cokeri* and *Lentaria* sp. At least three species may be added to those as new species. Ten samples were selected for bioactive compound studies using ethanol and ethyl acetate for extraction. The ethanolic extracts were better inhibited against 4 bacterial strains (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*) than ethyl acetate extracts. Moreover, all ethanolic extracts exhibited good potential for antioxidant activities analysed by three different methods of DPPH, ABTS and Chelating assay. The most effective extract was *Lentaria* sp. (PKWS15-164) (IC_{50} = 0.009±0.001 mg/mL) that conformed to flavonoid (3,909.517±58.556 g QE/g extract) and phenolic compound content (461.955±8.783 g GAE/g extract). Meanwhile, alpha-glucosidase inhibition activity from ethanolic extracts of *Ramaria* sp. 10 (PKWS15-181) could inhibited this enzyme activity (IC_{50} = 0.216±0.026 mg/mL) and this was not significantly different from acarbose (IC_{50} = 33.782±0.523 mg/mL). Furthermore, most of the extracts for an inhibition of HMG-CoA reductase activity were varied between 13.13 to 97.98 % inhibition rate. The highest inhibition rate was *Lentaria* sp. (PKWS15-164) (97.98%) which effectively higher than pravastatin (95.51%). Phenolic compound were analyzed by LC-ESI-MS. It has been found that distinguished mass was ranged 416- 416.1 m/z. This was similar to Peururin and Ramipril. In addition, seven phenolic acids of gallic acid, salicylic acid, valnilic acid, syringic acid, valnilin, coumaric acid and benzoic acid were detected in all samples studied. These compounds have antioxidant activities, anti-inflammatory, anti-aging and anticancer properties.

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

การศึกษาทางสัณฐานวิทยา ชีววิทยาโมเลกุล และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเห็ดปะการัง สกุล *Ramaria* จากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียว จังหวัดชัยภูมิ

ของ

ณัชชา พรหมเพศ

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

……คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)
วันที่.....เดือน.....พ.ศ……..

อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์

……ที่ปรึกษา
(อาจารย์ ดร.ณัฏฐิกา สุวรรณาศรัย)

……ที่ปรึกษาร่วม
(อาจารย์ ดร.เชิดชัย โพธิ์ศรี)

คณะกรรมการสอบปากเปล่า

……ประธาน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอก แสงวิเชียร)

……กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.อรอนงค์ พริ้งศุลกะ)

……กรรมการ
(อาจารย์ ดร.ณัฏฐิกา สุวรรณาศรัย)

……กรรมการ
(อาจารย์ ดร.เชิดชัย โพธิ์ศรี)

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จไปด้วยดีเนื่องจากได้รับความกรุณาและการช่วยเหลืออย่างสูงจาก อาจารย์ ดร.ณัฏฐิกา สุวรรณาศรัย อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์ และอาจารย์ ดร.เชิดชัย โพธิ์ศรี อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์ร่วม ผู้อนุเคราะห์ความช่วยเหลือและเสียสละเวลาอันมีค่าอย่างเต็มที่ ในการอบรมและชี้นำแนวทางในการทำวิจัยและวิทยานิพนธ์เล่มนี้จนมีความครบถ้วนสมบูรณ์ ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์ทุกท่านผู้ให้ความรู้การศึกษาและเอื้อเฟื้อสถานที่และเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ในงานวิจัย

ขอขอบพระคุณหัวหน้าเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียว เจ้าหน้าที่ทุกท่านและผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รุ้งเพชร แข็งแรง ในการให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกขณะรวบรวมตัวอย่าง

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอก แสงวิเชียร อาจารย์ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง ที่ให้ความอนุเคราะห์ เป็นประธานกรรมการในการสอบปริญญานิพนธ์ และอนุเคราะห์สารมาตรฐานในการทดลองในงานวิจัย

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศุภวรรณ ถาวรชินสมบัติ อาจารย์ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้ความอนุเคราะห์สารมาตรฐานในการทดลอง

ขอขอบพระคุณ Professor Anthony J.S. Whalley, Professor George Sharples, Dr. Glyn Hobbs, Paul Gibbons และ Dr. Daniel Graham (School of Pharmacy and Biomolecular Sciences, Liverpool John Moore University, UK) ที่ให้ความช่วยเหลือติดต่อประสานงานและสอนงานเกี่ยวกับการใช้กล้องอิเล็กตรอนแบบส่องกราดและคอยดูแลช่วยเหลือทางด้านเครื่องมือและอุปกรณ์เฉพาะด้านบางชนิดในงานวิจัยให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ Professor Roy Watling (Royal Botanic Garden, Edinburgh, UK) ที่ช่วยเหลือดูแลในการระบุชนิดของเชื้อที่ทำการทดลอง และ ในการศึกษาเชื้อชนิดอื่นๆ ในสกุลใกล้เคียงเพื่องานวิจัยที่มีความสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัยที่มอบทุนเข้าร่วมประชุมและเสนอผลงานของนิสิตบัณฑิตศึกษา (รหัสทุน GRAD S-3-60) ประจำปีงบประมาณ 2560

สุดท้าย ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ที่ดูแลสนับสนุนและอยู่เบื้องหลังจนงานวิจัยเล่มนี้สมบูรณ์ ขอขอบคุณนางสาวนิวนา หวังสวัสดิ์ และนายพิสิฐ ธรรมวิทยากร ด้านรวมถึงเพื่อนๆทุกท่านที่มอบมิตรภาพและความช่วยเหลือ รวมถึงผู้มีพระคุณท่านอื่นๆ ที่มีส่วนช่วยให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จได้โดยเรียบร้อย

ณัชชา พรหมเพศ

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ	1
ภูมิหลังและความสำคัญของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
ขอบเขตงานวิจัย	3
ผลที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย	3
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
เห็ดสกุล *Ramaria* และความหลากหลายในประเทศไทย	4
การจัดจำแนกชนิดเห็ดสกุล *Ramaria*	8
การจัดจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา	8
การจัดจำแนกชนิดด้วยวิธีทางชีววิทยาโมเลกุล	16
การศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเห็ดสกุล *Ramaria* และเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาชนิดกินได้	17
สารต้านอนุมูลอิสระ	18
สารต้านการเจริญของจุลินทรีย์	21
สารต้านการเจริญของเซลล์มะเร็ง	22
สารลดระดับน้ำตาลในเลือดและสารออกฤทธิ์อื่นๆ	23
3 วิธีดำเนินงานวิจัย	26
อุปกรณ์และเครื่องมือ	26
อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี	27
ชุดทดลองสำเร็จรูป	30
วิธีการทดลองรวบรวมตัวอย่างเห็ดสกุล *Ramaria*	31
การจัดจำแนกชนิดของเห็ดสกุล *Ramaria*	31
การศึกษาทางสัณฐานวิทยาและการเกิดสีของเนื้อเยื่อเห็ดเมื่อทำปฏิกิริยากับสารเคมี	31
การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมโดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์	32

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ **หน้า**

3 (ต่อ)

การคัดแยกเพาะเลี้ยงเชื้อเห็ดสกุล *Ramaria* บริสุทธิ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ..... 37

การสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากตัวอย่างเห็ดสกุล *Ramaria* 38

การศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากดอกเห็ดสกุล *Ramaria* 38

การศึกษาคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์..... 38

การศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระ สารฟลาโวนอยด์ และสารประกอบฟีนอล ทั้งหมด 40

การศึกษาคุณสมบัติในการยับยั้งหารเจริญของเซลล์มะเร็งของสารสกัด 43

การศึกษาคุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ alpha-glucosidase .. 43

การศึกษาคุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ alpha-amylase 44

การศึกษาคุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMG CoA reductase 45

การวิเคราะห์รูปแบบทางเคมีของสารสกัดจากเห็ดสกุล *Ramaria* ด้วยเทคนิค high performance liquid chromatography (HPLC) 45

การวิเคราะห์สารโดยวิธี Liquid chromatography-mass spectrophotometry (LC-ESI-MS) 46

การวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลลิกบางชนิดเทียบกับสารมาตรฐานด้วยเทคนิค MRM- MS/MS 47

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ 47

4 ผลการทดลอง 48

การเก็บรวบรวมตัวอย่างเห็ดปะการังและการจัดจำแนกชนิด 48

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 48

ผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Ramaria* และแผนภมิวิวัฒนาการ 88

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ 90

การศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารต้านการเจริญของจุลินทรีย์ 91

การศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ 94

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ **หน้า**

4 (ต่อ)

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์และสารประกอบฟีนอลทั้งหมด.. 96

คุณสมบัติของสารสกัดในการต้านการเจริญของเซลล์มะเร็ง 99

คุณสมบัติของสารสกัดในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ alpha-glucosidase และ alpha-amylase ……..……..... 99

คุณสมบัติของสารสกัดในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMG CoA reductase reductase ……..... 100

ผลการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลโดยวิธี Liquid Spectrophotometry (LC-MS)… 101

การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค High performance liquid chromatography (HPLC) …….. 102

การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC-ESI-MS 104

การวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลลิกบางชนิดเทียบกับสารมาตรฐานด้วยเทคนิค MRM-MS/MS ……..…… 110

5 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง ……... 112

บรรณานุกรม ……..…… 122

ภาคผนวก ……..…… 132

ภาคผนวก ก สารเคมีและบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ ……..…… 133

ภาคผนวก ข อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง ……..…… 143

ภาคผนวก ค วิธีการทดลองสำหรับชุดทดลองสำเร็จ (kits) และการเตรียมอื่นๆ ……..... 148

ภาคผนวก ง กราฟมาตรฐาน……..……..... 152

ภาคผนวก จ ผลการวิเคราะห์สารสกัดด้วยเทคนิค HPLC และ LC-MS 156

ประวัติย่อผู้วิจัย ……..……..…… 189

บัญชีตาราง

ตาราง **หน้า**

1 รายชื่อเห็ดสกุล *Ramaria* ที่มีรายงานในประเทศไทย 7

2 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง 27

3 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง 28

4 ชุดทดลองสำเร็จรูป 31

5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง 34

6 ส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของเห็ดสกุล *Ramaria* 34

7 เวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของเห็ดสกุล *Ramaria* 35

8 เวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ LSU ของเห็ดสกุล *Ramaria* 35

9 ปริมาตรและสารเคมีที่ใช้ในการเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอกับเวคเตอร์ 37

10 อัตราความเข้มข้นในการทดลองด้วยเทคนิค high performance liquid chromatography (HPLC) 46

11 ชนิดของเห็ดปะการังที่พบในการศึกษาครั้งนี้ 49

12 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดปะการังสกุล *Ramaria conjunctipes var. tsugensis* Marr & D.E. Stuntz และ *Ramaria flava* var. *aurea* (Coker) R.H. Petersen 51

13 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดปะการัง *R.* aff. *Rubribrunnescens* และ *R.* aff. *vinosimaculans* 54

14 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดปะการังสกุล *Ramaria* sp. 1 และ *Ramaria* sp. 2 57

15 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดปะการังสกุล *Ramaria* sp. 3 และ *Ramaria* sp. 4 60

16 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดปะการังสกุล *Ramaria* sp. 5 และ *Ramaria* sp. 6 63

17 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดปะการังสกุล *Ramaria* sp. 7 และ *Ramaria* sp. 8 67

บัญชีตาราง (ต่อ)

ตาราง **หน้า**

18 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดปะการังสกุล *Ramaria* sp. 9 และ *Ramaria* sp. 10 69

19 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดปะการังสกุล *Phaeoclavulina cokeri* (R.H. Petersen) Giachini และ *Lentaria* sp. 72

20 ผลการเทียบเคียงของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณLSUและITSโดยโปรแกรมBAST กับฐานข้อมลู GenBank และ Unite 82

21 น้ำหนักสารสกัดจากดอกเห็ด *Ramaria*, *Phaeoclavulina* และ *Lentaria* ด้วยตัวทำละลายเอทานอล และเอทิลอะซิเตท 90

22 ประสิทธิภาพในการยับยั้งและการทำลายจุลินทรีย์ของสารสกัดจากเอทานอลของเห็ดปะการัง 93

23 ประสิทธิภาพของสารสกัดจากเห็ดปะการังในการต้านอนุมูลอิสระ สารฟลาโว-นอยด์และสารประกอบฟีนอลทั้งหมด 98

24 ประสิทธิภาพของสารสกัดจากเห็ดปะการังในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ alpha- glucosidase และ alpha-amylase 100

25 ประสิทธิภาพของสารสกัดจากเห็ดปะการังในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA reductase 101

26 ผลของพีคสารสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลจาก *Ramaria*, *Lentaria* ซึ่งตรวจวัดได้ที่เวลาต่างๆด้วยเทคนิค HPLC 103

27 การวิเคราะห์ชนิดสารประกอบฟีนอลจากสารสกัดเห็ด *Ramaria*, *Phaeoclavulina* และ *Lentaria* ด้วยวิธี HPLC-ESI-MS 105

28 ปริมาณสารประกอบกรดฟีนอลิกชนิดต่างๆ ที่ตรวจพบจากสารสกัดจากเห็ดปะการังด้วยเทคนิค MRM-MS/MS โดยเทียบกับสารมาตรฐาน 111

บัญชีภาพประกอบ

ตาราง **หน้า**

1 ภาพตัวอย่างเห็ดปะการังในสกุล *Ramaria* 5

2 ภาพวาดลายเส้นของดอกเห็ดสกุล *Ramaria* แสดงส่วนประกอบต่างๆ รวมทั้งการนับชั้นของการแตกกิ่ง..... 10

3 ภาพวาดลายเส้นของดอกเห็ดสกุล *Ramaria* แสดงลักษณะของโคนและก้านดอก ... 11

4 ภาพวาดลายเส้นรัศมีการแตกกิ่งของเห็ดปะการังและตัวอย่างชนิดของเห็ดปะการัง..... 12

5 ภาพวาดลายเส้นของตัวอย่างโครงสร้างที่พบในเห็ดสกุล *Ramaria* 14

6 ภาพวาดลายเส้นของตัวอย่างรูปแบบของซิสทิเดีย (cystidia)..... 15

7 ภาพวาดลายเส้นของเบสิดิโอสปอร์ แสดงลวดลายบนผิวสปอร์แบบต่างๆ 16

8 ตัวอย่างโครงสร้างทางเคมีของสารต้านอนุมูลอิสระ 20

9 แผนภาพแสดงตำแหน่งของไพรเมอร์ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ ITS และ LSU 33

10 *R. conjunctipes* var. *tsugensis* PKWS14-18 52

11 *R. flava* var. *aurea* PKWS15-173 53

12 *R.* aff. *rubribrunnescens* PKWS14-47 55

13 *R.* aff. *vinosimaculans* PKWS15-109 56

14 *R.* sp. 1 PKWS15-95 58

15 *R.* sp. 2 PKWS15-221 59

16 *R.* sp. 3 PKWS14-02 61

17 *R.* sp. 4 PKWS14-46 62

18 *R.* sp. 5 PKWS15-214 65

19 *R.* sp. 6 PKWS15-232 66

20 *R.* sp. 7 PKWS14-12 68

21 *R.* sp. 8 PKWS14-30 68

22 *R.* sp. 9 PKWS15-92 70

23 *R.* sp. 10 PKWS15-181 71

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ตาราง **หน้า**

24 *P. cokeri* PKWS15-194 74

25 *L.* sp. PKWS15-164 75

26 เจลอิเล็กโตโฟรีซิสของการเพิ่มจำนวนบริเวณ LSU 80

27 เจลอิเล็กโตโฟรีซิสของการเพิ่มจำนวนบริเวณ ITS 81

28 ภาพแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเห็ดปะการังสกุล *Ramaria* โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ LSU ด้วยวิธี Bayesian 86

29 ภาพแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเห็ดปะการังสกุล *Ramaria* โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1-5.8S rDNA ด้วยวิธี Bayesian 88

30 ภาพแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเห็ดปะการังสกุล *Lentaria* โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1-5.8S rDNA ด้วยวิธี Bayesian 89

31 ผลการทดสอบสารสกัด ด้วยเอทานอลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion 91

32 กราฟแสดงประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูล อิสระของสารสกัดจาก *Ramaria*, *Phaeoclavulina* และ *Lentaria* 95

33 กราฟมาตรฐานของ Quercetin 96

34 กราฟมาตรฐานของ Gallic acid 97

35 โครงสร้างทางเคมีของสารที่ได้จากการเทียบเคียงน้ำหนักโมเลกุลของสารกับฐานข้อมูล massbank 109

36 TA cloning vector แสดงตำแหน่งที่มีการแทรกชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการ 150

37 กราฟความสัมพันธ์ของสารประกอบฟีนอลทั้งหมดกับคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ 153

38 กราฟผลการวิเคราะห์ของสาร acarbose 154

39 กราฟการทำงานขอเอนไซม์ HMG CoA reductase 155

บทที่ 1
บทนำ

ภูมิหลังและความสำคัญของปัญหา

เห็ดสกุล *Ramaria* จัดอยู่ในไฟลัม Basidiomycota (วงศ์ Gomphaceae) เป็นหนึ่งในกลุ่มของเห็ดปะการัง (coral fungi) ที่มีจำนวนชนิดมากที่สุด เห็ดสกุลนี้มีรูปร่างลักษณะของดอกเห็ดเป็นแท่งตั้งขึ้น แตกกิ่งก้านคล้ายปะการังในท้องทะเล (coral-like structure) มีสีสันสวยงามสะดุดตา เช่น สีเหลือง สีน้ำตาล สีน้ำเงิน สีชมพู และสีส้ม บางชนิดดำรงชีวิตเป็นเอคโตไมคอร์ไรซา (ectomycorrhiza) อยู่ร่วมกับรากพืชแบบพึ่งพาอาศัย (symbiosis) พบมากในบริเวณป่าสน หรือสนผสมเต็งรังในสภาพดินค่อนข้างเป็นกรดอ่อน[1] บางชนิดสามารถรับประทานได้ เช่น *Ramaria flava* และ *R. botrytis* ในขณะที่บางชนิดไม่สามารถรับประทานได้เนื่องจากมีสารพิษ เช่น *R. formosa* และ *R. pallida*[2] เห็ดสกุล *Ramaria* บางชนิดมีรายงานว่าสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ เช่น สารต้านการเจริญของจุลินทรีย์ สารต้านการเจริญของเซลล์มะเร็ง และสารต้านอนุมูลอิสระ เป็นต้น[1] ตัวอย่าง *R. flava* นอกจากจะสามารถรับประทานได้แล้ว ยังพบว่าสารสกัดในชั้นเอทานอลมีคุณสมบัติต้านการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านม (IC_{50} = 66.54 µg/mL) มะเร็งปอด (IC_{50} = 743.99 µg/ mL) และมะเร็งกระเพาะอาหาร (IC_{50} = 134.44 µg/ mL)[1] ได้อีกด้วย ส่วน *R. subaurantiaca* สามารถออกฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย (*Plasmodium falciparum* สายพันธุ์ 3D7) ซึ่งสารดังกล่าวได้แก่ pistillaria (IC_{50} = 0.23 µM) และ spermatinamine (IC_{50} = 1.9 µM)[3] ในขณะที่ *R. madagascariensis* นอกจากจะมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและเซลล์มะเร็งแล้ว ยังพบสารชนิดใหม่ในกลุ่ม bicyclic hemiacetal อีกด้วย ส่วน *R. subalpina* ซึ่งเป็นชนิดที่รับประทานได้ มีรสชาติดี ราคาแพง และยังมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ[4] เมื่อไม่นานมานี้มีรายงานว่า *R. largentii* มีคุณสมบัติในการต้านพิษ (antigenotoxicity) และต้านอนุมูลอิสระได้[5] อย่างไรก็ตามการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเห็ดปะการังในประเทศไทยนั้นยังไม่เคยมีรายงานการศึกษาหรือข้อมูลตีพิมพ์มาก่อน

ทั้งนี้จำนวนชนิดของเห็ดสกุล *Ramaria* ที่มีรายงานแล้วมีจำนวนไม่น้อยกว่า 200 สปีชีส์ทั่วโลก[6] แต่ในประเทศไทยมีรายงานเพียง 32 สปีชีส์ และในจำนวนนี้เป็นรายงานการค้นพบครั้งแรกจำนวน 6 สปีชีส์ จากอุทยานแห่งชาติน้ำหนาว จังหวัดเพชรบูรณ์[7-9,16-19] และเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียว จังหวัดชัยภูมิ[18] ทั้งนี้อาจเนื่องจากข้อมูลการศึกษาของเห็ดปะการังในประเทศไทยมีจำนวนน้อย ทำให้ข้อมูลของลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใช้ในการจัดจำแนกชนิดของเห็ดกลุ่มนี้มีจำกัดและไม่ละเอียดเพียงพอในการระบุชนิดที่ถูกต้อง ที่สำคัญยังไม่มีข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างเห็ดสกุล *Ramaria* จากประเทศไทยในฐานข้อมูลนานาชาติ เช่น GenBank และ Unite มาก่อน (สืบค้นเมื่อ

วันที่ 1 พฤษภาคม พ.ศ. 2561) ทำให้ไม่สามารถเทียบเคียงและยืนยันชนิดในระดับสปีชีส์ได้ ที่ผ่านมาการจัดจำแนกชนิดของเห็ดกลุ่มนี้ในประเทศไทยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวซึ่งมีความยุ่งยาก ซับซ้อน และต้องอาศัยประสบการณ์ของผู้เชี่ยวชาญ เนื่องจากตัวอย่างเห็ดราที่พบในประเทศไทยนั้นมีความหลากหลายสูงทั้งชนิดพันธุ์และรูปร่างลักษณะ ซึ่งส่วนใหญ่ต่างไปจากตำราที่มีรายงานในต่างประเทศ[6] แม้ว่าในปี 2553 ที่ผ่านมาได้มีงานวิจัยที่ศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเห็ดปะการังจากอุทยานแห่งชาติน้ำหนาวด้วยเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล Amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) ก็ตาม แต่เป็นการเปรียบเทียบเฉพาะกลุ่มเห็ดที่ศึกษาในพื้นที่เท่านั้น รวมทั้งไม่ได้ศึกษาถึงลำดับนิวคลีโอไทด์[7] ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงเน้นการจัดจำแนกชนิดของเห็ดสกุล *Ramaria* โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะพันธุกรรมโดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สามารถใช้ในการระบุชนิดได้ เพื่อใช้เป็นฐานข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของเห็ดชนิดนี้ในประเทศไทย โดยเลือกศึกษาเห็ดปะการังในพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียว จังหวัดชัยภูมิ เนื่องจากมีสภาพภูมิอากาศเหมาะสมในการเจริญ มีความอุดมสมบูรณ์ โดยพื้นที่ส่วนใหญ่เป็นป่าเต็งรัง ป่าสนผสมเต็งรัง และป่าดงดิบแล้ง ที่สำคัญมีรายงานการศึกษาเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาหลายชนิดที่ยังไม่สามารถระบุชนิดได้[18] จากนั้นศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเห็ดสกุล *Ramaria* สายพันธุ์ต่างๆ ที่แยกได้ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ต้านการเจริญของจุลินทรีย์ ต้านการเจริญของเซลล์มะเร็ง ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยน้ำตาล และสังเคราะห์คอเลสเตอรอล เป็นต้น

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อเก็บรวบรวมและจัดจำแนกชนิดของเห็ดสกุล *Ramaria* และสกุลใกล้เคียงโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางชีววิทยาโมเลกุล จากป่าสนผสมเต็งรัง เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียว จังหวัดชัยภูมิ

2. เพื่อสกัดและศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเห็ดสกุล *Ramaria* และสกุลใกล้เคียงในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ต้านการเจริญของจุลินทรีย์ ต้านการเจริญของเซลล์มะเร็ง ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยน้ำตาล และการสังเคราะห์คอเลสเตอรอล

3. เพื่อศึกษารูปแบบทางเคมีของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดเห็ดสกุล *Ramaria* และสกุลใกล้เคียงด้วยเทคนิค High performance liquid chromatography (HPLC)

4. เพื่อวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลจากสารสกัดเห็ดสกุล *Ramaria* และสกุลใกล้เคียง ด้วยเทคนิค Liquid chromatography electronspray ionization mass spectrophotometry (LC-ESI-MS)

ขอบเขตงานวิจัย

ตัวอย่างเห็ดสกุล *Ramaria* ที่รวบรวมจากพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียว จังหวัดชัยภูมิ ประเทศไทย นำมาแยกเพาะเลี้ยงและจัดจำแนกชนิดโดยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางพันธุกรรมโดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ internal transcribed spacers (ITS) และ large subunit ribosomal DNA (LSU) แล้วนำไปเทียบเคียงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank และ Unite ศึกษาความสัมพันธ์โดยการสร้างแผนภูมิเชิงวิวัฒนาการต้นไม้ จากนั้นคัดเลือกตัวแทนไปสกัดสารด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมเพื่อทดสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น สารต้านอนุมูลอิสระ ต้านการเจริญของจุลินทรีย์ ต้านการเจริญของเซลล์มะเร็ง และ ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยน้ำตาลและการสังเคราะห์คอเลสเตอรอล จากนั้นนำสารสกัดไปศึกษาสารประกอบฟีนอลด้วยเทคนิค LC-ESI-MS เพื่อวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมี

ผลที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย

1. ข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาและข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS และ LSU เพื่อใช้ระบุชนิดในระดับสปีชีส์ของเห็ดสกุล *Ramaria* จากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียว จังหวัดชัยภูมิ รวมทั้งแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของชนิดเห็ดที่พบในประเทศไทยกับต่างประเทศ

2. ข้อมูลสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเห็ดสกุล *Ramaria* ในด้านการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ สารต้านการเจริญของจุลินทรีย์ สารต้านการเจริญของเซลล์มะเร็ง และ สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยน้ำตาล และการสังเคราะห์คอเลสเตอรอล เพื่อเป็นข้อมูลในการศึกษาเชิงลึกต่อไป

3. ข้อมูลรูปแบบทางเคมีของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดเห็ดสกุล *Ramaria* จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS รวมทั้งโครงสร้างทางเคมีของสารสกัดที่น่าสนใจดังกล่าว

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. เห็ดสกุล *Ramaria* และความหลากหลายในประเทศไทย

เห็ดปะการังในสกุล *Ramaria* S. F. Gray emend. Donk เป็นหนึ่งในกลุ่มเห็ดปะการัง (coral fungi) ที่มีจำนวนชนิดมากกว่า 200 สปีชีส์ (จากจำนวนเห็ดปะการังทั้งสิ้น 540 สปีชีส์) อยู่ในวงศ์ Gomphaceae จัดจำแนกตามหลักอนุกรมวิธานได้ดังนี้[6]

Kingdom : Fungi

Phylum : Basidiomycota

Class : Basidiomycetes

Order : Gomphales

Family : Gomphaceae

Genus : *Ramaria*

ทั้งนี้ยังสามารถแบ่งเป็นสกุลย่อยหรือ subgenus ได้ 4 สกุลย่อย โดยอาศัยลักษณะของลวดลายบนผิวสปอร์ การปรากฏของโครงสร้างแคลมป์ คอนเนคชัน (clamp connection) เป็นต้น ได้แก่ subgenus *Echinoramaria*, *Laeticolora*, *Lentoramaria* และ *Ramaria*[6]

เห็ดสกุล *Ramaria* มีรูปร่างลักษณะของดอกเห็ดแตกกิ่งก้านคล้ายปะการังในท้องทะเล มีสีสันหลากหลาย เช่น สีเหลือง สีน้ำตาล สีน้ำเงิน สีชมพู และ สีส้ม บางชนิดดำรงชีวิตเป็นเอคโตไมคอร์ไรซา (ectomycorrhiza) (ภาพประกอบ 1) อยู่ร่วมกับรากพืชแบบพึ่งพาอาศัย (symbiosis) พบมากในบริเวณป่าสนหรือสนผสมเต็งรังในดินที่มีสภาพค่อนข้างเป็นกรดอ่อน บางชนิดสามารถรับประทานได้ เช่น *Ramaria aurea, R. botrytis, R. botrytoides, R. cyanocephala, R. fennica* และ *R. flava*[1,6,7,8,9] แต่บางชนิดไม่สามารถรับประทานได้ เช่น *R. formosa* และ *R. pallida* เนื่องจากมีสารพิษทำให้เกิดอาการวิงเวียน คลื่นไส้ อาเจียน และท้องเดินได้ แต่มักไม่ทำให้ถึงชีวิต ยกเว้นเกิดอาการแพ้ที่รุนแรง[2]

ภาพประกอบ 1 ตัวอย่างเห็ดปะการังในสกุล *Ramaria* (a) *Ramaria flava* (b) *R. formosa* (c) *R. botrytis* (d) *R. asiatica* (e) *R. aurea* และ (f) *R. apiculata*

ที่มา: (a) *Wikipedia*. (2009). Retrieved April 16, 2017 from https:// en.wikipedia.org/wiki/Ramaria_flava#/media/File:AD2009Sep06_Ramaria_flava_01.jpg.[10] (b) *Ronald L. Exeter*. (2014). Retrieved April 16, 2017 from http://www.mykoweb. com /CAF/species/Ramaria_formosa.html. (online)[11] (c) *David Noble*. (2014). Retrieved April 16, 2017 from http://www.david-noble.net/ Tasmania/Reserve Apr14/ Acropolis2.html. (online).[12] (d) *Daniel Winkler*. (2009). Retrieved April 16, 2017 from http://mushroaming.com/ Bhutan_Mushrooms. (online)[13] (e) *George Barron*. (2012). Retrieved April 16, 2017 from https://atrium.lib. uoguelph.ca/xmlui/handle/10214/4188. (online).[14] (f) *Agorastos Papatsanis.* (2013). Retrieved April 16, 2017 from http://www. discoverwildlife. com/gallery/fabulous-fungi-photo-gallery-agorastos-papatsanis. (online).[15]

ในประเทศไทยมีรายงานจำนวนชนิดของเห็ดสกุล *Ramaria* โดยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียง 32 สปีชีส์ (ตาราง 1) เท่านั้น ซึ่งส่วนใหญ่เป็นรายงานจากภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย[7,8,9] นิวัฒ เสนาะเมือง (2553) รายงานจำนวนชนิดของเห็ด

ปะการังซึ่งเก็บรวบรวมได้จากอุทยานแห่งชาติภูเรือ จังหวัดเลย และอุทยานแห่งชาตินำ้หนาว จังหวัดเพชรบูรณ์จำนวน 9 สปีชีส์ ซึ่งแบ่งออกเป็นเห็ดปะการังสกุล *Ramaria* และ *Phaeoclavulina*[9] (ตาราง 1) โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ต่อมาในปีเดียวกัน แอมมณี มณีวัลย์ (2553) และ Maneevan, et al. (2010) รายงานจำนวนชนิดของเห็ดปะการังที่พบในอุทยานแห่งชาตินำ้หนาว จังหวัดเพชรบูรณ์ โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล Amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ internal transcribed spacers (ITS) ด้วยไพร์เมอร์ ITS1F และ ITS4 จากนั้นย่อยชิ้นดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzymes) แล้วจัดกลุ่มตามขนาดของแถบแบนดีเอ็นเอที่ได้ สามารถจัดจำแนกชนิดเห็ดสกุล *Ramaria* ได้ จำนวน 9 สปีชีส์ ได้แก่ *R. botrytoides*, *R. concolor*, *R. conjunctipes*, *R. cystidiophora* var. *fabiolens*, *R. flava*, *R. rubripermanens*, *R. sanguinipes*, *R. sino-conjunctipes* และ *R. velocimutans*[7,8] ซึ่งในจำนวนนี้เป็นรายงานครั้งแรกในประเทศไทย จำนวน 4 สปีชีส์ ได้แก่ *R. botrytoides*, *R. concolor*, *R. conjunctipes* และ *R. velocimutans*[7] ทั้งนี้ในปี พ.ศ. 2554 Chandrasrikul, et al. (2011) ได้รวบรวมข้อมูลของเห็ดในกลุ่ม Basidiomycetes ในประเทศไทย พบว่ามีจำนวนสปีชีส์ของเห็ดสกุล *Ramaria* ทั้งสิ้น 29 สปีชีส์ (ตาราง 1) ซึ่งต่อมาในปี พ.ศ. 2557 สำนักงานพัฒนาเศรษฐกิจจากฐานชีวภาพ (องค์การมหาชน) ได้แสดงบัญชีรายการทรัพย์สินชีวภาพของเห็ดสกุล *Ramaria* จำนวน 5 สปีชีส์[17] ซึ่งในจำนวนนี้มี 1 สปีชีส์ ที่รายงานครั้งแรกในประเทศไทย ได้แก่ *R. flaviceps* นอกจากนี้ผลการศึกษาของ ปรียาภรณ์ ดอกไม้ (2557) และ Dokmai, et al. (2015) ถึงสังคมราเอคโตไมคอร์ไรซาในป่าสนผสมเต็งรัง พื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียว จังหวัดชัยภูมิ โดยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS พบเห็ดสกุล *Ramaria* จำนวน 7 สปีชีส์ ซึ่งในจำนวนนี้มีเพียง 1 สปีชีส์ ที่สามารถระบุชนิดได้ และเป็นรายงานแรกในประเทศไทยคือ *R. largentii* (ตาราง 1) ในขณะที่อีก 6 สปีชีส์ ยังไม่สามารถระบุชนิดได้ เนื่องจากมีค่าร้อยละความเหมือน (%similarity) ต่ำกว่าร้อยละ 97 กับชนิดของเห็ดสกุล *Ramaria* ในฐานข้อมูล GenBank และ Unite[18,19]

ส่วนในการศึกษาเห็ดปะการังในสกุล *Pheoclavulina* และ *Lentaria* ซึ่งเป็นเห็ดที่มีลักษณะใกล้เคียงกับ *Ramaria* โดยเห็ด *Pheoclavulina* ส่วนใหญ่พบการเจริญบนซากไม้ ก้านและกิ่งของดอกเห็ดมีโทนสีน้ำตาล แต่มีสีของปลายกิ่งที่สดใส ลวดลายบนผิวของเบสิดิโอสปอร์มีลักษณะเป็นหนามแหลมและมีสีน้ำตาล ตัวอย่างเช่น *Phaeoclavulina cokeri* (syn. *Ramaria cokeri*) ที่มีดอกเห็ดสีน้ำตาลอมส้ม และมีกิ่งปลายสีส้มสด ซึ่งในอดีตนั้นถูกจัดอยู่ในสกุล *Ramaria*[21] ในประเทศไทยมีรายงาน 2 สปีชีส์ คือ *P. cyanocephala* และ *P. cokeri*[7][8][9] ส่วนเห็ดปะการังสกุล *Lentaria* จัดอยู่ในวงศ์ Lentariaceae พบการเจริญบนซากไม้ มีเส้นในสีขาวปกคลุมบริเวณที่เจริญ ดอกเห็ดมีสีโทนสี

น้ำตาล เบสิดิโอสปอร์มีลักษณะเป็นแท่งยาวผิวเรียบและไม่มีสี[6] ในประเทศไทยนั้น มีรายงานเพียง 1 ชนิดที่ไม่สามารถระบุสปีชีส์ได้[21]

ตาราง 1 รายชื่อเห็ดสกุล *Ramaria* และ *Phaeoclavulina* ที่มีรายงานในประเทศไทย

รายชื่อเห็ดปะการัง	เอกสารอ้างอิง
Phaeoclavulina cokeri (R.H. Petersen) Giachini	(7)(8)(9)
Phaeoclavulina cyanocephala (Berk. & M.A. Curtis) Giachini	(7)(8)(9)
Ramaria araiospora Marr & D.E. Stuntz.	(16)
Ramaria botrytis (Pers.) Ricken	(16)(17)
Ramaria botrytoides (Peck.) Corner	(7)(8)(9)(16)
Ramaria broomei (Cotton & Wakef.) R.H. Petersen	(16)
Ramaria cacao (Coker) Corner	(16)
Ramaria concolor (Corner) R.H. Petersen	(7)(8)(9)(16)
Ramaria conjunctipes (Coker) Corner	(7)(8)(9)
Ramaria cyanocephala (Berk. & M.A. Curtis) Corner	(7)(8)(9)(16)(17)
Ramaria cystidiophora var. *fabiolens* Marr & D.E. Stuntz.	(7)(8)(9)(16)
Ramaria ochraceovirens (Jungh.) Donk	(16)
Ramaria palmata (Scop.) Holmsk	(16)
Ramaria rubripermannes Marr & D.E. Stuntz.	(7)(8)(9)(16)
Ramaria sanguinea (Pers.) Quél.	(16)(17)
Ramaria sanguinipes R.H. Petersen & M. Zang	(7)(8)(9)(16)
Ramaria sinoconjunctipes R.H. Petersen & M. Zang	(7)(8)(9)(16)(17)
Ramaria stricta (Pers.) Quél.	(16)
Ramaria stricta var. *concolor* Corner	(16)
Ramaria velocimutans Marr & D.E. Stuntz.	(7)(8)(9)(16)
Ramaria eumorpha (P. Karst.) Corner	(16)
Ramaria fennica (P. Karst.) Ricken	(16)

ตาราง 1 (ต่อ)

รายชื่อเห็ดปะการัง	เอกสารอ้างอิง
Ramaria fennica var. *fennica* (P. Karst.) Ricken	(16)
Ramaria flava (Fr.) Quél.	(16)
Ramaria flava (Schaeff.) Quél.	(7)(8)(9)(16)
Ramaria flaviceps Corner, K.S. Thind & Anand	(17)
Ramaria formasa (Pers.) Quél.	(16)
Ramaria fumosiavellanea Marr & D.E. Stuntz.	(16)
Ramaria gracilis (Pers.) Quél.	(16)
Ramaria grandis (Perk) Corner	(16)
Ramaria invalii (Cotton & Wakef.) Donk	(16)
Ramaria largentii Marr & D.E. Stuntz	(18)(19)
Ramaria murrillii (Coker) Corner	(16)
Ramaria nigrescens Brinkmann ex Donk	(16)

2. การจัดจำแนกชนิดเห็ดสกุล *Ramaria*

การจัดจำแนกชนิดของเห็ดสกุล *Ramaria* นั้นต้องอาศัยข้อมูลทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางพันธุกรรมร่วมกันในการระบุชนิด เช่นเดียวกับเห็ดราชนิดอื่นๆ ในกลุ่ม Basidiomycetes ซึ่งอธิบายโดยสังเขปได้ดังนี้

2.1. การจัดจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

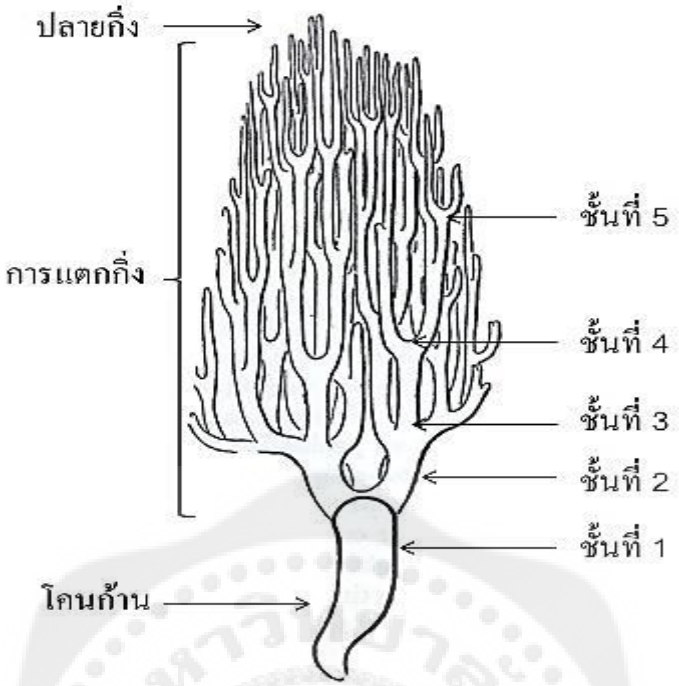
การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ด โดยบันทึกรายละเอียดทั้งหมดที่สังเกตได้ด้วยตาเปล่า และภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (stereomicroscope) เช่น สี ขนาด รูปร่างของดอกเห็ด และการแตกกิ่ง ส่วนลักษณะอื่นที่มีขนาดเล็ก เช่น เบสิเดีย (basidia) และเบสิดิโอสปอร์ (basidiospore) ศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope) ในขณะที่ลวดลายบนผิวสปอร์ศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope) เป็นต้น

2.1.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ

การศึกษาขนาด รูปร่าง ลักษณะต่างๆ ของดอกเห็ด ได้แก่ โคนดอก การแตกกิ่ง ปลายยอด และอื่นๆ ที่สามารถสังเกตได้ทั้งหมด (ภาพประกอบ 2)

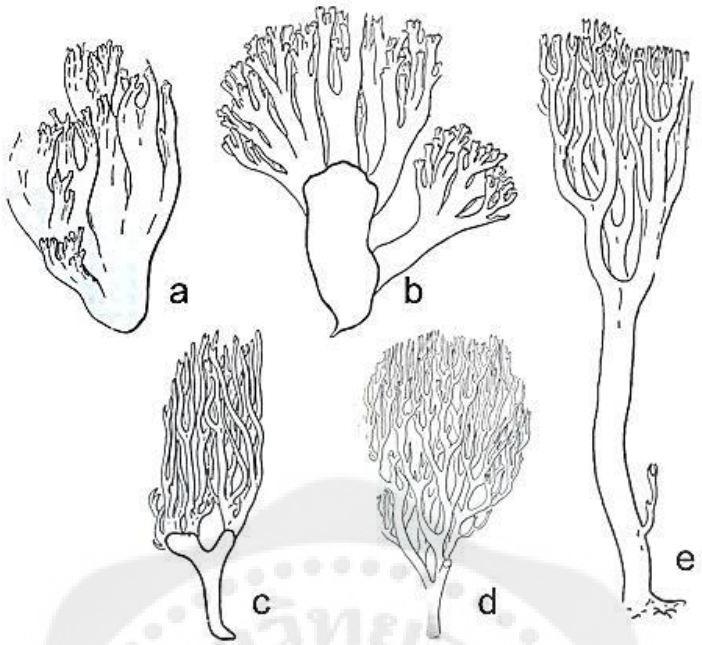
2.1.1.1ลักษณะของโคน (stipes) การแตกกิ่ง (branching) และปลายยอด (tips)

ลักษณะรูปร่าง ขนาด และสีของโคนดอก การแตกกิ่งก้านของดอกเห็ดมีความสำคัญอย่างยิ่งในการจัดจำแนกชนิดของเห็ดสกุล *Ramaria* บางชนิดเมื่อเจริญเต็มที่มีลักษณะของโคนดอกอวบใหญ่ เช่น *R. flavoralba* และ *R. formosa* บางชนิดมีก้านยาว เช่น *R. fragillima*, *R. longicaulis* และ *R. zippelii* ในขณะที่บางชนิดมีก้านเรียวเล็ก เช่น *R. polypus* และบางชนิดมีหลายลักษณะร่วมกันในดอกเดียว (ภาพประกอบ 3) โคนดอกบางชนิดเกิดจากการรวมกันของก้านเล็กๆ หลายๆ ก้าน (fascilalate) (ภาพประกอบ 3a, d, e) บางชนิดเกิดจากก้านใหญ่ที่หลอมรวมกัน (compound) แล้วแตกเป็นก้านเล็กหลายก้าน (ภาพประกอบ 3b, c) นอกจากขนาดของโคนแล้ว ลักษณะของผิวสัมผัส เช่น เรียบ ขรุขระ หรือการมีเมือกคล้ายเจลาติน รวมทั้งความเหนียว หรือเปราะของดอกเห็ดล้วนแต่มีความสำคัญในการจัดจำแนกชนิดทั้งสิ้น[6,21]



ภาพประกอบ 2 ภาพวาดลายเส้นของดอกเห็ดสกุล *Ramaria* แสดงส่วนประกอบต่างๆ รวมทั้งการนับชั้นของการแตกกิ่ง

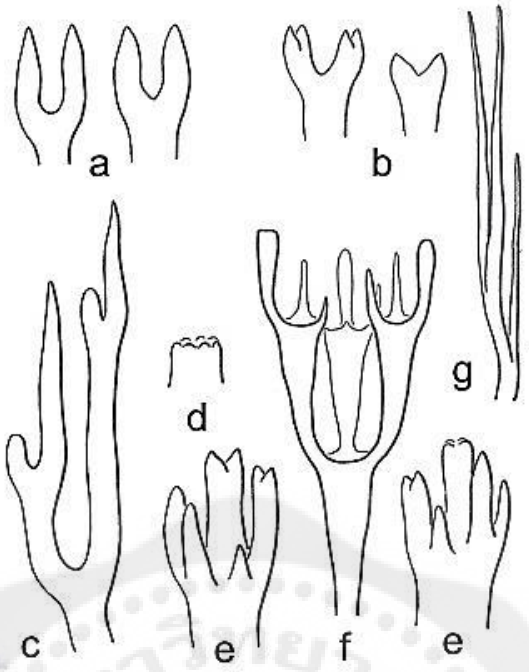
ที่มา: Corner. (2005). A monograph of *Clavaria* and allied genera. pp. 543-636.[6]



ภาพประกอบ 3 ภาพวาดลายเส้นของดอกเห็ดสกุล *Ramaria* แสดงลักษณะของโคนและก้านดอก (a) *R. flavoralba*, (b) *R. formosa*, (c) *R. longicaulis*, (d) *R. zippelii* และ (e) *R. polypus*

ที่มา: Corner. (2005). A monograph of *Clavaria* and allied genera. pp. 543-636. [6]

ส่วนลักษณะของการแตกกิ่ง รัศมีของกิ่ง จำนวนชั้น จำนวนกิ่งในแต่ละชั้น (ภาพประกอบ 2) เป็นอีกลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจัดจำแนกชนิดของเห็ดสกุล *Ramaria* บางชนิดแตกกิ่งแบบทีละคู่ที่สมมาตรกัน (symmetrical dichotomy) เช่น *R. fragillima* บางชนิดแตกกิ่งแบบไขว้ทแยง (decussation) เช่น *R. zippelii* บางชนิดแตกกิ่งทีละคู่ที่ไม่สมมาตรกัน (unequal dichotomy) หรือแตกแบบหลายกิ่งเท่าๆ กัน (polychrotomy) เช่น *R. zippelii* หรือการแตกหลายกิ่งแบบเจริญไม่เท่ากัน (unequal development of branches) (ภาพประกอบ 4) ทั้งนี้เห็ดสกุล *Ramaria* เป็นเห็ดปะการังที่มีการแตกกิ่งมาก และซับซ้อนที่สุดเมื่อเทียบกับเห็ดปะการังสกุลอื่น เช่น *Clavaria*, *Lentaria*, *Phaeoclavulina* และ *Ramariopsis*[6,21]



ภาพประกอบ 4 ภาพวาดลายเส้นรัศมีการแตกกิ่งของเห็ดปะการังและตัวอย่างชนิดของเห็ดปะการัง (a) symmetrical dichotomy (*Ramaria fragillima*), (b) decussation (*R. zippelii*), (c) unequal dichotomy (*R. fragillima*), (d) polychotomy (*R. zippelii*), (e) unequal development of branches, (f) pyxidate branching (*Clavicorona candelabrum*) และ (g) attenuate tips (*Lentaria surculus*)

ที่มา: Corner. (2005). A monograph of *Clavaria* and allied genera. pp. 543-636. [6]

นอกจากนี้ลักษณะของปลายยอด เช่น ปลายแหลม ปลายทู่ หรือปลายที่มีการแตกยอดทีละ 2 ยอด หรือ 4 ยอด ล้วนใช้ในการจำแนกชนิดซึ่งบางชนิดสังเกตยาก โดยเฉพาะสปีชีส์ที่มีความใกล้ชิดกันมากหรือดอกเห็ดที่ยังเจริญไม่เต็มที่ โดยเห็ดสกุล *Ramaria* นั้น พบการแตกของปลายยอด ทีละ 2 ยอด หรือ 4 ยอด โดยการแตกของปลายยอดทีละ 2 ยอด มักเป็นปลายแหลม ส่วนการแตกปลายยอดทีละ 4 ยอด มักเป็นปลายทู่เมื่อสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ[23]

2.1.1.2 ลักษณะของสีดอก รอยช้ำ และลักษณะอื่นๆ

สีของดอกเห็ดและรอยช้ำเป็นอีกหนึ่งลักษณะที่สำคัญ เนื่องจากสีดอกสามารถใช้จำแนกชนิดของเห็ดบางสปีชีส์ได้ และสามารถบอกได้ถึงสีของสปอร์เห็ดบางสปีชีส์อีกด้วย ตัวอย่าง *Ramaria* subgenus *Lentoramaria* และ subgenus *Echinoramaria* สีดอกส่วนใหญ่ มีโทนสีน้ำตาลหรือสีดิน ส่วน subgenus *Ramaria* และ subgenus *Laeticolora* มักมีสีสันสดใส เช่น สีชมพู สีส้ม และสีแดง เป็นต้น ส่วนรอยช้ำของดอกเห็ดเกิดเมื่อดอกเห็ดถูกแรงกระทำจากภายนอก เช่น แรงตัดหรือแรงบีบบริเวณโคนดอกหรือกิ่ง ทำให้เนื้อเยื่อดอกเห็ดมีสีเปลี่ยนไป เช่น เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล สีแดง สีแดงอมน้ำตาล สีม่วงอมน้ำตาล สีเขียว และสีแดงอมม่วง ซึ่งมักจะเห็นการเปลี่ยนสีเมื่อดอกเห็ดสดเท่านั้น[22]

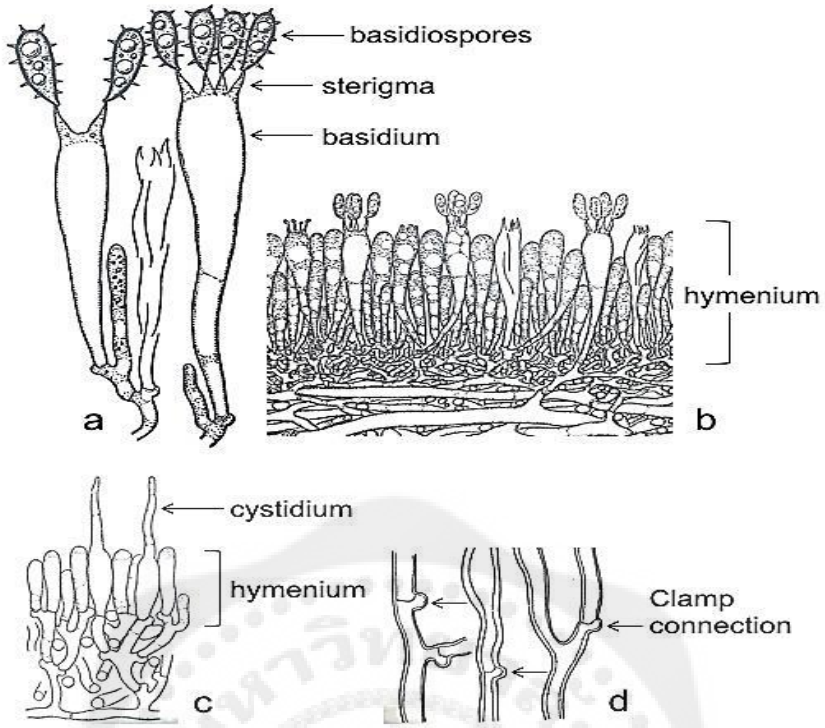
ส่วนลักษณะอื่นๆ ที่ใช้ในการจัดจำแนกชนิด เช่น การชิมรส เนื่องจากเห็ดแต่ละชนิดมีรสชาติเฉพาะตัว ซึ่งการชิมนั้นทำโดยตัดดอกเห็ดเป็นชิ้นเล็ก แล้วนำไปสัมผัสที่ลิ้นหรือเคี้ยวเพียงเล็กน้อย จากนั้นคายออก เนื่องจากบางชนิดมีพิษ โดยรสชาติเห็ดมีทั้งรสอ่อน รสฝาด รสขม และรสเผ็ด[21,22]

2.1.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

การศึกษาลักษณะต่างๆ ที่มีโครงสร้างขนาดเล็กต้องใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง เช่น รูปร่างลักษณะของเบสิดิโอสปอร์ (basidiospore) เบสิเดียม (basidium) ซิสทีเดีย (cystidia) และแคลมป์ คอนเนคชัน (clamp connection) ซึ่งมีความสำคัญอย่างยิ่งในการจัดจำแนกชนิดโดยเฉพาะในระดับสปีชีส์

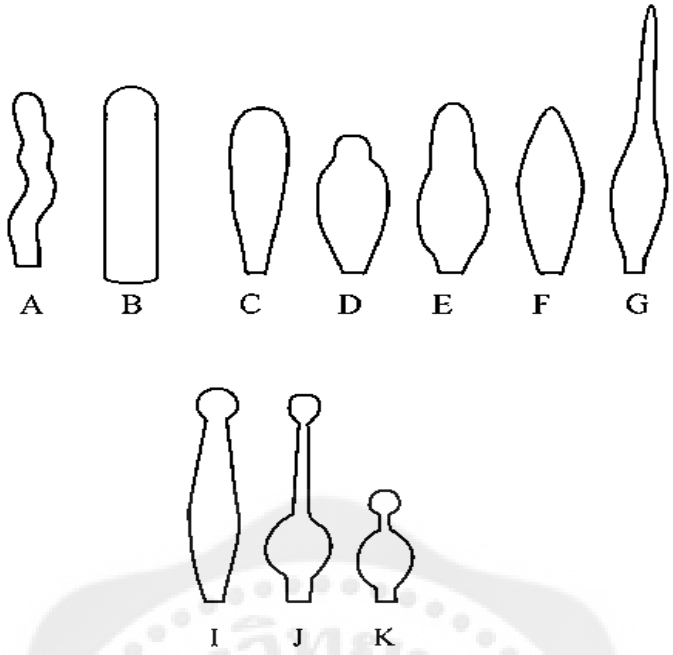
2.1.2.1 รูปร่างลักษณะของเบสิเดียม (basidium) ซิสทีเดีย (cystidia) และ แคลมป์ คอนเนคชัน (clamp connection)

ลักษณะเบสิเดียมของเห็ดสกุล *Ramaria* เป็นแบบ holobasidium (ภาพประกอบ 5a) มีสเตอริกมา (sterigma) ทำหน้าที่ยึดสปอร์ไว้เหมือนหนามขนาดเล็กตั้งขึ้น ส่วนชั้นของไฮเมเนียม (hymenium) พบทั้งหนาและ/หรือบางขึ้นอยู่กับสปีชีส์ บางชนิดพบซิสทีเดีย (ภาพประกอบ 6) เช่น *R. polypus* และ *R. cystidiophora* ในขณะที่บางชนิดไม่พบซิสทีเดีย ส่วนลักษณะของเส้นใยมักพบโครงสร้างของแคลมป์ คอนเนคชั่น (ภาพประกอบ 5)



ภาพประกอบ 5 ภาพวาดลายเส้นของตัวอย่างโครงสร้างที่พบในเห็ดสกุล *Ramaria* (a) เบสิเดีย และสเตอริกมา, (b) ชั้นไฮเมเนียม, (c) ซิสทีเดียที่พบในชั้นไฮเมเนียม และ (d) โครงสร้างแคลมป์คอนเนคชัน

ที่มา: Corner. (2005). A monograph of *Clavaria* and allied genera. pp. 543-636. [6]



ภาพประกอบ 6 ภาพวาดลายเส้นของตัวอย่างรูปแบบของซิสทิเดีย (cystidia) ตัวอย่าง เช่น (a) moniliform (b) cylindrical (c) clavate และ (d) uniform เป็นต้น

ที่มา: Dictionary of the Fungi. (2016). Retrieved April 16, 2017 from http://www.davidmoore.org.uk/21st_Century_Guidebook_to_Fungi_PLATINUM/Assets/Hyphal_differentiation_Resources.html [24]

2.1.2.2 รูปร่างลักษณะ สี ขนาด และลวดลายบนผิวเบสิดิโอสปอร์

เบสิดิโอสปอร์ของเห็ดสกุล *Ramaria* ส่วนใหญ่พบจำนวน 4 สปอร์ มีส่วนน้อยที่พบ 1-3 สปอร์ สีของสปอร์สามารถพบได้ทั้งสีใส สีเหลือง สีน้ำตาล หรือสีสนิม รูปร่างลักษณะของสปอร์มีความหลากหลาย บางชนิดรูปร่างกลม รี หรือรูปไข่ บางชนิดอาจมีลักษณะของส่วนปลายใหญ่กว่าส่วนโคน ทั้งนี้ลักษณะของผิวสปอร์เป็นอีกลักษณะที่มีความสำคัญในการระบุชนิด เช่น ลักษณะผิวเรียบ (smooth) ลักษณะผิวขรุขระมีลวดลายตามยาว (striate) ลักษณะขรุขระมีลวดลายตุ่มนูนกระจายทั่วสปอร์ (verrucose หรือ warted) และลักษณะขรุขระมีหนาม (echinulate หรือ spiny) (ภาพประกอบ 6) ทั้งนี้ ส่วนใหญ่ต้องศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

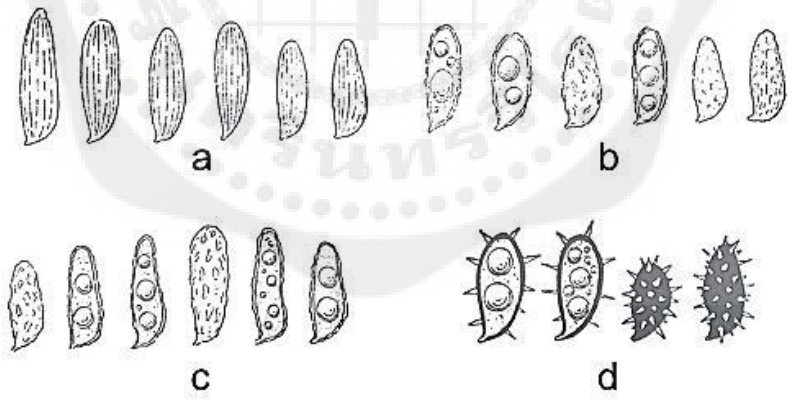
(scanning electron microscope) ซึ่งลักษณะลวดลายบนผิวสปอร์สามารถใช้ในการจัดจำแนกชนิดในระดับ subgenus ได้ ดังนี้

subgenus *Echinoramaria* ผิวสปอร์มีลักษณะขรุขระมีหนาม พบแคลมป์ คอนเนคชั่น ดอกเห็ดมีสีไม่สดใส ส่วนใหญ่เป็นโทนสีน้ำตาล (dingyochraceous ถึง brown) Type species คือ *R. cyanocephala*

subgenus *Lentoramaria* ผิวสปอร์เรียบหรือขรุขระเป็นตุ่มนูน พบแคลมป์ คอนเนคชั่น ดอกเห็ดเจริญบนไม้ มีขนาดเล็กถึงขนาดกลาง โทนสีน้ำตาล Type species คือ *R. stricta*

subgenus *Ramaria* ผิวสปอร์ขรุขระเป็นตุ่มนูนหรือเป็นลายทาง ส่วนใหญ่มีความยาวเฉลี่ยมากกว่า 11 ไมโครเมตร พบแคลมป์ คอนเนคชั่น ดอกเห็ดมีสีหลากหลาย ส่วนใหญ่มีสีครีมหรือสีอ่อน และมักพบว่าปลายกิ่งมีสีต่างจากดอกเห็ด เช่น โคนสีขาวปลายสีชมพู เป็นต้น Type species คือ *R. botrytis*

subgenus *Laeticolora* ผิวสปอร์เรียบหรือขรุขระเป็นตุ่มนูน สปอร์มีความยาวเฉลี่ยน้อยกว่า 11 ไมโครเมตร บางชนิดพบแคลมป์ คอนเนคชั่น บางชนิดไม่พบ ดอกเห็ดมีสีสดใส ซึ่ง subgenus นี้พบมากที่สุด Type species คือ *R. formosa*[22]



ภาพประกอบ 7 ภาพวาดลายเส้นของเบสิดิโอสปอร์ แสดงลวดลายบนผิวสปอร์แบบต่างๆ (a) ลักษณะผิวเป็นลายทาง (*Ramaria botrytis*), (b) ลักษณะผิวขรุขระเป็นตุ่มนูน (*R. formosa*), (c) ลักษณะผิวขรุขระเป็นตุ่มนูน (*R. flava*) และ (d) ลักษณะผิวขรุขระมีหนาม (*R. fragillima*)

ที่มา: Corner. (2005). A monograph of *Clavaria* and allied genera. pp. 543-636. [6]

2.1.3 การศึกษาการเกิดปฏิกิริยาเคมี

การเกิดสีของปฏิกิริยาเคมีระหว่างเนื้อเยื่อเห็ดสดกับสารละลายเคมี สามารถใช้เป็นข้อมูลในการจัดจำแนกชนิดของเห็ดราหลายชนิด รวมทั้งเห็ดสกุล *Ramaria* ซึ่งนิยมใช้สารละลาย 3 ชนิด ได้แก่ สารละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์ (KI) เข้มข้น 10% โดยทำปฏิกิริยากับเนื้อเยื่อดอกเห็ดสด พบว่าบางชนิดจะเปลี่ยนสีดอกเห็ดเป็นสีน้ำเงิน (amyloid reaction) บางชนิดไม่เกิดการเปลี่ยนสี (non-amyloid) หรือบางชนิดเป็นสีน้ำตาลแดง (dextrinoid reaction) ส่วนสารละลายเฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4$) เข้มข้น 10% บางชนิดเกิดสีน้ำเงินอมเขียว[26] ในขณะที่สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) เข้มข้น 10% สามารถให้สีที่แตกต่างกัน เช่น *R. fennica* เกิดสีแดงอมม่วง (violaceous) เป็นต้น[26]

2.2 การจัดจำแนกชนิดด้วยวิธีทางชีววิทยาโมเลกุล

เนื่องจากการจัดจำแนกชนิดโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยามีความยุ่งยากซับซ้อนและต้องอาศัยประสบการณ์ความเชี่ยวชาญเฉพาะด้าน ดังนั้นจึงมีการนำเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล เช่น การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) เทคนิค Amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) มาใช้ช่วยในการจัดจำแนกชนิด ซึ่งมีหลายงานวิจัยที่รายงานว่าสามารถใช้ในการจัดจำแนกชนิดเห็ดราได้ ส่วนงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเห็ดปะการังนั้นมีไม่มากนัก ตัวอย่างเช่น งานวิจัยของ Humpert, et al. (2001) ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเห็ดสกุล *Ramaria* และสกุลใกล้เคียง ได้แก่ *Clathrus*, *Clavariadelphus*, *Gautieria*, *Gomphus*, *Hysterangium*, *Kavinia* และ *Pseudocolus* บริเวณบางส่วนของยีน nuclear large subunit ribosomal DNA (nuc LSU rDNA) ขนาดประมาณ 610 bp และดีเอ็นเอของไมโตคอนเดรีย mitochondrial small subunit ribosomal DNA (mt SSU rDNA) ขนาดประมาณ 470 bp จำนวน 51 ตัวอย่าง รวมทั้งสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) พบว่าสปีชีส์ต่างๆ ของเห็ดสกุล *Ramaria* ของ subgenus ต่างๆ ไม่ได้รวมอยู่ใน clade เดียวกันทั้งหมด แต่มีการกระจายแบบ heterogeneity คือบางสปีชีส์แยกกันอยู่คนละ clade ซึ่งสปีชีส์ส่วนใหญ่รวมอยู่ใน clade เดียวกับ *R.* subgenus *Ramaria* ในขณะที่ subgenus อื่นแยกกันอยู่คนละ clade[26] Giachini, et al. (2010) ศึกษาแผนภูมิวิวัฒนาการของเห็ดราในอันดับ Geastrales, Gomphales (รวมถึงวงศ์ Gomphaceae สกุล *Ramaria*), Hysterangiales และ Phallales โดยศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ LSU, mitochondrial small subunit ribosomal DNA (mit-12SrDNA) และ mitochondrial atp6 DNA (mit-atp6-DNA)[20] ผลการศึกษาที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาของ Humpert, et al. (2001) คือเห็ดสกุล *R.* subgenus *Ramaria* รวมอยู่ใน clade เดียวกันมีความสัมพันธ์กันแบบ monophyletic นอกจากนี้

ยังแสดงให้เห็นความสัมพันธ์ของเห็ดสกุลอื่นๆ ที่ใกล้เคียงอีกด้วย[22] Petersen, et al. (2014) ได้เสนอสปีชีส์ใหม่ของเห็ดสกุล *Ramaria* จากประเทศคาซัคสถาน จำนวน 2 สปีชีส์ โดยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลำดับนิวคลีโอไทด์ของ LSU บริเวณ D1-D3 (ขนาด 905 bp) และบริเวณ internal transcribed spacers (ITS) ได้แก่ *R. admiratia* และ *R. calvodistalis*[27] ในประเทศไทยการศึกษาด้วยเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลของเห็ดสกุล *Ramaria* นั้นมีเพียงรายงานของ Maneevun, et al. (2012) ซึ่งศึกษาเห็ดสกุล *Phaeoclavulina* และ *Ramaria* จากอุทยานแห่งชาติน้ำหนาว จังหวัดเพชรบูรณ์ โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทางชีววิทยาโมเลกุล Amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) โดยเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ด้วยไพร์เมอร์ ITS1F และ ITS4 จากนั้นย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzymes) และจัดกลุ่มตามขนาดแถบแบนดีเอ็นเอที่ได้ สามารถจัดจำแนกชนิดเห็ดสกุล *Ramaria* ได้จำนวน 9 สปีชีส์ ซึ่งในจำนวนนี้เป็นเห็ดปะการังชนิดที่มีรายงานครั้งแรกในประเทศไทยจำนวน 4 สปีชีส์ ได้แก่ *Ramaria botrytoides*, *R. concolor*, *R. conjunctipes* และ *R. velocimutans*[7,8] นอกจากนี้ ปรียาภรณ์ ดอกไม้ (2557) และ Dokmai, et al. (2015) ศึกษาความสัมพันธ์ของรากและดอกเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาในพื้นที่ป่าสนผสมเต็งรังในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียว จังหวัดชัยภูมิ โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS พบเห็ดสกุล *Ramaria* จำนวน 7 ตัวอย่าง มีเพียง *R. largentii* เท่านั้นที่สามารถระบุชนิดได้และมีค่าร้อยละความเหมือน (%similarity) กับฐานข้อมูล GenBank และ Unite เท่ากับร้อยละ 99 ในขณะที่อีก 6 ตัวอย่าง ยังไม่สามารถระบุชนิดได้ เนื่องจากมีค่าร้อยละความเหมือนต่ำกว่าร้อยละ 97 ตัวอย่างเช่น *Ramaria* sp. PKBP12-24 (89% similarity กับ *Ramaria* sp. Accession No. DQ365621), *Ramaria* sp. PKBP12-25 (85% similarity กับ *R. gelatiniaurantia* var. *violeitingens* Accession No. EU697261) และ *Ramaria* sp. PKBP12-02 (93% similarity กับ *R. rubribrunnescens* Accession No. EU697262) เป็นต้น[18,19] อย่างไรก็ตามการจัดจำแนกชนิดเห็ดสกุล *Ramaria* ในประเทศไทยนั้นยังเป็นเรื่องที่ยาก นอกจากจะมีข้อมูลของลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่จำกัดและขาดรายละเอียดของเห็ดแต่ละชนิดแล้ว ยังไม่มีข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลอีกด้วย

3. การศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเห็ดสกุล *Ramaria* และเห็ดเอคโตไมคอร์-ไรซาชนิดกินได้

เห็ดสกุล *Ramaria* หลายชนิดดำรงชีวิตเป็นเอคโตไมคอร์ไรซ่า อาศัยอยู่ร่วมกับรากพืชชั้นสูงแบบพึ่งพาอาศัยโดยต่างฝ่ายต่างได้ประโยชน์ร่วมกัน เช่น ราจะผลิตเอนไซม์และกรดอินทรีย์ปรับสภาพดินให้เป็นกรดอ่อน ช่วยในการย่อยเศษซากพืชแล้วดูดซึมสารอาหารเข้าสู่เซลล์ช่วยในการเจริญของพืช โดยเฉพาะธาตุอาหารฟอสฟอรัส ซึ่งมักจับตัวเป็นผลึกภายในดินทำให้พืชนำมาใช้ไม่ได้[28] ในขณะที่พืช

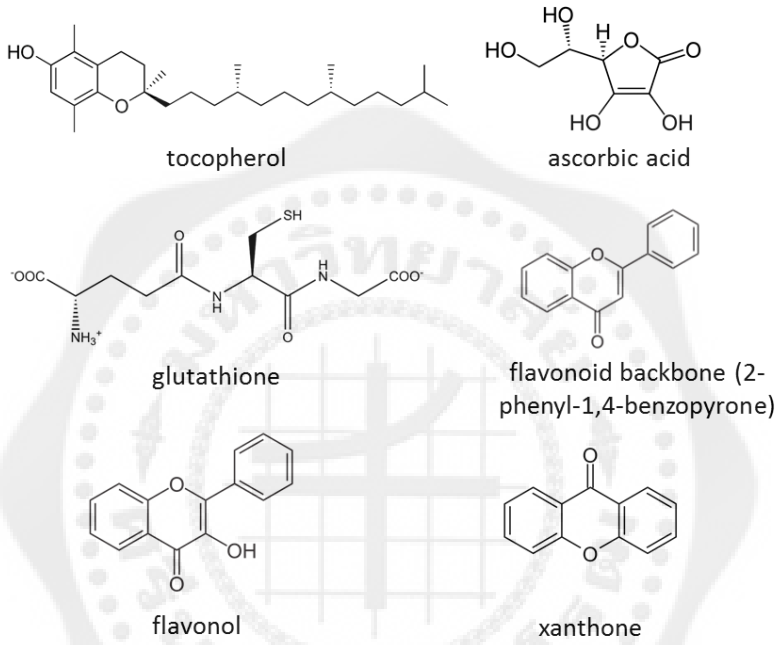
จะให้สารอาหารคาร์โบไฮเดรตและอื่นๆ กับรา ทั้งนี้ในประเทศเกาหลีใต้ได้นำ *R. botrytis* มาใช้เป็นหัวเชื้อในการปลูกต้นกล้าของพืชตระกูลสน *Pinus densiflora* พบว่าสามารถสร้างรากเอคโตไมคอร์ไรซาได้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 325-380 ไมโครเมตร[29] ตัวอย่าง *Ramaria* ที่มีรายงานว่าเป็นเอคโตไมคอร์ไรซ่า เช่น *R. acrisiccescens*, *R. aurea*, *R. celerivirescens*, *R. cyaneigranosa*, *R. flavobrunnescens* var. *aromatica*, *R. largentii*, *R. sandaracina*, *R. spinulosa* และ *R. subbotrytis*[30]

เห็ดสกุล *Ramaria* บางชนิดสามารถรับประทานได้ สารอาหารส่วนใหญ่มักประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต โปรตีน วิตามิน และ เกลือแร่ จัดเป็นอาหารสุขภาพ เหมาะสำหรับผู้ที่ต้องการควบคุมน้ำหนักเนื่องจากมีเส้นใยสูงและแคลอรีต่ำ สำหรับข้อมูลการศึกษาของสารอาหารในเห็ดสกุล *Ramaria* นั้นมีน้อยมาก ตัวอย่างเช่น *R. flava* มีรายงานว่ามีคาร์โบไฮเดรตเท่ากับร้อยละ 65 โปรตีนร้อยละ 35.55 ไนโตรเจนร้อยละ 5.6 ไขมันร้อยละ 5.2 และให้พลังงานเท่ากับ 540 กิโลแคลอรีต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้งของดอกเห็ด นอกจากนี้ยังเป็นแหล่งของ Zn, Mn, Fe และ Cu อีกด้วย[31] ปัจจุบันการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและสรรพคุณทางยาจากเห็ดราโดยเฉพาะเห็ดที่สามารถรับประทานได้มีจำนวนเพิ่มสูงขึ้น เช่น ประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ สารต้านการเจริญของจุลินทรีย์ สารต้านเซลล์มะเร็ง สารลดระดับน้ำตาล และสารลดการอักเสบ เป็นต้น

3.1 สารต้านอนุมูลอิสระ

สารอนุมูลอิสระ (free radical) เป็นสารที่มีอิเล็กตรอนไม่ครบคู่ในวงรอบอะตอม หรือมีอิเล็กตรอนเดี่ยว (unpaired electron) ซึ่งเป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียร จึงสามารถไปดึงอิเล็กตรอนจากโมเลกุลของสารอื่นๆ ทำให้เกิดปฏิกิริยาต่อเนื่องกันเป็นลูกโซ่ เกิดการทำลายเซลล์ในร่างกาย และอาจเป็นสาเหตุของโรคต่างๆ เช่น โรคมะเร็ง โรคหลอดเลือดหัวใจ และโรคความจำเสื่อม เป็นต้น ตัวอย่างของอนุมูลอิสระ เช่น superoxide ($O_2^{\bullet-}$), hydroxyl ($HO^{\bullet}$), hydroperoxyl ($HO_2^{\bullet}$), carbonate radical ($CO_3^{\bullet}$) และ nitrate radical ($NO_3^{\bullet}$) ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) คือสารที่สามารถหยุดการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของสารอนุมูลอิสระได้ หรือสามารถกำจัดอนุมูลอิสระได้ ทั้งนี้สารต้านอนุมูลอิสระมีทั้งชนิดที่เป็นเอนไซม์ เช่น superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX), glutathione reductase (GR) และชนิดที่ไม่ใช่เอนไซม์ เช่น วิตามินอี (tocopherol), วิตามินซี (ascorbic acid), กลูต้าไธโอน (glutathione), แซนโทน (xanthone) และสารประกอบฟีนอล (phenolic compounds) เป็นต้น ซึ่งสารในกลุ่มของสารประกอบฟีนอลนั้นเป็นสารกลุ่มใหญ่ประกอบด้วยโครงสร้างที่เป็นวงแหวนมีหมู่ไฮดรอกซิลอย่างน้อยหนึ่งหมู่ ตัวอย่างเช่น สารฟลาโวนอยด์ (flavonoid) และ ฟลาโวนอล (flavonol) [32] (ภาพประกอบ 8) ซึ่งสารในกลุ่มนี้จะทำ

หน้าที่ต้านอนุมูลอิสระโดยการให้อิเล็กตรอนทำให้โมเลกุลของสารอนุมูลอิสระเสถียร นอกจากนี้สารฟลาโวนอยด์ยังช่วยในการลดการอักเสบ ช่วยในการไหลเวียนของเลือด ต้านการเจริญของแบคทีเรีย และลดคอเลสเตอรอลได้ อีกด้วย ซึ่งในการตรวจวัดสารต้านอนุมูลอิสระสามารถทำได้หลายวิธี เช่น วิธี scavenging activity of ABTS radical และวิธี DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical เป็นต้น



ภาพประกอบ 8 ตัวอย่างโครงสร้างทางเคมีของสารต้านอนุมูลอิสระ

ที่มา: *Wikipedia*. (2017). Retrieved April 20, 2017 from https://en.wikipedia.org/wiki/antioxidant[33]

ทั้งนี้มีรายงานการศึกษาสารสกัดจากเห็ดกินได้หลายชนิดที่สามารถออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ ป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นที่ต่อเนื่อง สารในกลุ่มพอลิแซคคาไรด์ที่พบในเห็ดเป็นสารกลุ่มหนึ่งที่ได้รับความสนใจและมีรายงานว่ามีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระได้ ตัวอย่างงานวิจัยของ

Sui, et al. (2014) ที่ศึกษาสารสกัดหยาบของพอลิแซคคาไรด์จากเห็ดกินได้จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ *Agaricus bisporus*, *Auricularia auricula*, *Flammulina velutipes* และ *Lentinus edodes* พบว่าสารสกัดจาก *A. bisporus* มีประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด[34] ส่วน Zhang, et al. (2015) ใช้น้ำสกัดเห็ดกินได้จำนวน 5 ชนิด พบว่าสารสกัดที่ได้มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระที่ดี โดยเฉพาะเห็ด *Inonotus obliquus* มีประสิทธิภาพดีที่สุด รองลงมาคือ *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes*, *Tremella fuciformis* และ *Auricularia auricula* ตามลำดับ เมื่อเปลี่ยนตัว ทำละลายเป็นเอทานอลพบว่าสารสกัดจากเห็ด *I. obliquus* ก็ยังสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุดเช่นเดิม จึงทำให้เห็ดชนิดนี้ได้รับความสนใจในการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ อย่างแพร่หลาย[35] Lui, et al. (2012) ศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเห็ดกินได้ 5 ชนิด (*Clitocybe maxima*, *Catathelasma ventricosum*, *Stropharia rugosoannulata*, *Craterellus cornucopioides* และ *Laccaria amethystea*) ในรูปของสารประกอบฟีนอล (phenols) เออร์โกสเตอรอล (ergosterol) โทโคฟีรอล (tocopherol) วิตามินซี (ascorbic acid) และกรดอะมิโนจำเป็น พบว่าสารสกัดที่ได้มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ และลดระดับน้ำตาลในเลือดที่ดี[36] ต่อมา Zhang, et al. (2009) ศึกษาเห็ดชิตาเกะ (*Lentinula edodes*) ซึ่งนิยมบริโภคกันอย่างแพร่หลายเพราะมีคุณค่าทางอาหารและสรรพคุณทางยา พบว่ากระบวนการทำเห็ดให้แห้งมีผลต่อปริมาณของสารประกอบฟีนอลที่พบในดอกเห็ด โดยการทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ช่วยให้เห็ดมีปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดและมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด นอกจากนี้การศึกษาสารสกัดจากดอกเห็ด *Ganoderma sinensis* และจากเส้นใยเห็ดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิด ได้แก่ เมทานอล และน้ำร้อน พบว่าสารสกัดทั้งหมดมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ มีค่า half maximum effective concentration (EC_{50}) เท่ากับ 0.95-10.00 มิลลิกรัมของสารสกัดต่อมิลลิลิตร[37] ส่วนการศึกษาในเห็ดสกุล *Ramaria* นั้นพบว่ามีจำนวนไม่มากนัก โดย Gursoy, et al. (2010) ใช้สารละลายเมทานอลในการสกัดเห็ด *Ramaria flava*, *Rhizopogon roseolus* และ *Russula delica* แล้วศึกษาคุณสมบัติของสารสกัดในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีต่างๆ เช่น 1-1-diphenyl-2-picryhydrazyl (DPPH) free radical scavenging, วิธี reducing power และ วิธี metal chelating activity รวมทั้งยังได้ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ และสารเบต้าแคโรทีน พบว่า *R. flava* มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด มีค่า % chelating activity เท่ากับ 96.75±0.28 % นอกจากนี้ยังมีปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดและสารฟลาโวนอยด์สูงที่สุดจากเห็ดที่ศึกษาทั้งหมดอีกด้วย[38] และต่อมา Acharya, et al. (2017) มีรายงานการศึกษาเห็ด *Ramaria subalpina* จากประเทศอินเดีย ซึ่งเป็นเห็ดกินได้ที่มีราคาแพง เนื่องจากมีรสชาติอร่อย และมีสรรพคุณทางยา ทั้งนี้สารสกัดจากตัวทำละลายเมทานอลนอกจากจะมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดีแล้ว ยังมีปริมาณ

สารประกอบฟีนอลที่สูงอีกด้วย[4] ในประเทศไทยมีรายงานการศึกษาสารสกัดจากเห็ดกินได้ 4 ชนิด ได้แก่ *Rugiboletus extremiorientalis*, *Russula emetic*, *Russula* sp. และ *Phlebopus portentosus* โดยวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลและสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด คุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ และรูปแบบทางเคมีของสารกลุ่มฟีนอลด้วยวิธี high performance liquid chromatography (HPLC) พบว่าสารประกอบของเห็ดทั้ง 4 ชนิด สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ และสารสกัดจากเห็ด *R. extremiorientalis* ประกอบด้วยสาร gallic acid, protocatechuic acid, catechin, vanillic acid, syringic acid, sinapic acid, ferulic acid, hydroxycinnamic acid, rutin และ apigenin ซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในทางเภสัชโภชนศาสตร์ได้[39]

3.2 สารต้านการเจริญของจุลินทรีย์

การศึกษาสารต้านการเจริญของจุลินทรีย์เพื่อการค้นพบยาปฏิชีวนะ และ/หรือยาฆ่าเชื้อรานั้น มีการศึกษากันอย่างต่อเนื่อง โดยงานวิจัยส่วนใหญ่เน้นการศึกษาจากพืชสมุนไพร จุลินทรีย์ในกลุ่มแอคติโนไมซีส และราเอนโดไฟท์ ในขณะที่การศึกษาจากเห็ดราชั้นสูงในกลุ่ม basidiomycetes นั้นมีจำนวนน้อย แต่อย่างไรก็ตามมีเห็ดกลุ่มนี้หลายชนิดที่มีสรรพคุณในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ได้ดี เช่น งานวิจัยของ Ramesh; & Manohar; (2010) ศึกษาสารสกัดจาก เมทานอลของเห็ดกินได้จำนวน 6 ชนิด ได้แก่ *Lycoperdon perlatum*, *Cantharellus cibarius*, *Clavaria vermiculris*, *Ramaria formosa*, *Marasmius oreades* และ *Pleurotus pulmonarius* ในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ (*Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Bacillus subtilis* ATCC6633, *Escherichia coli* ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 และ *Candida albicans* ATCC60192) ด้วยวิธี agar well diffusion พบว่าสารสกัดจากเห็ดทุกชนิดสามารถต้านการเจริญของจุลินทรีย์ได้ โดยสารสกัดจากเห็ด *M. oreades* สามารถต้านการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบได้ทุกชนิด และแสดงค่า minimum inhibitory concentration (MIC) ที่ต่ำที่สุดกับเชื้อ *B. subtilis* (MIC = 3 mg/mL), *S. aureus* (MIC = 2 mg/mL), *E. coli* (MIC = 2 mg/mL), *P. aeruginosa* (MIC = 3 mg/mL) และ *C. albicans* (MIC = 2 mg/mL) ส่วนสารสกัดจากเห็ด *R. formosa* สามารถต้านการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบได้ทุกชนิดเช่นกัน แต่คำนวณค่า MIC ได้เมื่อทดสอบกับ *S. aureus* (MIC = 2 mg/mL) และ *P. aeruginosa* (MIC = 3 mg/mL) เท่านั้น[40] ต่อมา Alves, et al. (2012) ศึกษาสารสกัดจากเห็ดป่าจำนวน 13 ชนิด พบว่า *Russula delica* และ *Fistulina hepatica* สามารถต้านการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบได้ 3 สายพันธุ์ (*Escherichia coli*, *Morganella morganii* และ *Peatuerella multocida*) และแบคทีเรียแกรมบวก 6 สายพันธุ์ ได้แก่ (*Staphylococcus aureus*, methicillin-resistance *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria*

monocytogenes, *Streptococcus agalactiae* และ *Streptococcus pyogenes*)[41] และในปี ค.ศ. 2012 มีงานวิจัยของ Centko, et al. (2012) ซึ่งแยกสารสกัดด้วยเอทานอลจากดอกเห็ด *Ramaria cystidiophora* ได้สารบริสุทธิ์ชนิดใหม่ ramariolides A-D ที่มีฤทธิ์ในการต้านการเจริญของเชื้อ *Mycobacterium smegmatis* และ *M. tuberculosis* ซึ่งสารที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดคือ ramariolide A มีค่า MIC = 8 µg/mL และ 128 µg/mL กับเชื้อ *M. smegmatis* และ *M. tuberculosis* ตามลำดับ นอกจากนี้ยังสามารถต้านการเจริญของเชื้อ *Micrococcus luteus* และ *S. aureus* ได้อีกด้วย ในขณะที่สารสกัดจาก *R. botrytis* สามารถต้านการเจริญของแบคทีเรีย *E. faecalis* และ *L. monocytogenes* ได้ และมีค่า minimum bactericidal concentration (MBC) ต่อเชื้อ *P. multocida* และ *S. agalactiae* เท่ากับ 20 mg/mL และ MBC ต่อเชื้อ *S. pyogenes* เท่ากับ 10 mg/mL ตามลำดับ[42] นอกจากนี้ Han, et al. (2016) ทำการสกัดสารจากเห็ด *R. botrytis* ด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิด (อะซิโตน, เอธิลอะซิเตท, เอทานอล และ เมทานอล) และทดสอบคุณสมบัติในการต้านการเจริญของแบคทีเรียพบว่าสารสกัดด้วยเอธิลอะซิเตทสามารถต้านการเจริญของแบคทีเรียได้ 4 สายพันธุ์ คือ *Enterobacter cloacae*, *E. coli*, *P. aeruginosa* และ *S. aureus* รองลงมาคือ เอทานอล เมทานอล และอะซิโตน ทั้งนี้สารสกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 4 ชนิด ไม่สามารถต้านการเจริญของเชื้อ *B. subtilis* และ *S. aureus* ได้[43]

ในประเทศไทย Chomcheon; et al. (2013) ได้แยกเชื้อเห็ดกินได้ 2 ชนิด *Pleurotus citrinopileatus* และ *Tricholoma crassum* มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด ได้แก่ potato dextrose broth (PDB) และ yeast extract sucrose broth (YES) แล้วสกัดมาทดสอบคุณสมบัติต้านการเจริญของแบคทีเรีย *E. coli* ATCC25922 และ *S. aureus* ATCC25923 ด้วยวิธี paper disc diffusion พบว่าสารสกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ของเห็ด *P. citrinopileatus* ต้านการเจริญของเชื้อทดสอบได้ดีที่สุด โดยมีค่า MIC ต่อเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* เท่ากับ 5 mg/mL และ 2 mg/mL ตามลำดับ ส่วนสารสกัดจาก *T. crassum* แสดงประสิทธิภาพที่น้อยกว่า นอกจากนี้การใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ยังให้สารที่สามารถต้านการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบดีกว่าอาหาร YES[44]

3.3 สารต้านการเจริญของเซลล์มะเร็ง

โรคมะเร็งเป็นอีกโรคหนึ่งที่มีคนเสียชีวิตจำนวนมาก และเพิ่มสูงขึ้นทุกปี สารต้านมะเร็งที่มีประสิทธิภาพจึงมีความจำเป็นและมีการศึกษากันอย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะสารต้านมะเร็งจากธรรมชาติซึ่งได้รับความสนใจอย่างมาก สารสกัดจากจุลินทรีย์ในกลุ่มเห็ดราอาจเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง เช่น การศึกษาสารสกัดจากเห็ด *Pleurotus eryngii* ในกลุ่ม triterpenoids ซึ่งพบว่ามีฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ได้[45] นอกจากนี้สารสกัดในกลุ่ม carboxymethylated beta-glucan (CMPTR) ที่แยกได้จากดอกเห็ด *Pleurotus tuberregium* ก็มีคุณสมบัติในการต้านเซลล์มะเร็งเต้านม

MCF-7 ได้ และมีค่า Inhibitory concentration (IC_{50}) เท่ากับ 204 µg/mL[46] ทั้งนี้มีการศึกษาสาร ergosterol peroxide และ 9,11-dehydroergosterol peroxide ซึ่งแยกได้จากเห็ด *Ganoderma lucidum* พบว่าสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านมได้เช่นกัน[47] ส่วนการศึกษาสารสกัดจากเห็ด *R. flava* ซึ่งเป็นเห็ดกินได้ ด้วยตัวทำละลายเอทานอล พบว่าสามารถต้านการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ 3 ชนิด คือเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 ค่า (IC_{50} = 66.54 µg/mL) รองลงมาคือเซลล์มะเร็งปอด NCI-H520 (IC_{50} = 134.44 µg/mL) และเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร BGC-803 (IC_{50} = 743.99 µg/mL) เมื่อทดสอบด้วยวิธี MTT assay[1] ต่อมา Sadi, et al. (2016) ศึกษาสารสกัดจากเห็ดป่ากินได้จำนวน 6 ชนิด (*R. flava*, *Agrocybe molesta*, *Volvopluteus gloiocephalus*, *Lactarius deliciosus*, *Bovista plumbea* และ *Tricholoma terreum*) ในการต้านเซลล์มะเร็งตับ HepG2 และคุณสมบัติ ในการต้านอนุมูลอิสระและการเจริญของจุลินทรีย์ พบว่าสารสกัดด้วยเมทานอลของเห็ด *V. gloiocephalus* และสารสกัดด้วยน้ำของ *R. flava* มีความเป็นพิษกับเซลล์มะเร็งมากที่สุด[48] เมื่อไม่นานมานี้ Zhou, et al (2017) ได้แยกสารชนิดใหม่ ubiquitin-like antitumor protein (RBUP) จากดอกเห็ด *R. botrytis* ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 18.5 kDa และมีลำดับของกรดอะมิโนคล้ายกับสาร ubiquitin ของเห็ด *Coprinellus congregates* เท่ากับ 69% เมื่อนำสาร RBUP เข้มข้น 20 µM ทดสอบความเป็นพิษกับเซลล์มะเร็งพบว่าสามารถต้านการเจริญของเซลล์มะเร็งปอด A549 ได้ดีที่สุด โดยเหลือเซลล์รอดชีวิตเพียง 32.39% นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติของ hemagglutination และ DNase activity ซึ่งสารดังกล่าวน่าจะเป็นประโยชน์ในด้านการแพทย์ต่อไป[49]

3.4 สารลดระดับน้ำตาลในเลือด และสารออกฤทธิ์อื่น ๆ

ปัจจุบันคนจำนวนมากป่วยเป็นโรคเบาหวานซึ่งอาจเกิดจากความผิดปกติของการผลิตฮอร์โมนอินซูลิน (insulin) จากตับอ่อนไม่เพียงพอเนื่องจากเบต้าเซลล์ (beta cells) ถูกทำลายด้วยระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย (เบาหวานชนิดที่ 1) หรือเกิดจากภาวะดื้อต่ออินซูลิน คือตับอ่อนสามารถผลิตอินซูลินได้แต่ไม่เพียงพอ และไม่สามารถนำน้ำตาลเข้าสู้เซลล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ อาจเนื่องจากความผิดปกติของรีเซปเตอร์ (receptor) ของอินซูลินในการนำน้ำตาลเข้าสู่เซลล์ ทำให้ผู้ป่วยเบาหวานมีระดับน้ำตาลในเลือดสูงผิดปกติ (เบาหวานชนิดที่ 2) นอกจากนี้สภาพความเป็นอยู่และการบริโภคอาหารของคนในปัจจุบัน ทำให้จำนวนคนป่วยเป็นโรคเบาหวานชนิดที่ 2 เพิ่มมากขึ้น การศึกษาสารสกัดที่มีคุณสมบัติในการลดระดับน้ำตาลจึงมีจำนวนเพิ่มสูงขึ้นตามมาด้วย เช่น การศึกษาของ Kiho, et al. (2000) โดยสกัดสาร Tremellastin จากดอกเห็ด *Tremella aurantia* พบว่าสามารถลดระดับน้ำตาลและไตรกลีเซอไรด์ในเลือดของหนูทดลองที่เป็นเบาหวานได้[50] นอกจากนี้ Xu, et al. (2010) ได้ศึกษาสารสกัดพอลิแซคคาไรด์ จากเห็ด *Inonotus obliquus* ในหนูที่เป็นโรคเบาหวานโดย

ให้หนูกินสารสกัดปริมาณ 150 และ 300 mg/kg ของน้ำหนักตัว พบว่าสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ร้อยละ 16.64 และร้อยละ 20.09 (ในวันที่ 7) และร้อยละ 29.71 และร้อยละ 36.36 (ในวันที่ 21) ตามลำดับ[51] ในขณะที่สารสกัดจากเห็ด *Pleulotus eryngii* สามารถลดระดับน้ำตาลในหนูที่เป็นเบาหวานได้เมื่อให้หนูกินสารสกัดปริมาณ 100 และ 200 mg/kg ของน้ำหนักตัว โดยสารสกัดดังกล่าวจะช่วยเพิ่มระดับความเข้มข้นของอินซูลินและไกลโคเจนในเลือดให้เพิ่มสูงขึ้น[52]

ส่วนการศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการนั้นได้มีการศึกษาบทบาทของสารสกัดจากเห็ดในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ alpha-amylase (ย่อยแป้ง (starch) ได้น้ำตาลมอลโตสและกลูโคส) และเอนไซม์ alpha-glucosidase (ย่อยน้ำตาลมอลโตสได้กลูโคส) ทำให้ระดับน้ำตาลซึ่งเป็นผลจากการย่อยแป้งนั้นลดลง ตัวอย่างการศึกษาสารสกัดด้วย n-hexane จากเห็ด *Coriolus versicolor* พบว่าสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ alpha-amylase ได้ดี ขณะที่สารสกัดจากเห็ด *Grifola frondosa* ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ alpha-glucosidase ได้ดีเช่นกัน อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพกับยาเบาหวาน acarbose พบว่ายามีประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ alpha-amylase ดีกว่าสารสกัดจากเห็ด แต่มีประสิทธิภาพน้อยกว่าในการยับยั้งเอนไซม์ alpha-glucosidase และเมื่อวิเคราะห์สารสกัดด้วยเทคนิค GC-MS พบว่าปริมาณของ oleic acid และ linoleic acid ที่พบในสารสกัดสัมพันธ์กับประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ alpha-glucosidase[53] เมื่อไม่นานมานี้ Bae, et al. (2016) ศึกษาสารสกัดจากเห็ด *Pleurotus cornbucopiae* ในการยับยั้งเอนไซม์ alpha-glucosidase พบว่าการสกัดด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพดีที่สุด และเมื่อแยกสารให้บริสุทธิ์พบว่าประกอบด้วย hexapeptides สองชนิด ชนิดแรกคือ Thr-Ile-Ala-Phe-Phe-Ile-Asp (น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 678.79 Da) ชนิดที่สอง คือ Tyr-Tyr-Ala-Ile-Gly-Asp (น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 643.77 Da) และเมื่อนำไปทดสอบกับหนูทดลองที่เป็นโรคเบาหวานพบว่าสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้เมื่อให้กินสารสกัดปริมาณเท่ากับ 50 และ 300 mg/kg ของน้ำหนักตัว[54] ต่อมา Kewnarin, et al. (2016) ศึกษาสารสกัดจากเมทานอลของเห็ดกินได้จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ *Rugiboletus extremiorientalis*, *Russula emetia*, *Russula* sp. และ *Phlebopus portentosus* ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ alpha-glucosidase พบว่าสารสกัดจากเห็ด *R. extremiorientalis* สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ดีที่สุด มีค่า % inhibitory activity เท่ากับ 55.5± 3.9% (เมื่อสกัดด้วยเมทานอล) และ 54.4± 1.2% (เมื่อสกัดด้วยน้ำ)[40] Chommuenwai, et al. (2013) แยกสารสกัดจากเห็ด *Ramaria subaurantiaca* และพบว่าสารบริสุทธิ์ที่แยกได้มีคุณสมบัติในการต้านเชื้อมาลาเรีย (*Plasmodium falciparum* 3D7) ได้แก่ สาร spermatinamine (มีค่า IC_{50} = 0.23 µM) และสาร pistillarin (มีค่า IC_{50} = 1.90 µM)[3] อีกด้วย

นอกจากนี้ ความสามารถในการเป็นสารลดคอเลสเตอรอสในเลือด ซึ่งคอเลสเตอรอลที่มากเกินไปในกระแสเลือดจะส่งผลให้เกิดโรคไขมันอุดตันในหลอดเลือด ดังนั้นจึงสนในการเป็นสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMG CoA reductase ซึ่งในปัจจุบันนี้ยาในกลุ่ม statin สามารถยับยั้งหรือเป็น ตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าวได้ ส่งผลให้ ชะลอการสังเคราะห์และเพิ่มขึ้นของคอเลสเตอรอลในเลือดได้[55] รายานของ Gunde-Cimerman และ Cimerman (1995) ศึกษาปริมาณสารลดคอเลสเตอรอลที่สกัดจากดอกเห็ด *Pleurotus ostreatus* หรือเห็ดนางรมที่มีขนาดแตกต่างกันระหว่าง 2-15 เซนติเมตรด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ เมทานอล:น้ำ (1:1 V/V) เมทานอล และไนโตรเจนเหลว ผสมกับ เมทานอล:น้ำ (1:1 V/V) จากนั้น นำไปทดตรวจสอบหา lovastatin ด้วยวิธี HPLC (เปรียบเทียบกับ lovastatin มาตรฐาน) พบสารดังกล่าว จากการสกัดด้วย เมทานอล และไนโตรเจนเหลว ผสมกับ เมทานอล:น้ำ (1:1 V/V) มีปริมาณ 1300 และ 2500 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ และพบว่า สารดังกล่าวนั้น สามารถสกัดได้มากที่สุดจากบริเวณหมวกเห็ด และ ไม่พบสารจากสารสกัดที่สกัดด้วยโคนของเห็ด[55] ต่อมาในปี 2017 ศึกษาสารความสามารถในการเป็นสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMG CoA reductase จาก *Ganoderma leucocontextum* ด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิดคือ เอทิลอาซิเตท และ น้ำ จากนั้น ตรวจสอบด้วยวิธี NMR พบสารใหม่ในกลุ่ม meroterpenoids 3 ชนิด คือ ganoleucin A-C (1-3) และสาร ganomycin ที่ทราบโครงสร้างแล้ว หรือ meroterpenoids (4-8) อีก 5 ชนิด เมื่อทดสอบภายในหลอดทอลอง (*in vitro*) พบว่า ganomycin (meroterpenoids 4 และ 5) ให้ผลการเป็นสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMG CoA reductase (IC_{50}) เท่ากับ 12.3 ± 1.7 และ 29.3 ± 2.5 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ซึ่งมีค่าต่ำกว่ายา Atorvastatin (32.1 ± 7.7 มิลลิโมลาร์) [56]

บทที่ 3
วิธีดำเนินงานวิจัย

1. อุปกรณ์และเครื่องมือ

ตาราง 2 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	บริษัท	ประเทศ
กระดาษกรอง (filter paper) Whatman No.1	GE healthcare companies	UK
กล่องควบคุมอุณหภูมิ (heat box)	Heto	USA
กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope)	Olympus	Japan
กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (stereo microscope)	Olympus	Japan
เข็มฉีดยา (syringe)	NIPRO	Thailand
คอลัมน์สำหรับ HPLC (inertsil ODS-3 column C18, 150×4.6 มิลลิเมตร, ขนาด 5 ไมโครเมตร)	Shimadzu	Japan
เครื่องเขย่าสาร (shaker)	Sartorius	Germany
เครื่องชั่งสาร	IKA	Malaysia
เครื่องถ่ายภาพเจล (Gel Doc™ XR+ Gel Documentation System)	Bio-rad	USA
เครื่องดูดสุญญากาศ (vacuum pump)	Rocker science	Taiwan
เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge)	Sorvall	USA
เครื่องเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ (DNA thermocycler)	Hangzhou Bioer	China
เครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-spectrophotometer)	Jenway	UK
เครื่องวัดพีเอช (pH meter)	Fisher Scientific	UK
เครื่องอบตัวอย่างแห้ง (dehydration machine)	Verasu	Thailand
เครื่องอิเลคโทรโฟรีซิส (electrophoresis apparatus)	Hangzhou Bioer	China

ตาราง 2 (ต่อ)

อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	บริษัท	ประเทศ
เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (rotary evaporator)	Buchi	Germany
เครื่อง high performance liquid chromatography (HPLC)	Shimadzu	Japan
ชุดเครื่องแก้วกรองสารละลาย	Pyrex	USA
ตู้ควบคุมอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส	Sanyo	Japan
ตู้บ่มเชื้อ (incubator)	Nitech	Thailand
เตาไมโครเวฟ (microwave)	Imarflex	Thailand
ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow)	Shel-lab	Germany
ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air sterilization oven)	Fisher Scientific	UK
แผ่นกรองเมมเบรนเซลลูโลสอาซิเตท (cellulose acetate filter)	Filtrex	USA
แผ่นกรองเมมเบรนเทฟลอน (PTPE syringe filter)	Filter-Bi	China
แผ่นโครมาโตกราฟีแบบบาง (thin layer chromatography)	Merck KGaA	Germany
หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave)	Tomy	Thailand

2. อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

ตาราง 3 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี	บริษัท	ประเทศ
Absolute ethanol	RCI labscan	Thailand
Acetic acid	Merck KGaA	Germany
Acetonitrile	RCI labscan	Thailand
Agar	Marine chemical	India

ตาราง 3 (ต่อ)

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี	บริษัท	ประเทศ
Agarose	Research organics Inc	USA
Alpha amylase	Sigma-Aldrich	USA
Aluminium chloride	Sigma-Aldrich	USA
Ampicillin	องค์การเภสัชกรรม	Thailand
Benzoic acid	Sigma-Aldrich	USA
Bultylate hydroxy toluene	Sigma-Aldrich	USA
Cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB)	Amresco	USA
Calcium chloride ($CaCl_2$)	Univar	Australia
Coumaric acid	Sigma-Aldrich	USA
D-glucose anhydrous	Fisher Scientific	UK
Diammonium hydrodent orthophosphate	Ajax	New Zealand
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	RCI labscan	Phillipin
Dinitrosalicylic acid	Sigma-Aldrich	USA
Disodium hydrogen phosphate	Ajax	New Zealand
Ethanol (commercial grade)	เคมีภัณฑ์	Thailand
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Ajax	New Zealand
Favorprep™ Gel/PCR purification mini kit	Favorgen Biotech	Taiwan
Folin Ciocalteu reagent	Sigma-Aldrich	USA
Ferrozine	Fluka	USA
Gallic acid	Sigma-Aldrich	USA
Green gel solution	Vivantis	Malaysia
Glycerol	Merck KGaA	Germany
Hexane	Ajax	New Zealand
Iron (II) chloride (ferrous ion)	Loba	USA
Isopropanol	Merck KGaA	Germany
Isopropylthiogalactose (IPTG)	Bio basic	Canada
Luria Bertani Broth	Titan biotech	India

ตาราง 3 (ต่อ)

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี	บริษัท	ประเทศ
Methanol (analytical grade)	RCI labscan	Thailand
Methanol (HPLC grade)	RCI labscan	Thailand
Müeller hinton broth (MHB)	Merck KGaA	Germany
4-nitrophenyl alpha-D-glucopyranoside	Sigma-Aldrich	USA
Phenol: chloroform: isopropanol	IBI Scientific	USA
Potato dextrose agar (PDA)	Himedia	India
Potassium iodide	Qrëcë™	malaysai
Potassium hydroxide	Qrëcë™	malaysai
Potassium sodium tartrate	Ajax	New Zealand
Quercetin	Sigma-Aldrich	USA
RBC TA cloning kit	RBC Bioscience	Taiwan
Silica gel	SANPONT	China
Salicylic acid	Sigma-Aldrich	USA
Sodium acetate	Ajax	New Zealand
Sodium carbonate	Ajax	New Zealand
Sodium dihydrogen phosphat	Ajax	New Zealand
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Ajax	New Zealand
Sodium hydroxide	Merck KGaA	India
Sodium nitrite	Ajax	New Zealand
Sodium potassium tartrate	Ajax	New Zealand
Starch	Ajax	New Zealand
Syringic acid	Sigma-Aldrich	USA
Tris hydrochloric buffer	Vivantis	Malaysia
Tris Borate EDTA (TBE) buffer	National Diagnostics	England
Taq DNA polymerase (Phire® Plant direct PCR master mix)	Thermo Scientific™	Germany

ตาราง 3 (ต่อ)

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี	บริษัท	ประเทศ
Taq DNA polymerase (Top *Taq*)	Qiagen	USA
Vanillic acid	Sigma-Aldrich	USA
Vanillin	Sigma-Aldrich	USA
Water HPLC grade	RCI labscan	Thailand
6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid	Sigma-Aldrich	USA
Water sterile DNase/RNase-free	Thermo Scientific™	Germany
2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)	Sigma-Aldrich	USA
2,2′-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS)	Sigma-Aldrich	USA
3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)	Sigma-Aldrich	USA
6X loading dye	RBC Bioscience	Taiwan
1,500 bp DNA ladder	Thermo Scientific™	Germany

3. ชุดทดลองสำเร็จรูป

ตาราง 4 ชุดทดลองสำเร็จรูป

ชุดทดลองสำเร็จรูป	บริษัท	ประเทศ
Favorprep™ DNA extraction mini kit	Favorgen Biotech	Taiwan
Favorprep™ Gel/PCR purification mini kit	Favorgen Biotech	Taiwan
HMG-CoA reductase	Sigma-Aldrich	USA
RBC TA cloning kit	RBC Bioscience	Taiwan

4. การรวบรวมตัวอย่างเห็ดสกุล *Ramaria*

รวบรวมตัวอย่างดอกเห็ดที่สมบูรณ์ของเห็ดสกุล *Ramaria* ในพื้นที่ป่าสนผสมเต็งรัง ณ เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียว จังหวัดชัยภูมิ โดยรักษาตัวอย่างดอกเห็ดใส่ในถุงกระดาษ หรือกล่องพลาสติกอย่างระมัดระวังเนื่องจากดอกเห็ดมีความเปราะบางและหักง่าย จากนั้นบันทึกรูป และวันเดือนปีที่เก็บเพื่อเป็นข้อมูลในการศึกษาการจัดจำแนกชนิดต่อในห้องปฏิบัติการ

5. การจัดจำแนกชนิดของเห็ดสกุล *Ramaria*

การจัดจำแนกชนิดของเห็ดสกุล *Ramaria* ต้องอาศัยทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเกิดปฏิกิริยาเคมีของเนื้อเยื่อดอกเห็ดกับสารละลาย และลักษณะทางพันธุกรรมโดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ร่วมกันในการระบุชนิด

5.1 การศึกษาทางสัณฐานวิทยาและการเกิดสีของเนื้อเยื่อดอกเห็ดเมื่อทำปฏิกิริยากับสารเคมี

โดยการศึกษาลักษณะภายนอกที่มองเห็นได้ด้วยด้วยตาเปล่าและภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ และการเกิดปฏิกิริยาทางเคมีของเนื้อเยื่อดอกเห็ดกับสารละลายทดสอบ โดยนำตัวอย่างดอกเห็ดปะการังที่รวบรวมได้มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า เช่น ขนาด ลักษณะการแตกกิ่ง จำนวนกิ่ง และสีดอก โดยเทียบกับแผ่นสีมาตรฐานของ Flora of British Fungi: Colour Identification Chart (Edinburgh Royal Botanic Garden) จากนั้นศึกษาลักษณะอื่นๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ ได้แก่ ลักษณะผิวสัมผัสของก้านดอก และลักษณะของปลายกิ่ง เป็นต้น นอกจากนี้ได้ตัดเนื้อเยื่อดอกเห็ดสดมาทดสอบการเกิดสีกับสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) เข้มข้น 10 % สารละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์ (KI) และสารละลายเฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4$) เข้มข้น 10 % บันทึกสีที่เกิดขึ้น[8,30]

ตัวอย่างดอกเห็ดที่เจริญเต็มที่นำมาทำลายพิมพ์สปอร์ (spore print) แล้วเตรียมสไลด์ด้วยสารละลาย melzer's reagent (ภาคผนวก ก) และน้ำกลั่น บันทึกลักษณะ รูปร่างและสีของเบสิดิโอสปอร์ (basidiospores) จากนั้นตัดเนื้อเยื่อดอกเห็ดมาทำสไลด์เพื่อศึกษาลักษณะโครงสร้างที่สำคัญอื่นๆ ได้แก่ เบสิเดีย (basidia) เส้นใย (hyphae) แคลมป์ คอนเนคชั่น (clamp connection) และซิสทิเดีย (cystidia) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ส่วนขนาดเบสิดิโอสปอร์วัดจากสปอร์จำนวน 30 สปอร์ต่อตัวอย่าง จากนั้นคัดเลือกตัวแทนเห็ดปะการังแต่ละชนิดมาศึกษาลักษณะของลวดลายบนผิวสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด เพื่อช่วยในการจัดจำแนกชนิดเบื้องต้น[7,8,18]

ส่วนดอกเห็ดนำมาอบให้แห้งบรรจุในถุงพลาสติกภายใต้สภาวะสุญญากาศ เพื่อเก็บรักษาเป็นตัวอย่างแห้ง (fungal herbarium) ใช้ในการอ้างอิงต่อไป

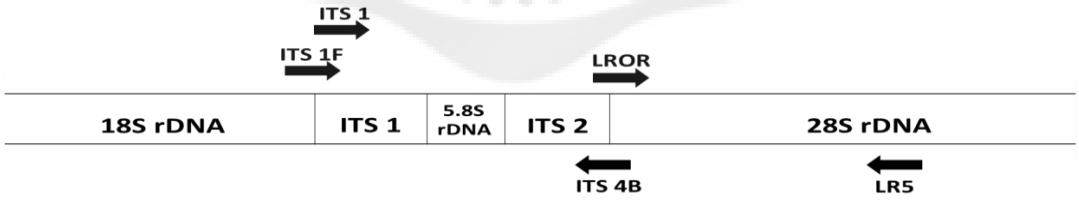
5.2 การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมโดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์

5.2.1 การสกัดดีเอ็นเอ

นำตัวอย่างดอกเห็ดสกุล *Ramaria* มาสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อดอกเห็ดสดโดยการบดให้ละเอียดแล้วสกัดตามวิธีในคู่มือชุดสกัดดีเอ็นเอของ FAVOPREP™ Genomic DNA extraction kit (ภาคผนวก ค) สารละลายดีเอ็นเอที่ได้นำไปวัดความเข้มข้นที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (OD_{260}) (OD เท่ากับ 1.0 เทียบได้กับปริมาณดีเอ็นเอ 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) และความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (OD_{280}) ด้วยเครื่องยูวีวิซิเบิลสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ เพื่อวัดความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ (OD_{260}/OD_{280}) ซึ่งควรมีค่าอยู่ระหว่าง 1.8-1.9[57] จากนั้นเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้งาน

5.2.2 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอเรส (polymerase chain reaction, PCR)

ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอนั้นเลือกศึกษาดีเอ็นเอ 2 บริเวณ ได้แก่ บริเวณ internal transcribed spacers (ITS) และ large subunit ribosomal DNA (LSU) โดยใช้ไพรเมอร์ที่แสดงในภาพประกอบ 9 ตาราง 5



ภาพประกอบ 9 แผนภาพแสดงตำแหน่งของไพรเมอร์ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ ITS และ LSU

ที่มา: ดัดแปลงจาก Tedersoo, et al. (2008). Strong host preference of ectomycorrhizal fungi in a Tasmanian wet sclerophyll forest as revealed by DNA barcoding and taxon-specific primers. *New Phytologist*. 180: 479-490.[58]

ตาราง 5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง

บริเวณที่ศึกษา	ไพรเมอร์		ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' - 3')	ที่มา
ITS	ITS1	forward	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	(55)
	ITS1F	forward	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	(56)
	ITS4B	reverse	CAGGAGACTTGTACACGGTCCAG	(56)
	ITS4	reverse	TCCTCCGCTTATTGATATGC	(55)
LSU	LROR	forward	ACCCGCTGAACTTAAGC	(57)
	LR5	reverse	TCCTGAGGGAAACTTCG	(57)

5.2.2.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS ใช้คู่ไพรเมอร์ของ ITS1/ITS4B หรือ ITS1F/ITS4B ขึ้นกับชนิดตัวอย่าง[59-61] จากนั้นทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ Top *Taq* 2X mastermix kit ดังตาราง 6 แล้วเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอตามโปรแกรมในตาราง 7

ตาราง 6 ส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของเห็ดสกุล *Ramaria*

ส่วนประกอบ	ปริมาตรที่ใช้งาน (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
Forward primer (10 µM)	1	0.4 ไมโครโมลาร์
Reverse primer (10 µM)	1	0.4 ไมโครโมลาร์
ดีเอ็นเอต้นแบบ	5	10-100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร
Top *Taq* 2X master mix	12.5	1 ยูนิต
น้ำกลั่นที่ปราศจาก DNase และ RNase	5.5	

หมายเหตุ: ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 25 ไมโครลิตร

ตาราง 7 เวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของเห็ดสกุล *Ramaria*

ปฏิกิริยา PCR	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)
Initial denaturation	94	5
Denaturation	94	1
Annealing	50-56*	1
Extension	72	2
Final Extension	72	10
ทำซ้ำตั้งแต่ขั้นตอน Denaturation ถึง Extension จำนวน 35 รอบ		

หมายเหตุ: * หมายถึง ช่วงอุณหภูมิที่อาจปรับเปลี่ยนตามความเหมาะสมกับชนิดของเห็ด

5.2.2.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน LSU

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ LSU ใช้คู่ไพรเมอร์ LROR/LR5[61] รายละเอียดแสดงในตาราง 5 จากนั้นทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้เอนไซม์ Top *Taq* 2X master mix kit ดังตาราง 6 แล้วเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอตามโปรแกรมในตาราง 8

ตาราง 8 เวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ LSU ของเห็ดสกุล *Ramaria*

ปฏิกิริยา PCR	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)
Initial denaturation	94	5
Denaturation	94	1
Annealing	55	1
Extension	72	2
Final Extension	72	10
ทำซ้ำตั้งแต่ขั้นตอน Denaturation ถึง Extension จำนวน 35 รอบ		

5.2.3 การตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟรีซีส (gel electrophoresis)

ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการเพิ่มจำนวนด้วยวิธี PCR นำมาตรวจสอบด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส โดยใช้เจลอะกาโรส (agarose gel) เข้มข้น 1% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในสารละลาย 0.5X Tris-borate (TBE) buffer (ภาคผนวก ก) หลอมเจลให้ละลายด้วยไมโครเวฟ แล้วเติม สารละลาย Green gel ปริมาตร 5 ไมโครลิตร เทลงในถาดแม่พิมพ์ที่มีการวางหวีเพื่อทำให้เจลเป็นช่องสำหรับหยอดตัวอย่าง รอให้เจลเย็นและแข็งตัวจึงดึงหวีออก นำเจลที่แข็งไปวางไว้ในเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซีสที่มีสารละลาย 0.5X TBE buffer จากนั้นหยอดผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วยวิธี PCR ลงในช่องเจลโดยใช้แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1,500 bp DNA ladder ในการเทียบเคียง การแยกขนาดของชิ้นดีเอ็นเอใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 30 นาที แล้วนำเจลไปตรวจดูแถบแบนดีเอ็นเอและบันทึกภาพด้วยเครื่องถ่ายภาพเจลภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต

5.2.4 การทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์และการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์

นำผลผลิตของดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR มาทำให้บริสุทธิ์ด้วย FAVOPREP™ purification mini kit (ภาคผนวก ค) ตามวิธีในคู่มือผู้ผลิตแล้วนำชิ้นดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์มาตรวจสอบอีกครั้งด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส ตามวิธีในข้อ 5.2.3 ก่อนนำไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป ผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้นำมาตรวจวิเคราะห์ความถูกต้องด้วยโปรแกรม Chromas 1.56 (Technelysium Pty. Ltd) จากนั้นนำไปเทียบเคียงกับฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BLASTn (https://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/) และฐานข้อมูล Unite (https://unite.ut.ee/) สำหรับ ITS ของเอคโตไมคอร์ไรซา เพื่อเป็นข้อมูลในการระบุชนิดร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา

5.2.5 การเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอกับเวคเตอร์ การย้ายเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน และการคัดเลือกโคโลนี

ในกรณีที่ไม่สามารถอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์จากชิ้นดีเอ็นเอบริสุทธิ์ได้โดยตรง นำชิ้นดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์มาเชื่อมต่อกับ TA cloning vector ตามส่วนผสมในตาราง 9 จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน แล้วถ่ายโอนรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่แบคทีเรียเจ้าบ้าน *Escherichia coli* สายพันธุ์ Top10

ตาราง 9 ปริมาตรและสารเคมีที่ใช้ในการเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอกับเวคเตอร์

ส่วนประกอบ	ปริมาตรที่ใช้งาน (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
Ligation buffer A	1	1 เท่า
Ligation buffer B	1	1 เท่า
PCR product (DNA insert)	2	200 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร
RBC TA cloning vector	4	100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร
T_4 DNA ligase	1	2 ยูนิต
RNase free water	1	-

หมายเหตุ: ปริมาตรสุทธิเท่ากับ 10 ไมโครลิตร และบ่มที่ 4 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง

โดยนำเซลล์แบคทีเรียปริมาตร 50 ไมโครลิตร แช่ในน้ำแข็งให้ละลาย จากนั้นเติมส่วนผสมที่เชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอกับเวคเตอร์แล้วปริมาตร 2 ไมโครลิตร คนให้เข้ากันอย่างเบามือ แล้วบ่มในน้ำแข็งนาน 30 นาที ก่อนนำไป heat shock ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที แล้วนำมาแช่น้ำแข็งทันที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Luria Bertani Broth (LB broth) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ก่อนนำไปเขย่าที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา นำเซลล์ไป spread บนอาหาร LB agar ที่มีการเติม ampicillin เข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร, X- Gal เข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และ IPTG เข้มข้น 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 4 ไมโครลิตร (ภาคผนวก ก) แล้วทำการ spread เชื้อปริมาตร 50-100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีสีขาว มาเพาะเลี้ยงในอาหาร LB broth ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ที่เติม ampicillin เข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นเก็บเซลล์ใส่หลอดไมโครเซ็นติฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบเท่ากับ 8,000g เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนน้ำทิ้งแล้วเก็บเฉพาะตะกอนเซลล์เพื่อนำไปสกัดพลาสมิด (ภาคผนวก ค) และนำไปเพิ่มจำนวนผลผลิตดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอเรสตามวิธีในข้อ 5.2.2 ทำชิ้นดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์และวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป[62]

5.2.6 การศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเห็ดสกุล *Ramaria* โดยการสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้ (phylogenetic tree)

ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการสร้างจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเห็ดสกุล *Ramaria* ที่ได้จากการทดลอง ร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล GenBank ที่มีค่าร้อยละความเหมือน (%similarity) สูงสุดกับตัวอย่างที่ได้ศึกษา รวมทั้งสปีชีส์ใกล้เคียง โดยนำมาจัดเรียงแนวความสัมพันธ์ (multiple sequence alignment) ด้วยโปรแกรม Clastal W[63] และตรวจสอบด้วยโปรแกรม BioEdit (North Carolina State University, U.S.A.) จากนั้นสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้ด้วยวิธี Bayesian ด้วยโปรแกรม Mrbayes[64] โดยโปรแกรมจะมีการสร้างแผนภูมิซ้ำกันเป็นจำนวน 10,000 ครั้งเพื่อให้ได้แผนภูมิที่มีความเป็นไปได้และถูกต้องที่สุดและนำลักษณะดังกล่าวไปวิเคราะห์ร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา

6 การคัดแยกเพาะเลี้ยงเชื้อเห็ดสกุล *Ramaria* บริสุทธิ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

นำดอกเห็ดสกุล *Ramaria* สดมาแยกเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้การฉีกเนื้อเยื่อบริเวณก้านดอก จากนั้นใช้ forcep ที่ปราศจากเชื้อดึงเนื้อเยื่อดอกเห็ดด้านในออกมาวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 3 ชนิด ได้แก่ Potato dextrose agar (PDA), Modified Norkarn's C (MNC)[65] และ Czapek's Dox agar[66] (ภาคผนวก ข) ที่เติมยา streptomycin เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จนพบการเจริญของเส้นใยรา ศึกษาลักษณะของเส้นใยราโดยการทำสไลด์ด้วยสีย้อม lactophenol cotton blue แล้วศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง จากนั้นเก็บรักษาเส้นใยเห็ดบริสุทธิ์เพื่อใช้ในการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป

7 การสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากตัวอย่างดอกเห็ดสกุล *Ramaria*

นำตัวอย่างดอกเห็ดแห้งสกุล *Ramaria* แต่ละชนิด ที่มีจำนวนตัวอย่างมากพอมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบด จากนั้นนำไปสกัดด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิด ได้แก่ สารละลายเอทานอลเข้มข้น 95% และสารละลายเอธิลอะซิเตท โดยใช้ปริมาณตัวอย่างเห็ดบดต่อตัวทำละลายเท่ากับ 5 กรัมของตัวอย่างเห็ด ต่อ 100 มิลลิลิตรของตัวทำละลาย ใส่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที นาน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบเวลานำสารสกัดที่ได้มากรองผ่านกระดาษกรอง (Whatman™ No.1) เพื่อแยกส่วนของเห็ดออกมา นำไปสกัดซ้ำด้วยตัวทำละลายเดิม 3 ครั้ง ส่วนน้ำของสารสกัดที่ได้ ปริมาตร 300 มิลลิลิตร นำไปทำให้เข้มข้นด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบสุญญากาศ (rotary evaporator) เมื่อแห้งนำไปชั่งน้ำหนักสารสกัดที่ได้ แล้วละลายกลับด้วยตัวทำละลายเดิม ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 5 มิลลิลิตร[1]

8. การศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากดอกเห็ดสกุล *Ramaria*

ในการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาของสารสกัดจากเห็ดสกุล *Ramaria* ได้แบ่งการทดสอบออกเป็น 5 ด้าน ได้แก่ 1) คุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ 2) คุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ สารฟลาโวนอยด์ และสารประกอบฟีนอลทั้งหมด 3) คุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง 4) คุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ alpha-glucosidase และ alpha-amylase และ 5) คุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA reductase

8.1 การศึกษาคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

นำสารสกัดจากเห็ดด้วยตัวทำละลายเอทานอลและเอธิลอะซิเตทจากวิธีการทดลองในข้อ 4 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาระเหยตัวทำละลายออกจนแห้ง ชั่งน้ำหนักของสารสกัด แล้วละลายด้วย DMSO เข้มข้น 10% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ก่อนนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

8.1.1 การทดสอบด้วยเทคนิค agar well diffusion

แบคทีเรียจำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27813 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25926 โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Müller-hinton agar (MHA) เชื้อทดสอบปรับความเข้มข้นให้มีค่าเท่ากับค่าดูดกลืนแสง 600 นาโนเมตร (OD_{600}) 0.08 (0.5 McFarland standard) จากนั้นเจาะอาหารให้เป็นหลุมด้วย cork borer ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 5 มิลลิเมตร ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อแล้วใส่สารสกัดปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงในหลุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ถ้าสารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้จะเกิดวงใสที่ไม่มีการเจริญของเชื้อ วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส ทั้งนี้ใช้สารละลาย DMSO เข้มข้น 10% เป็นชุดควบคุม (negative control)[1]

8.1.2 การหาค่า minimum inhibitory concentration (MIC) และ minimum bactericidal concentration (MBC)

นำสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้จากวิธีการทดลองในข้อ 8.1.1 มาหาค่า MIC ด้วยวิธี 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay[1] โดยการเจือจางสารสกัดเป็นลำดับทีละ 2 เท่า ด้วยสารละลาย DMSO เข้มข้น 10% ในการทดลองทำใน 96 well plate โดยใช้สารสกัดปริมาตร 50 ไมโครลิตร เติมอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB ปริมาตร 10 ไมโครลิตร จากนั้นเติมเชื้อทดสอบที่ความเข้มข้น 10^6 cfu/mL ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ผสมให้เข้า

กันด้วยปิเปต บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง ในการตรวจผลจะเติมสารละลาย MTT เข้มข้น 0.12 มิลลิโมลาร์ (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร บ่มต่อที่อุณหภูมิเดิมนาน 4 ชั่วโมง ถ้าสารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้ส่วนผสมจะใสเนื่องจากไม่มีการเจริญของเชื้อ แต่ถ้าสารสกัดไม่สามารถยับยั้งได้ เชื้อจะเจริญและผลิตเอนไซม์ dehydrogenase รีดิวส์สาร MTT เกิดตะกอนเซลล์สีม่วงของ formazan ในการทดลองนี้ใช้ยา ampicillin เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็น positive control และใช้ DMSO เข้มข้น 10% เป็น negative control ทั้งนี้ MIC คือความเข้มข้นของสารสกัดที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้

ส่วนการทดสอบ MBC ให้เลือกหลุมทดสอบที่ให้ผล MIC และหลุมที่มีความเข้มข้นของสารสูงขึ้นที่ติดกัน จำนวน 3 หลุม โดยดูดสารปริมาตร 2 ไมโครลิตร มาหยดลงบนอาหารแข็ง MHA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง สังเกตการเจริญของเชื้อ โดยความเข้มข้นของสารสกัดที่น้อยที่สุดที่ไม่พบการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย คือ MBC[43]

8.2 การศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระ สารฟลาโวนอยด์ และสารประกอบฟีนอลทั้งหมด

สารสกัดจากเห็ดที่ได้จากวิธีการทดลองในข้อ 7 นำมาทดสอบคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ สารฟลาโวนอยด์ และสารประกอบฟีนอลทั้งหมดด้วยวิธีดังต่อไปนี้

8.2.1 การทดสอบคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระด้วยปฏิกิริยาของ 2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activities

นำสารสกัดจากเห็ดมาเจือจางเป็นลำดับทีละ 2 เท่า (two-fold dilution) ด้วยสารละลายเอทานอลเข้มข้น 95% (1:2 ถึง 1:256 v/v) ดูดสารสกัดแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 900 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารอนุมูลอิสระ $DPPH^{\cdot}$ เข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ (ภาคผนวก ก) 300 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดนาน 30 นาที เมื่อครบเวลานำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ โดยชุดควบคุมใช้สารละลายเอทานอลนอลเข้มข้น 95% แทนสารสกัด ซึ่งความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดได้คำนวณจากสีที่จางลงของ DPPH ดังสมการ

$DPPH^{\bullet}$ (สีน้ำเงิน) + AH (สารต้านอนุมูลอิสระ) ---> DPPH-H (สีเหลือง) + $A^{\bullet}$

จากนั้นคำนวณค่าร้อยละการยับยั้ง (% inhibition) จากสูตร

% inhibition = [(Ac-As)/Ac] x 100

Ac = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม (เอทานอลเข้มข้น 95%)

As = ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัด

ค่าร้อยละการยับยั้งของสารสกัดที่ระดับการเจือจางต่างๆ นำมาสร้างกราฟความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารสกัดเพื่อคำนวณหาค่า IC_{50} คือความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 ซึ่งสารมาตรฐานที่ใช้เทียบเคียงได้แก่ Butylated hydroxy toluene (BHT)[67]

8.2.2 การทดสอบคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระด้วยปฏิกิริยาของ 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt ($ABTS^{+}$) radical scavenging activities

นำสารสกัดจากเห็ดมาเจือจางเป็นลำดับทีละ 2 เท่า ด้วยน้ำกลั่น (1:2 ถึง 1:256 v/v) ดูดสารสกัดแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 125 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ เข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 880 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดนาน 6 นาที เมื่อครบเวลานำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ โดยชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นแทนสารสกัดซึ่งความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระของสารสกัดคำนวณจากสีที่จางลงของ ABTS ดังสมการ

$ABTS^{\bullet+}$ (สีเขียวอมน้ำเงิน) + AH (สารต้านอนุมูลอิสระ) ---> ABTS (สีจางลง) + $A^{\bullet}$

จากนั้นคำนวณค่าร้อยละการยับยั้ง (% inhibition) จากสูตร

% inhibition = [(Ac-As)/Ac] x 100

Ac = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม (น้ำกลั่น)

As = ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัด

ค่าร้อยละการยับยั้งของสารสกัดที่ระดับการเจือจางต่างๆ ที่ได้นำมาสร้างกราฟความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารสกัดเพื่อคำนวณหาค่า IC_{50} คือความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 สารมาตรฐานที่ใช้เทียบเคียงได้แก่ Trolox®[67]

8.2.3 การทดสอบความสามารถในการเป็นสารคีเลท (chelating agent) โดยการทำปฏิกิริยากับสาร ferrous ion (Ferrous ion chelating assay)

เป็นการทดลองที่ศึกษาคุณสมบัติของสารสกัดในการเป็น chelating agent เพื่อยับยั้งการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของ ferrous ion-ferrozine เทียบกับ positive control ชนิด EDTA โดยนำสารสกัดเห็ดที่สกัดด้วยเอทานอลมาเจือจางเป็นลำดับทีละ 2 เท่า ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นเติมเมทานอล ปริมาตร 925 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเติมสารละลายเฟอร์รัส คลอไรด์ ($FeCl_2$) (ภาคผนวก ก) เข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และ เติมสารละลายเฟอร์โรซิน (Ferrozine solution) (ภาคผนวก ก) เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลา วัดค่าสีที่เปลี่ยนไปที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร จากนั้นหาค่าร้อยละการยับยั้งจากสมการ

AH (สารคีเลท)+Fe^{2+}+ferrozine (ไม่มีสี) ---> A-Fe + Ferrozine (ไม่มีสี)

AH (ไม่ใช่สารคีเลท)+Fe^{2+}+ferrozine (ไม่มีสี) ---> AH + Ferrozine-Fe complex (สีม่วง)

จากนั้นคำนวณค่าร้อยละการยับยั้ง (% inhibition) จากสูตร

% inhibition = [(Ac-As)/Ac] x 100

Ac = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม (น้ำกลั่น)

As = ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัด

ค่าร้อยละการยับยั้งของสารสกัดที่ระดับการเจือจางต่างๆ ที่ได้นำมาสร้างกราฟความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารสกัดเพื่อคำนวณหาค่า IC_{50} คือความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนได้ร้อยละ 50 สารมาตรฐานที่ใช้เทียบเคียงได้แก่ EDTA[68]

8.2.3 การหาปริมาณของสารประกอบฟลาโวนอยด์ (Total flavonoid contents)

นำสารสกัดจากเห็ดมาหาปริมาณของสารประกอบฟลาโวนอยด์ โดยใช้สารสกัดปริมาตร 125 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลายโซเดียมไนไตรท์ ($NaNO_2$) เข้มข้น 1:20 w/v (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วเติมสารละลายอะลูมิเนียมคลอไรด์ ($AlCl_3$) เข้มข้น 1:10 w/v (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 150 ไมโครลิตร สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เข้มข้น 0.5 โมลาร์ (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น 950 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำมาตรวจค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ค่าที่ได้นำไปเทียบเคียงกับกราฟมาตรฐานของ Quercetin รายงานผลเป็น g QE/g extract[69]

8.2.5 การหาปริมาณของสารประกอบฟีนอล (Total phenolic compounds)

นำสารสกัดจากเห็ดมาหาปริมาณสารประกอบฟีนอลด้วยวิธี Folin-Ciocalteu's method[67] โดยนำสารสกัดปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent ที่เจือจาง 10 เท่า (v/v) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร (ภาคผนวก ก) และสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) เข้มข้น 7.5% (w/v) (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ผสมสารต่างๆ ให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาตรวจค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 735 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ค่าที่ได้นำไปเทียบเคียงกับกราฟมาตรฐานของ Gallic acid รายงานผลเป็น g GAE/g extract

8.3 การศึกษาคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งของสารสกัด

นำสารสกัดจากเห็ดที่ได้จากตัวทำละลายเอทานอลและเอธิลอะซิเตท มาระเหยให้แห้ง แล้วละลายด้วยสารละลาย DMSO เข้มข้น 100% จากนั้นนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง ได้แก่ มะเร็งเต้านม (MCF7-breast cancer) มะเร็งช่องปาก (KB-Oral cavity cancer) มะเร็งปอด (NCI-H187-small cell lung cancer) ด้วยวิธี Resazurin microplate assay (REMA) โดยทำการส่งทดสอบที่ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

8.4 การศึกษาคุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ alpha-glucosidase

ในการวัดคุณสมบัติของสารสกัดในการลดปริมาณน้ำตาลในรูปของการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ alpha-glucosidase โดยนำสารสกัดมาปรับให้มีความเข้มข้นต่างๆ (0.5, 1, 1.5, 2 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ในสารละลาย DMSO ปริมาตร 125 ไมโครลิตร แล้วเติมเอนไซม์ alpha-glucosidase เข้มข้น 0.025 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในสารละลาย phosphate buffer (pH 6.9)

(ภาคผนวก ก) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที แล้วเติมสารตั้งต้น p-nitrophenyl-alpha-D-glucopyranoside (PNPG) (ภาคผนวก ก) เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 250 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มต่อนาน 20 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) (ภาคผนวก ก) เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร โดยเทียบกับปฏิกิริยาที่เติมสารละลาย DMSO แทนสารสกัด (negative control) จากนั้นคำนวณค่าร้อยละในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (% inhibition)[70] ตามสมการ

PNPG (ไม่มีสี) + alpha-glucosidase --- > D-glucose + *p*-nitrophenol (สีเหลือง)

% inhibition = [(Ac – As) / Ac] x 100

Ac = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม (DMSO)

As = ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัด

ค่าร้อยละการยับยั้งของสารสกัดที่ระดับการเจือจางต่างๆ นำมาสร้างกราฟความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารสกัด เพื่อคำนวณหาค่า IC_{50} คือความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ alpha- glucosidase ได้ร้อยละ 50 โดยสารมาตรฐานที่ใช้เทียบเคียงคือยารักษาโรคเบาหวาน acarbose

8.5 การศึกษาคุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ alpha-amylase

นำสารสกัดมาปรับให้มีความเข้มข้นต่างๆ (0.5, 1, 1.5, 2 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ในสารละลาย DMSO ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วเติมเอนไซม์ alpha-amylase เข้มข้น 2 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในสารละลาย phosphate buffer (pH 6.9) (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นเติมสารละลาย soluble starch (ภาคผนวก ก) เข้มข้นร้อยละ 1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วเติมสารละลาย 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มที่ 100 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นวัดปริมาณ reducing sugar โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร โดยใช้ positive control เป็น acarbose ค่าที่ได้รายงานเป็น IC_{50} เช่นเดียวกับการวัดเอนไซม์ alpha-glucosidase จากนั้นคำนวณค่าร้อยละในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (% inhibition)[70] ตามสมการ

% inhibition = [(Ac – As) / Ac] x 100

Ac = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม (DMSO)

As = ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัด

ค่าร้อยละการยับยั้งของสารสกัดที่ระดับการเจือจางต่างๆ นำมาสร้างกราฟความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารสกัด เพื่อคำนวณหาค่า IC_{50} คือความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ alpha-amylase ได้ร้อยละ 50 โดยสารมาตรฐานที่ใช้เทียบเคียงคือยารักษาโรคเบาหวาน acarbose

8.6 การศึกษาคุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMG -CoA reductase

ในการวัดคุณสมบัติของสารสกัดในการลดระดับคอเลสเตอรอลในรูปของการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMG -CoA reductase โดยนำสารสกัดมาระเหยตัวทำละลายออกจนหมด แล้วละลายกลับในสารละลายที่มีอัตราส่วนของ DMSO:น้ำกลั่นเท่ากับ 1:10 (DMSO เข้มข้นร้อยละ 10) ปรับให้มีความเข้มข้นต่างๆ เติมลงใน 96 well plate ปริมาตร 174 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารสกัดปริมาตร 10 ไมโครลิตร ก่อนการเติม NADPH ปริมาตร 4 ไมโครลิตร ตามด้วยสารตั้งต้น HMG-CoA ปริมาตร 12 ไมโครลิตร และเริ่มปฏิกิริยาโดยการเติมเอนไซม์ HMG-CoA reductase ปริมาตร 2 ไมโครลิตร จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร โดยอ่านค่าทุกๆ 20 วินาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำค่าที่วัดได้มาสร้างกราฟเพื่อหาค่า slope และคำนวณหาร้อยละของอัตราการยับยั้ง (% inhibition rate) ตามสมการ [53]

ร้อยละของอัตราการยับยั้ง (% inhibition rate) = [(A-B)/A]x100

A = ค่า slope ของกราฟปฏิกิริยาควบคุม

B = ค่า slope ของกราฟปฏิกิริยาสารสกัด

9. การวิเคราะห์รูปแบบทางเคมีของสารสกัดจากเห็ดสกุล *Ramaria* ด้วยเทคนิค High performance liquid chromatography (HPLC)

การวิเคราะห์รูปแบบทางเคมีของสารสกัดด้วยเทคนิค HPLC เป็นการศึกษาความหลากหลายและจำนวนของสารสกัดจากเห็ดชนิดต่างๆ ในเบื้องต้นโดยเน้นการศึกษาสารประกอบฟีนอลเป็นหลัก เพื่อเป็นข้อมูลในการเลือกศึกษาชนิดของสารในเชิงลึกต่อไป โดยนำสารสกัดเห็ดที่ได้จากการทดลองในข้อ 7 ที่อยู่ในตัวทำละลายเอทานอล กรองผ่านเมมเบรนชนิด PTPE syringe filter (Filter-Bi) ที่มี

ขนาดของตัวกรองเท่ากับ 0.22 ไมโครเมตร ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ผ่านคอลัมน์ inertsill ODS-3 ขนาดกว้าง 4.6 มิลลิเมตร ยาว 300 มิลลิเมตร ที่บรรจุด้วย silica base (C18) ขนาด 5 ไมโครเมตร ใช้ตัวทำละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) เป็นแบบระบบไล่ความเข้มข้น (gradient phase) ซึ่งประกอบด้วยน้ำกลั่น (ที่เติม orthophosphoric acid เข้มข้นร้อยละ 1 (v/v)) (A) และ สารอาซิโตไนไตรล์ (acetonitrile) (B) (ตาราง 10) โดยมีอัตราการไหลเท่ากับ 0.3 มิลลิลิตรต่อนาที ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 272 นาโนเมตร สารมาตรฐานที่ใช้ คือ gallic acid[39] จากรูปแบบทางเคมีของสารที่ตรวจวัดได้นำมาวิเคราะห์มวลโมเลกุลของสารด้วยวิธี

ตาราง 10 อัตราความเข้มข้นในการทดลองด้วยเทคนิค HPLC

ร้อยละความเข้มข้นสารละลาย A (น้ำกลั่น ที่เติม orthophosphoric acid ร้อยละ 1 (v/v))	ร้อยละความเข้มข้นสารละลาย B (acetonitrile)	ระยะเวลา (นาที)
94	6	0-12
88	12	12-20
60	40	20-30
40	60	30-38
10	90	38-48
0	0	48-53
94	6	53-60

10. การวิเคราะห์สารโดยวิธี Liquid chromatography- electrospray ionization- mass spectrophotometry (LC-ESI-MS)

นำสารสกัดของมากรองด้วยเมมเบรนชนิด PTPE syringe filter (Filter-Bi) ที่มีขนาดของตัวกรองเท่ากับ 0.22 ไมโครเมตร โดยให้ได้ปริมาตรสุทธิ 3 มิลลิลิตร จากนั้น บรรจุในขวดสีชาเพื่อส่งวิเคราะห์ ณ ศูนย์เครื่องมือ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ด้วยเทคนิค LC-ESI-MS โดยใช้คอลัมน์และระบบในการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 9 โดยอาศัยหลักการแยกสารเบื้องต้นด้วยเทคนิค HPLC จากนั้นวิเคราะห์มวลโมเลกุลของสารที่แยกได้ด้วยเทคนิค ESI-MS โดยสารสกัดที่แยกผ่าน

คอลัมน์ HPLC แล้วจะทำให้เกิดการแตกตัวเป็นไอออน และวัดค่ามวลต่อประจุ (m/z) ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้กำหนดให้สแกนหามวลโมเลกุลของสารที่มีขนาดระหว่าง 100-800 m/z แล้วนำมาวิเคราะห์เทียบค่ากับฐานข้อมูล massbank

11. การวิเคราะห์ปริมาณกรดฟีนอลิกบางชนิดเทียบกับสารมาตรฐาน ด้วยเทคนิค MRM-MS/MS

นำสารสกัดมากรองด้วยเมมเบรนชนิด PTPE syringe filter (Filter-Bi) ที่มีขนาดของตัวกรองเท่ากับ 0.22 ไมโครเมตร สารที่ได้นำไปวิเคราะห์ปริมาณกรดฟีนอลิก เทียบกับมาตรฐาน จำนวน 7 ชนิด ได้แก่ gallic acid, salicylic acid, valnilic acid, syringic acid, valnilin, coumaric acid และ benzoic acid ด้วยเครื่อง MRM-MS/MS

12. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์ผลทางสถิติ one way ANOVA เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Turkey's HSD ที่ระดับนัยสำคัญ ($p<0.05$) โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS statistics 20

บทที่ 4
ผลการทดลอง

1. การเก็บรวบรวมตัวอย่างเห็ดปะการังและการจัดจำแนกชนิด

ตัวอย่างดอกเห็ดปะการัง ได้เก็บรวบรวมจากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียว จังหวัดชัยภูมิ บริเวณพื้นที่ป่าสนผสมเต็งรัง เพื่อนำมาแยกเพาะเลี้ยงเชื้อและจัดจำแนกชนิดตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ส่วนดอกเห็ดที่เหลืออบแห้งเก็บรักษาเป็นตัวอย่างเห็ดแห้งเพื่อการศึกษาอ้างอิงต่อไป

1.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ในการรวบรวมตัวอย่างดอกเห็ด จากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียว จังหวัดชัยภูมิ บริเวณพื้นที่ป่าสนผสมเต็งรัง พบว่าได้ตัวอย่างเห็ดปะการังที่มีลักษณะที่สมบูรณ์ทั้งสิ้นจำนวน 39 ตัวอย่าง จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสี ขนาด รูปร่างของการแตกกิ่ง แคลมป์คอนเนคชั่น (clamp connection) ซิสทิเดีย (cystidia) เบสิเดีย (basidia) เบสิดิโอสปอร์ (basidiospores) และลักษณะของลวดลายบนผิวสปอร์ (spore ornamentation) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด รวมทั้งการเกิดปฏิกิริยาทางเคมีของสารละลายกับเนื้อเยื่อดอกเห็ด สามารถจัดจำแนกชนิดเห็ดปะการังได้ 3 สกุล คือ *Ramaria* (14 สปีชีส์) *Lentaria* (1 สปีชีส์) และ *Phaeoclavulina* (1 สปีชีส์) (ตาราง 11) เนื่องจาก *Ramaria* เป็นสกุลหลักที่พบในการศึกษาครั้งนี้ ประกอบด้วย 14 สปีชีส์ ซึ่งในจำนวนนี้เป็น สปีชีส์ที่ยังไม่สามารถระบุได้อย่างถูกต้องถึง 10 สปีชีส์ รวมทั้งคาดว่าน่าจะเป็นสปีชีส์ใหม่ของโลกอย่างน้อย 2 สปีชีส์ อีกด้วย ได้แก่ *R. conjunctipes* var. *tsugensis*, *R.* aff. *flava* var. *aurea*, *R.* aff. *rubribrunnescens*, *R.* aff. *vinosimaculans*, *Ramaria* sp. 1, *Ramaria* sp. 2, *Ramaria* sp. 3, *Ramaria* sp. 4, *Ramaria* sp. 5, *Ramaria* sp. 6, *Ramaria* sp. 7, *Ramaria* sp. 8, *Ramaria* sp. 9 และ *Ramaria* sp. 10 รายละเอียดแสดงในตาราง 11

ในขณะที่อีก 2 สกุล คือ *Lentaria* และ *Phaeoclavulina* ซึ่งมีลักษณะของดอกเห็ดแตกกิ่งก้านคล้ายกับ *Ramaria* โดยเฉพาะ *Phaeoclavulina* เป็นสกุลที่แยกมาจาก *Ramaria* subgenus *Echinoramaria* คือมีผิวสปอร์ที่มีลักษณะขรุขระ คล้ายหนาม ซึ่งต้องศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด จึงจะสามารถแยกความแตกต่างได้อย่างชัดเจน ในการศึกษาครั้งนี้พบ 1 สปีชีส์ ได้แก่ *P. cokeri* (R.H. Petersen) Giachini (Syn. *R. cokeri* R.H. Petersen)

ส่วน *Lentaria* เป็นอีกสกุลหนึ่งที่จัดอยู่ในกลุ่มเห็ดปะการัง วงศ์ Lentariaceae ลักษณะภายนอกคล้ายกับ *Ramaria* แต่ผิวของสปอร์มีลักษณะเรียบ พบ 1 สปีชีส์ คือ *Lentaria* sp. (PKWS15-164)

ทั้งนี้จากผลการแยกเพาะเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกัน 3 ชนิด ได้แก่ PDA, MNC และ Czapek's dox agar พบว่า ไม่สามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์ได้ในการศึกษาครั้งนี้ อาจเนื่องจากเห็ดปะการังมีลักษณะเป็นกิ่งก้านที่มีขนาดเล็ก เปราะแตกหักง่าย ทำให้แยกเนื้อเยื่อชั้นในมาเพาะเลี้ยงได้ยาก และปนเปื้อนจากราชนิดอื่นได้ง่าย ที่สำคัญไม่พบการเจริญของเส้นใยราจากสปอร์

ตาราง 11 สกุลและชนิดของเห็ดปะการังที่พบในการศึกษาครั้งนี้

วงศ์	สกุลและสปีชีส์	ตัวอย่างที่ศึกษา
Gomphaceae	*Ramaria conjunctipes* var. *tsugensis* Marr & D.E. Stuntz	PKWS14-18
	Ramaria aff. *flava* var. *aurea* (Coker) R.H. Petersen	**PKWS15-171**
	Ramaria aff. *rubribrunnescens*	PKWS14-17, PKWS14-26, PKWS14-33, PKWS14-47
	Ramaria aff. *vinosimaculans*	PKWS15-29, PKWS15-49, PKWS14-54, **PKWS15-74**, PKWS15-236, PKWS15-25, **PKWS15-109**
	Ramaria sp. 1	**PKWS15-95**, PKWS15-96, PKWS15-222
	Ramaria sp. 2	**PKWS15-221**, PKWS15-235
	Ramaria sp. 3	**PKWS14-02**, PKWS14-07, PKWS14-19, PKWS14-24, PKWS14-35, PKWS14-51
	Ramaria sp. 4	PKWS14-25, PKWS14-28, PKWS14-31, PKWS14-39, PKWS14-46, PKWS15-208

ตาราง 11 (ต่อ)

วงศ์	สกุลและสปีชีส์	ตัวอย่างที่ศึกษา
	Ramaria sp. 5	PKWS15-214
	Ramaria sp. 6	PKWS15-232
	Ramaria sp. 7	PKWS14-12
Gomphaceae	*Ramaria* sp. 8	PKWS14-30
	Ramaria sp. 9	**PKWS15-92**
	Ramaria sp. 10	**PKWS15-181**
	Phaeoclavulina cokeri (R.H. Petersen) Giachini (Syn. *Ramaria cokeri* R.H. Petersen)	**PKWS15-194**
Lentariaceae	*Lentaria* sp.	**PKWS15-164**

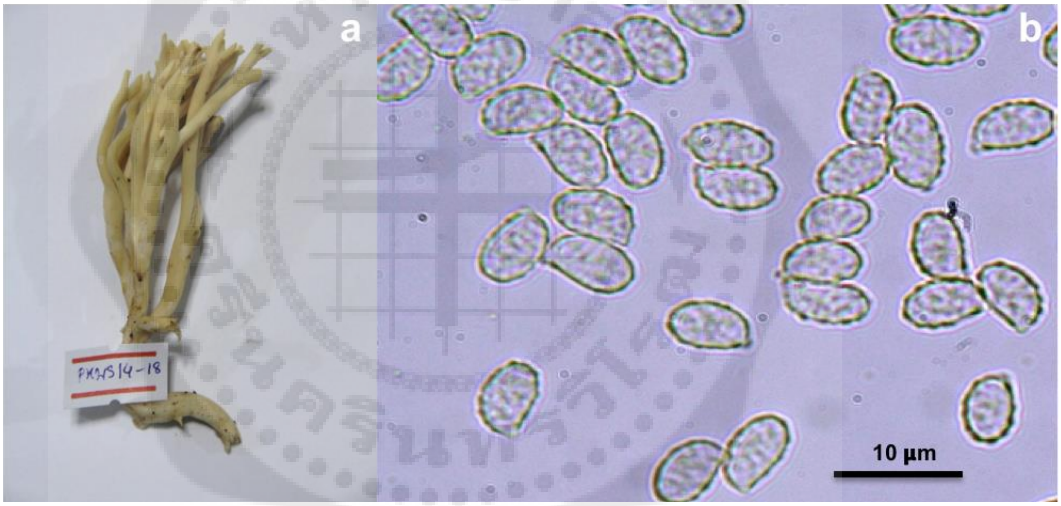
หมายเหตุ: ตัวอักษรหนา คือ ตัวอย่างที่เลือกไปศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเนื่องจากมีจำนวนตัวอย่างเพียงพอ

ตาราง 12 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดปะการังสกุล *R. conjunctipes* var. *tsugensis* และ *R.* aff. *flava* var. *aurea*

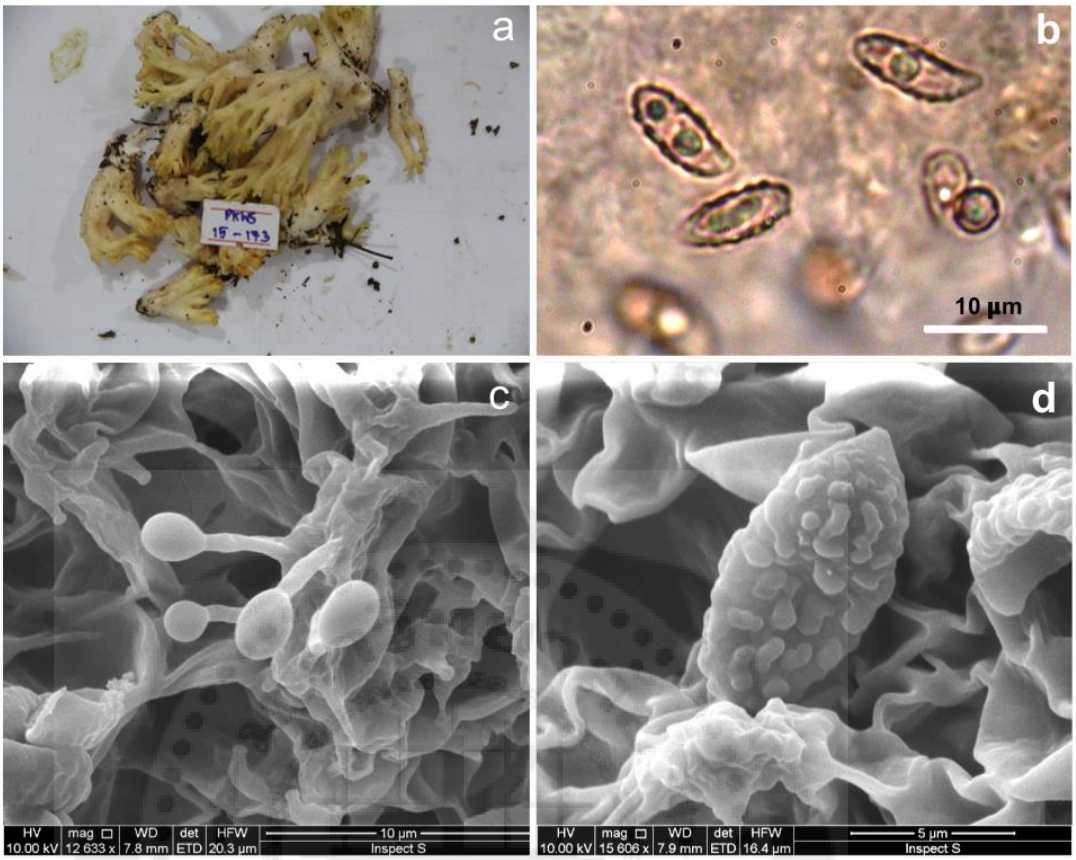
ลักษณะ	*R. conjunctipes* var. *tsugensis* Marr & D.E. Stuntz	*R.* aff. *flava* var. *aurea* (Coker) R.H. Petersen
ลักษณะดอกเห็ด		
ขนาด กว้าง x สูง (เซนติเมตร)	2.5-3 x 5	2-3 x 3-8
สีของดอกเห็ด		
ฐาน	สีครีม (pale ochracous)	สีครีม (pale ochracous)
ส่วนกลาง (กิ่ง)	สีครีม (pale ochracous)	สีเหลือง (yellow)
ปลาย	สีครีม (pale ochracous)	สีเหลือง (yellow)
ฐานของดอกเห็ด	ฐานเดี่ยว ผอม	ฐานร่วม (compound) ค่อนข้างสั้น
การแตกกิ่ง		
ลักษณะ	แตกกิ่งเรียวเล็ก กิ่งปิด	แตกกิ่งไม่ยาว โค้ง กิ่งเปิด เล็กน้อย
จำนวนชั้น (ชั้น)	3-5	4-6
กิ่งปลาย	dichotomy	unequal development of branching
ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์		
เบสิดิโอสปอร์		
ขนาด ยาว x กว้าง (ไมโครเมตร)	6-10 x 4-6	9-12.6 x 4-6
สีและรูปร่าง	ค่อนข้างยาวรี (elongate ellipsoid) เหลืองอมเขียว ใส (yellowish green, clear)	ค่อนข้างยาวรี (elongate elipsoid) เหลืองอมเขียว ใส (yellowish green, clear)
ลวดลายบนผิวสปอร์	ขรุขระเป็นตุ่มนูนชัดเจน (strong verrucose)	ขรุขระเป็นตุ่มนูน (verrucose)
เบสิเดีย	holobasidia แบบ clavate	holobasidia แบบ clavate
สเตอริกมา	2-4	2-4

ตาราง 12 (ต่อ)

ลักษณะ	*R. conjunctipes* var. *tsugensis* Marr & D.E. Stuntz	*R.* aff. *flava* var. *aurea* (Coker) R.H. Petersen
ซิสทิเดีย	ไม่พบ	ไม่พบ
แคลมป์ คอนเนคชั่น	ไม่พบ	ไม่พบ
ลักษณะภายใต้กล้อง	ภาพประกอบ 10	ภาพประกอบ 11
ตัวอย่างที่ศึกษา	PKWS14-18	PKWS15-171



ภาพประกอบ 10 *R. conjunctipes* var. *tsugensis* (PKWS14-18) a) ดอกเห็ด และ b) เบสิดิโอสปอร์มีลวดลายขรุขระเป็นตุ่มนูน (verrucose)



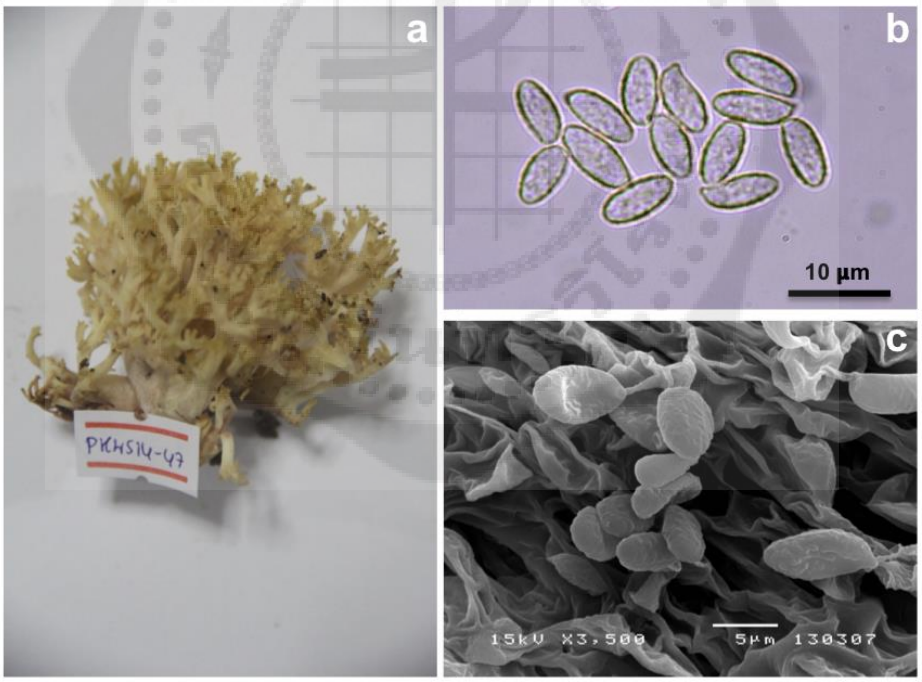
ภาพประกอบ 11 *R.* aff. *flava* var. *aurea* (PKWS15-173) a) ดอกเห็ด, b) เบสิดิโอสปอร์ขรุขระเป็นตุ่มนูน (verrucose), c) สเตอริกมา 4 อัน และ d) เบสิดิโอสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

ตาราง 13 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดปะการัง *R.* aff. *rubribrunnescens* และ *R.* aff. *vinosimaculans*

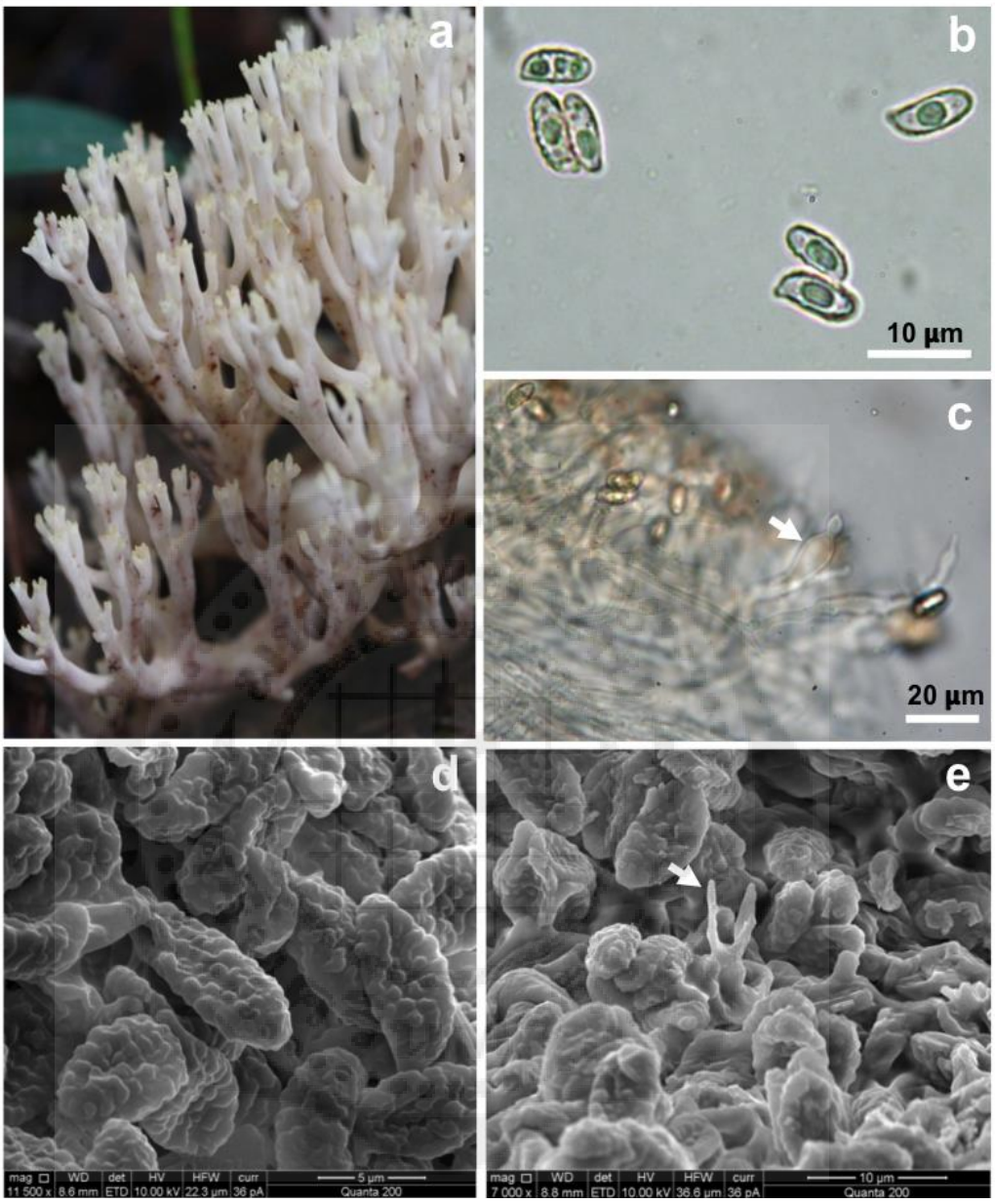
ลักษณะ	*R.* aff. *rubribrunnescens*	*R.* aff. *vinosimaculans*
ลักษณะดอกเห็ด		
ขนาด กว้าง x สูง (เซนติเมตร)	6 x 5.5	1.5-6 x 6-10
สีของดอกเห็ด		
ฐาน	สีครีมอมน้ำตาล (pale buff) พบรอยช้ำสีม่วงเข้ม (rutescent)	สีครีม พบรอยช้ำสีไวน์แดง (vinascent)
ส่วนกลาง (กิ่ง)	สีครีมอมน้ำตาล (pale buff)	สีครีมถึงสีเหลืองอ่อน (pale yellow)
ปลาย	สีครีมอมเหลือง (pale ochracous)	สีเหลือง (yellow)
ฐานของดอกเห็ด	ฐานร่วม (compound) ไม่กว้างมาก	ฐานร่วม (compound) ไม่กว้างมาก
การแตกกิ่ง		
ลักษณะ	กิ่งสั้นโค้งและอวบ	แตกกิ่งตรง ยาวเรียว ค่อนข้างเปิด
จำนวนชั้น (ชั้น)	3-5	6-8
กิ่งปลาย	dichotomy	symmetrical dichotomy
ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์		
เบสิดิโอสปอร์		
ขนาด ยาว x กว้าง (ไมโครเมตร)	8.5-12.2 x 3.5-5.0	(8-)9-12 x 4-6
สีและรูปร่าง	ค่อนข้างรี (elongate ellipsoid) สีเหลืองอมเขียว ใส (yellowish green, clear)	ค่อนข้างรี (elongate ellipsoid) สีเหลืองอมเขียว ใส (yellowish green, clear)
ลวดลายบนผิวสปอร์	ขรุขระเป็นตุ่มนูน (verrucose)	ขรุขระเป็นตุ่มนูนชัดเจน (verrucose)
เบสิเดีย	holobasidia แบบ clavate	holobasidia แบบ clavate
สเตอริกมา	4	2-4

ตาราง 13 (ต่อ)

ลักษณะ	*R.* aff. *rubribrunnescens*	*R.* aff. *vinosimaculans*
ซิสทิเดีย	clavate, utriform, urniform, cylindrical, fusiform	clavate, lageniform, utriform, urniform, cylindrical, fusiform
แคลมป์ คอนเนคชั่น	ไม่พบ	ไม่พบ
ลักษณะภายใต้กล้อง	ภาพประกอบ 12	ภาพประกอบ 13
ตัวอย่างที่ศึกษา	PKWS14-17, PKWS14-26, PKWS14-33, PKWS14-47	PKWS15-29, PKWS15-49, PKWS14-54, **PKWS15-74**, PKWS15-236, PKWS15-25, **PKWS15-109**



ภาพประกอบ 12 *R.* aff. *rubribrunnescens* (PKWS14-47) a) ดอกเห็ด, b) เบสิดิโอสปอร์ขรุขระเป็นตุ่มนูน (verrucose) และ c) เบสิดิโอสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด



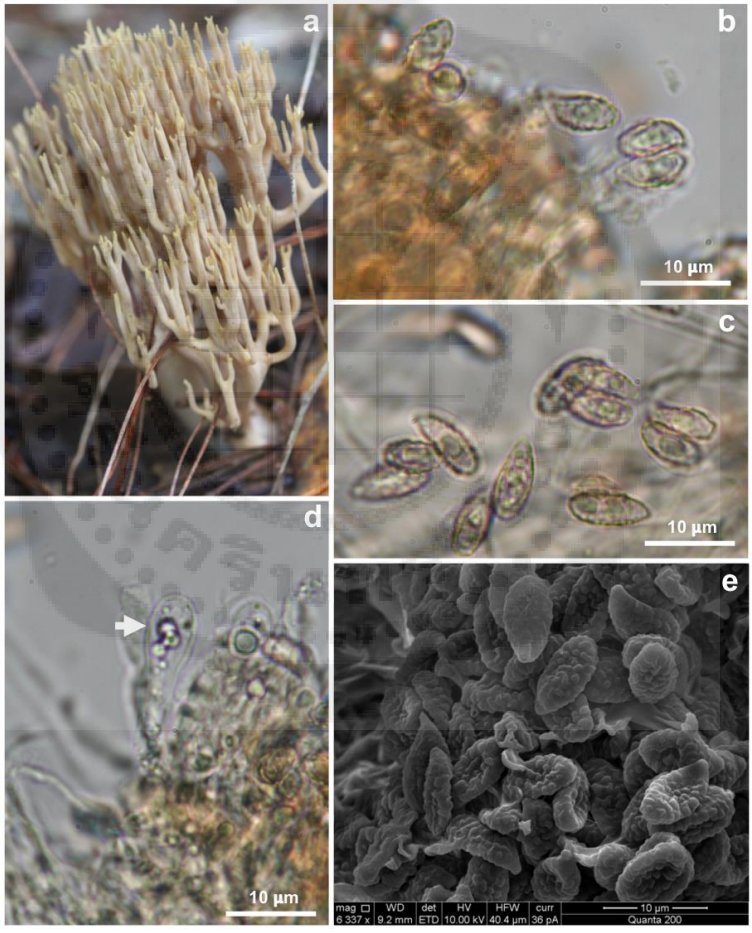
ภาพประกอบ 13 *R.* aff. *vinosimaculans* (PKWS15-109) a) ดอกเห็ด, b) เบสิดิโอสปอร์ขรุขระเป็นตุ่มนูน (verrucose), c) ซิสทิเดีย (ลูกศร), d) เบสิดิโอสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด และ e) สเตอริกมา 4 อัน (ลูกศร) และเบสิดิโอสปอร์

ตาราง 14 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดปะการังสกุล *Ramaria* sp. 1 และ *Ramaria* sp. 2

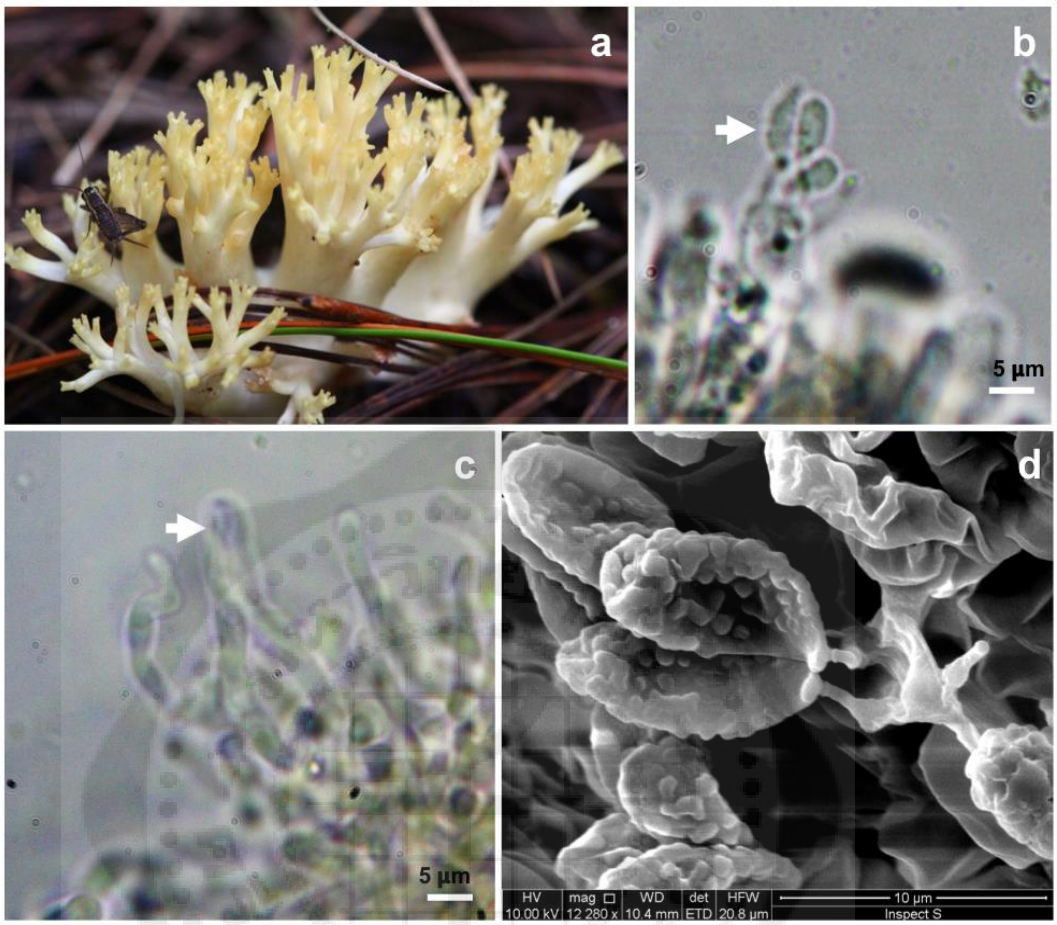
ลักษณะ	***Ramaria* sp.1**	***Ramaria* sp.2**
ลักษณะดอกเห็ด		
ขนาด กว้าง x สูง (เซนติเมตร)	3-6 x 4-11	3-5 x 4.5-6
สีของดอกเห็ด		
ฐาน	สีขาวครีมถึงสีน้ำตาลอ่อน (buff)	สีครีม (pale ochracous)
ส่วนกลาง (กิ่ง)	สีน้ำตาล (straw)	สีน้ำตาลครีม (pale buff)
ปลาย	สีน้ำตาล (straw)	สีน้ำตาลครีม (pale buff)
ฐานของดอกเห็ด	ฐานร่วม (compound) อวบและยาว	ฐานร่วม (compound)
การแตกกิ่ง		
ลักษณะ	แตกกิ่งสั้นใหญ่ในชั้น 1-2 และแตกกิ่งสั้นเล็กในชั้น 3-8 กิ่งปิด	แตกกิ่งสั้น ชั้นล่างจะแตกกิ่งยาวกว่าชั้นบน กิ่งค่อนข้างเปิด
จำนวนชั้น (ชั้น)	6-8	4-6
กิ่งปลาย	double dichotomy	discussation
ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์		
เบสิดิโอสปอร์		
ขนาด ยาว x กว้าง (ไมโครเมตร)	(8.2-)9-12.4(-13) x 4-6	9.7-12.5(-13) x 4-5(-7)
สีและรูปร่าง	ค่อนข้างรี (elongate ellipsoid) เหลืองอมเขียว ใส (yellowish green, clear)	ค่อนข้างรี (ellipsoid) เหลืองอมเขียว ใส (yellowish green, clear)
ลวดลายบนผิวสปอร์	ขรุขระเป็นตุ่มนูนชัดเจน (strong verrucose)	ขรุขระเป็นตุ่มนูนใหญ่ชัดเจน (strong verrucose)
เบสิเดีย	holobasidia แบบ clavate	holobasidia แบบ clavate
สเตอริกมา	2-4	2-4
ซิสทิเดีย	clavate และ lecythiform	clavate

ตาราง 14 (ต่อ)

ลักษณะ	*Ramaria* sp.1	*Ramaria* sp.2
แคลมป์ คอนเนคชั่น	พบ	ไม่พบ
ลักษณะภายใต้กล้อง	ภาพประกอบ 14	ภาพประกอบ 15
ตัวอย่างที่ศึกษา	PKWS15-95, PKWS15-96, PKWS15-222	PKWS15-221, PKWS15-235



ภาพประกอบ 14 *Ramaria* sp. 1 (PKWS15-95) a) ดอกเห็ด, b-c) เบสิดิโอสปอร์ขรุขระเป็นตุ่มนูน (verrucose), d) ซิสทิเดีย (ลูกศร) และ e) เบสิดิโอสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด



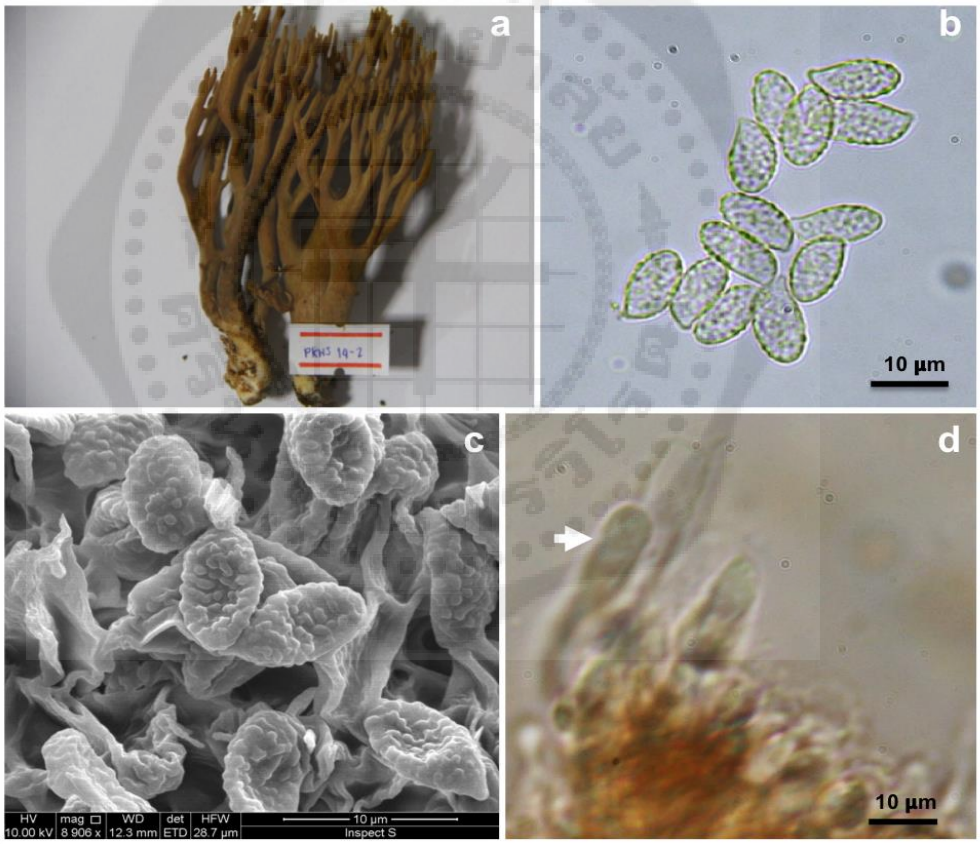
ภาพประกอบ 15 *Ramaria* sp. 2 (PKWS15-221) a) ดอกเห็ด, b) เบสิดิโอสปอร์บนเบสิเดียมที่มีสเตอริกมา (ลูกศร), c) ซิสทิเดีย (ลูกศร) และ d) เบสิดิโอสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

ตาราง 15 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดปะการังสกุล *Ramaria* sp. 3 และ *Ramaria* sp. 4

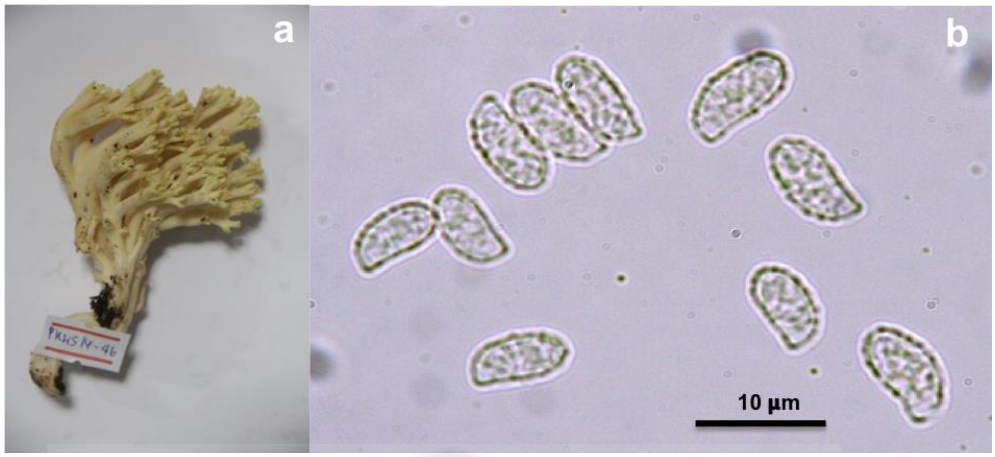
ลักษณะ	***Ramaria* sp. 3**	***Ramaria* sp. 4**
ลักษณะดอกเห็ด		
ขนาด กว้าง x สูง (เซนติเมตร)	3.5-5 x 5-9.5	6-11 x 5-14
สีของดอกเห็ด		
ฐาน	สีน้ำตาล (straw)	สีขาวครีม (pale cream)
ส่วนกลาง (กิ่ง)	สีน้ำตาลแดงถึงน้ำตาลเข้ม (radish brown)	สีขาวครีม (pale cream)
ปลาย	สีน้ำตาลเข้ม (snuff brown)	สีขาวครีม (pale cream)
ฐานของดอกเห็ด	ฐานร่วม (compound) ไม่กว้าง	ฐานร่วม (compound) ไม่กว้าง
การแตกกิ่ง		
ลักษณะ	กิ่งเล็กเรียวไม่ยาวมาก ค่อนข้าง	แตกกิ่งซับซ้อน 2-4 แฉกในชั้นแรกๆ กิ่งปิด
จำนวนชั้น (ชั้น)	6-8	4-5
กิ่งปลาย	dichotomy	poly dichotomy
ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์		
เบสิดิโอสปอร์		
ขนาด ยาว x กว้าง (ไมโครเมตร)	10-13.1(-14) x 4.4-6(-7)	6-9 x 4-6
สีและรูปร่าง	ค่อนข้างยาวรี (elongate ellipsoid) เหลืองอมเขียว ใส (yellowish green, clear)	ค่อนข้างรี (ellipsoid) เหลืองอมเขียว ใส (yellowish green, clear)
ลวดลายบนผิวสปอร์	ขรุขระเป็นตุ่มนูน (verrucose)	ขรุขระเป็นตุ่มนูน (verrucose)
เบสิเดีย	holobasidia แบบ clavate	holobasidia แบบ clavate
สเตอริกมา	2-4	2-4
ซิสทิเดีย	clavate และ lecythiform	clavate, uteriform, lecythiform
แคลมป์ คอนเนคชั่น	ไม่พบ	ไม่พบ

ตาราง 15 (ต่อ)

ลักษณะ	*Ramaria* sp. 3	*Ramaria* sp. 4
ลักษณะภายใต้กล้อง	ภาพประกอบ 16	ภาพประกอบ 17
ตัวอย่างที่ศึกษา	PKWS14-02, PKWS14-07, PKWS14-19, PKWS14-24, PKWS14-35, PKWS14-51	PKWS14-25, PKWS14-28, PKWS14-31, PKWS14-39, PKWS14-46



ภาพประกอบ 16 *Ramaria* sp. 3 (PKWS14-02) a) ดอกเห็ด, b) เบสิดิโอสปอร์ขรุขระเป็นตุ่มนูน (verrucose), c) เบสิดิโอสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด และ d) เบสิเดียม (ลูกศร)



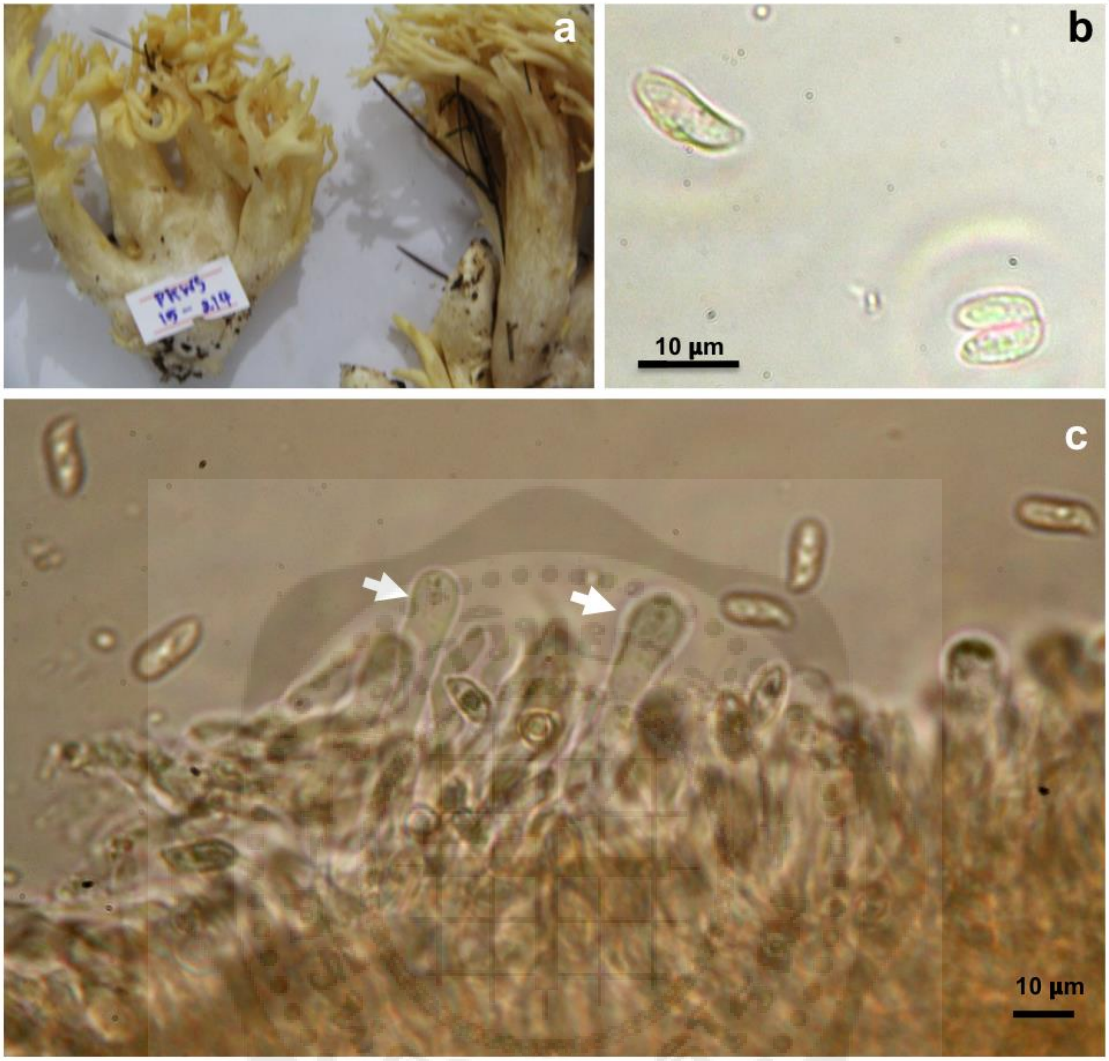
ภาพประกอบ 17 *Ramaria* sp.4 (PKWS14-46) a) ดอกเห็ด และ b) เบสิดิโอสปอร์มีลวดลายขรุขระเป็นตุ่มนูน (verrucose)

ตาราง 16 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดปะการังสกุล *Ramaria* sp. 5 และ *Ramaria* sp. 6

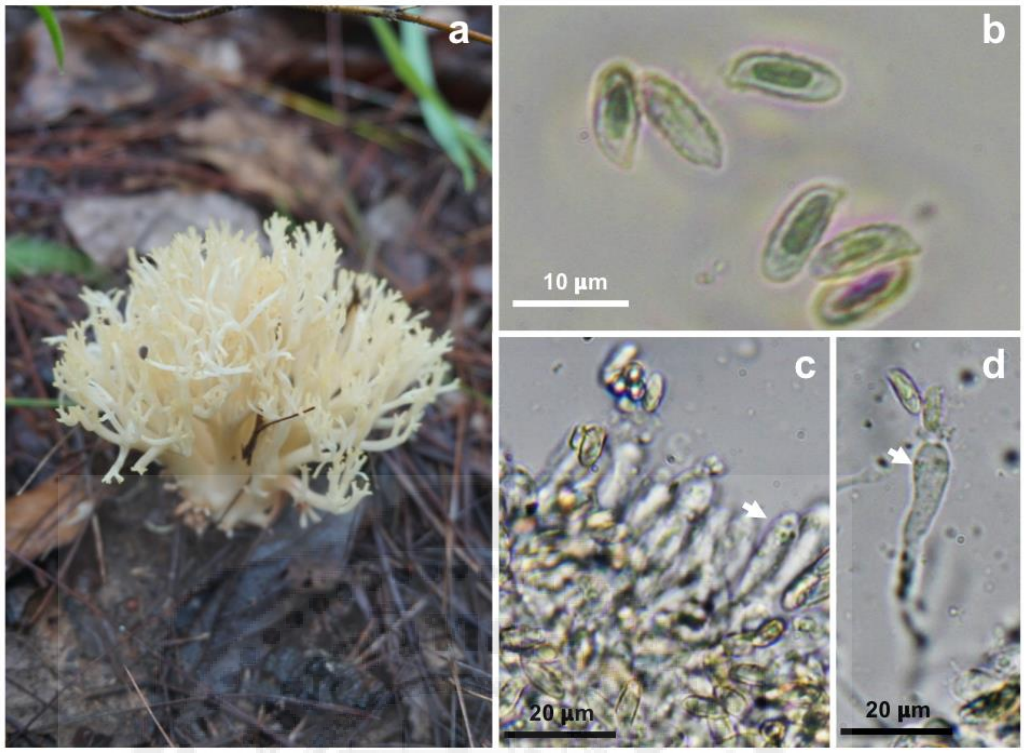
ลักษณะ	***Ramaria* sp. 5**	***Ramaria* sp. 6**
ลักษณะดอกเห็ด		
ขนาด กว้าง x สูง (เซนติเมตร)	6 x 5.5	1.5-6 x 6-10
สีของดอกเห็ด		
ฐาน	สีขาวอมน้ำตาล พบรอยช้ำเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล (flavescent)	สีน้ำตาลอ่อน (pale buff) พบรอยช้ำสีไวน์แดง (vinascent)
ส่วนกลาง (กิ่ง)	สีขาวอมน้ำตาล (pale buff) พบรอยช้ำเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล (flavescent)	สีน้ำตาลอ่อน (pale buff)
ปลาย	สีเหลือง (yellow)	สีน้ำตาลอ่อน (pale buff)
ฐานของดอกเห็ด	ฐานร่วม (compound) ค่อนข้างสั้น	ฐานร่วม (compound) ไม่กว้างมาก
การแตกกิ่ง		
ลักษณะ	แตกกิ่งไม่ยาว โค้งงอและใหญ่ในชั้นที่ 1-2 กิ่งเปิดเล็กน้อย	แตกกิ่งตรง ยาวเรียว ค่อนข้างเปิด
จำนวนชั้น (ชั้น)	4-5	6-8
กิ่งปลาย	unequal development of branching	symmetrical dichotomy
ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์		
เบสิดิโอสปอร์		
ขนาด ยาว x กว้าง (ไมโครเมตร)	8-11 x 3-4.5	(9-)10-12.6 x 3.8-5(-6)
สีและรูปร่าง	ค่อนข้างรี (elongate ellipsoid) เหลืองอมเขียว ใส (yellowish green, clear)	ค่อนข้างรี (elongate ellipsoid) เหลืองอมเขียว ใส (yellowish green, clear)
ลวดลายบนผิวสปอร์	ขรุขระเป็นตุ่มนูน (verrucose)	ขรุขระเป็นตุ่มนูนชัดเจน (strongly verrucose)
เบสิเดีย	holobasidia แบบ clavate	holobasidia แบบ clavate

ตาราง 16 (ต่อ)

ลักษณะ	*Ramaria* sp. 5	*Ramaria* sp. 6
สเตอริกมา	4	2-4
ซิสทิเดีย	ไม่พบ	fusiform
แคลมป์ คอนเนคชั่น	ไม่พบ	ไม่พบ
ลักษณะภายใต้กล้อง	ภาพประกอบ 18	ภาพประกอบ 19
ตัวอย่างที่ศึกษา	PKWS15-214	PKWS15-232



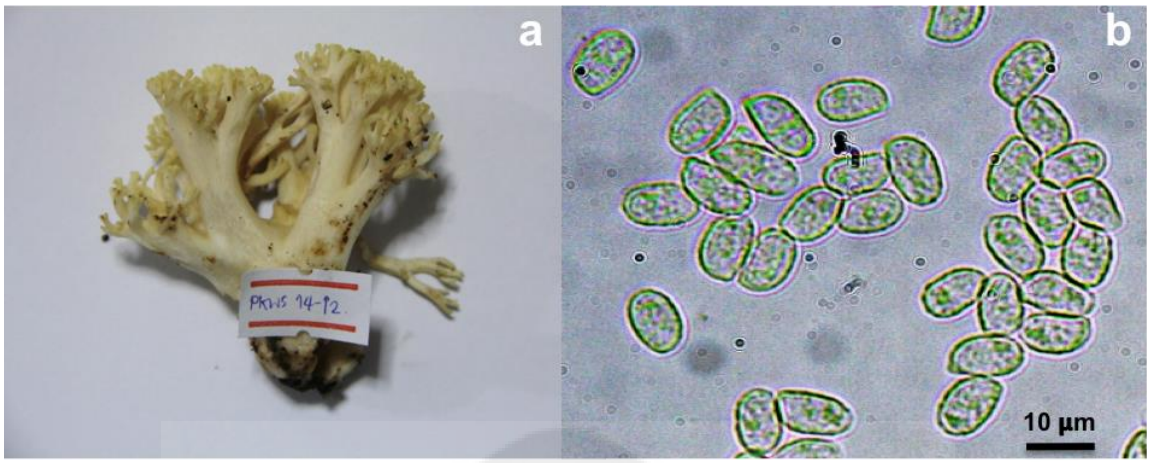
ภาพประกอบ 18 *Ramaria* sp.5 (PKWS15-214) a) ดอกเห็ด, b) เบสิดิโอสปอร์มีลวดลายขรุขระไม่เรียบ และ c) ซิสทิเดีย (ลูกศรชี้)



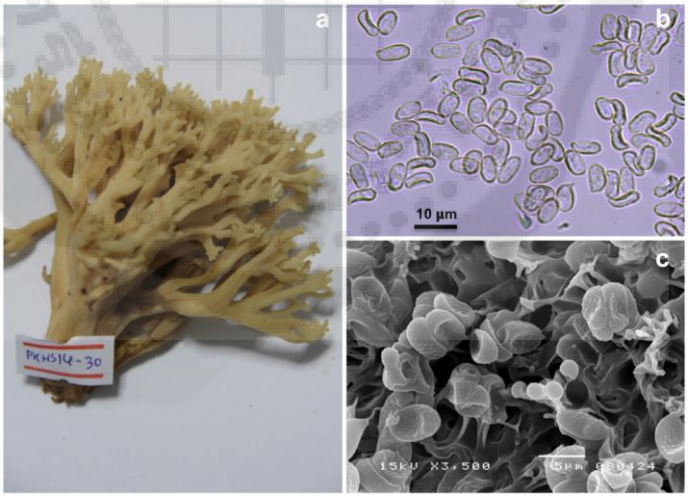
ภาพประกอบ 19 *Ramaria* sp.6 (PKWS15-232) a) ดอกเห็ด, b) เบสิดิโอสปอร์มีลวดลายขรุขระเป็นตุ่มนูน (verrucose), c-d) เบสิดิโอสปอร์บนเบสิเดียม (ลูกศร)

ตาราง 17 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดปะการังสกุล *Ramaria* sp. 7 และ *Ramaria* sp. 8

ลักษณะ	***Ramaria* sp. 7**	***Ramaria* sp. 8**
ลักษณะดอกเห็ด		
ขนาด กว้าง x สูง (เซนติเมตร)	2.1-2.2 x 3.5-3.8	5 x 6-7
สีของดอกเห็ด		
ฐาน	สีเหลืองอ่อน (pale yellow)	สีน้ำตาลครีม (pale buff)
ส่วนกลาง (กิ่ง)	สีเหลืองอ่อน (pale yellow)	สีน้ำตาลครีม (pale buff)
ปลาย	สีเหลือง (yellow)	สีน้ำตาลครีม (pale buff)
ฐานของดอกเห็ด	ฐานร่วม (compound) อวบและกว้าง	ฐานร่วม (compound) แคบและสั้น
การแตกกิ่ง		
ลักษณะ	กิ่งอวบหนาและสั้น กิ่งเปิด	แตกกิ่งยาว กิ่งค่อนข้างอวบโค้ง กิ่งเปิดเล็กน้อย
จำนวนชั้น (ชั้น)	2-4	7-10
กิ่งปลาย	poly dichotomy	discussation
ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์		
เบสิดิโอสปอร์		
ขนาด ยาว x กว้าง (ไมโครเมตร)	6-8 x 4-5	5.8-6.8 x 3-4.5
สีและรูปร่าง	ค่อนข้างรี (ellipsoid) เหลืองอมเขียว ใส (yellowish green, clear)	ค่อนข้างรีเล็กน้อย (ellipsoid) เหลืองอมเขียว ใส (yellowish green, clear)
ลวดลายบนผิวสปอร์	ขรุขระเป็นตุ่มนูนชัดเจน (verrucose)	ขรุขระเป็นตุ่มนูนเล็กน้อย (verrucose)
เบสิเดีย		
สเตอริกมา	4	4
ซิสทิเดีย	ไม่พบ	ไม่พบ
แคลมป์ คอนเนคชั่น	พบ	ไม่พบ
ลักษณะภายใต้กล้อง	ภาพประกอบ 20	ภาพประกอบ 21
ตัวอย่างที่ศึกษา	PKWS14-12	PKWS14-30



ภาพประกอบ 20 *Ramaria* sp.7 (PKWS14-12) a) ดอกเห็ด และ b) เบสิดิโอสปอร์มีลวดลายขรุขระเป็นตุ่มนูน (verrucose)



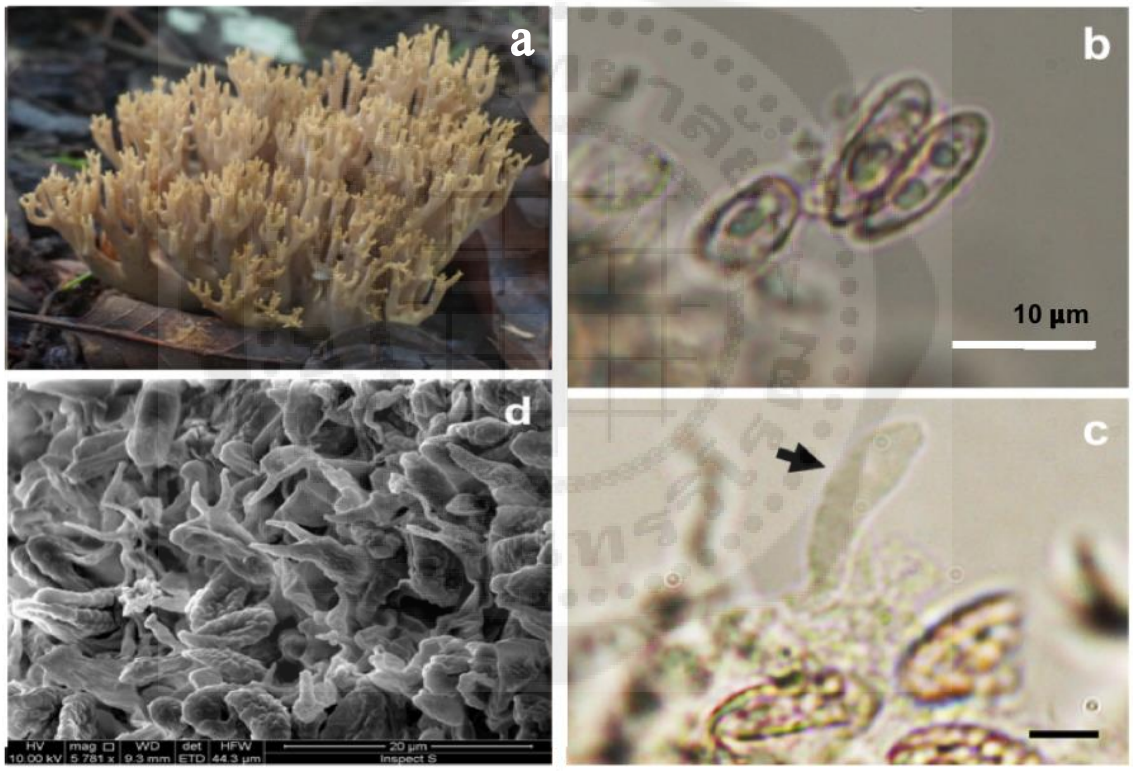
ภาพประกอบ 21 *Ramaria* sp.8 PKWS14-30 a) ดอกเห็ด, b) เบสิดิโอสปอร์มีลวดลายขรุขระเป็นตุ่มนูน (verrucose) และ c) เบสิดิโอสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

ตาราง 18 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดปะการังสกุล *Ramaria* sp. 9 และ *Ramaria* sp. 10

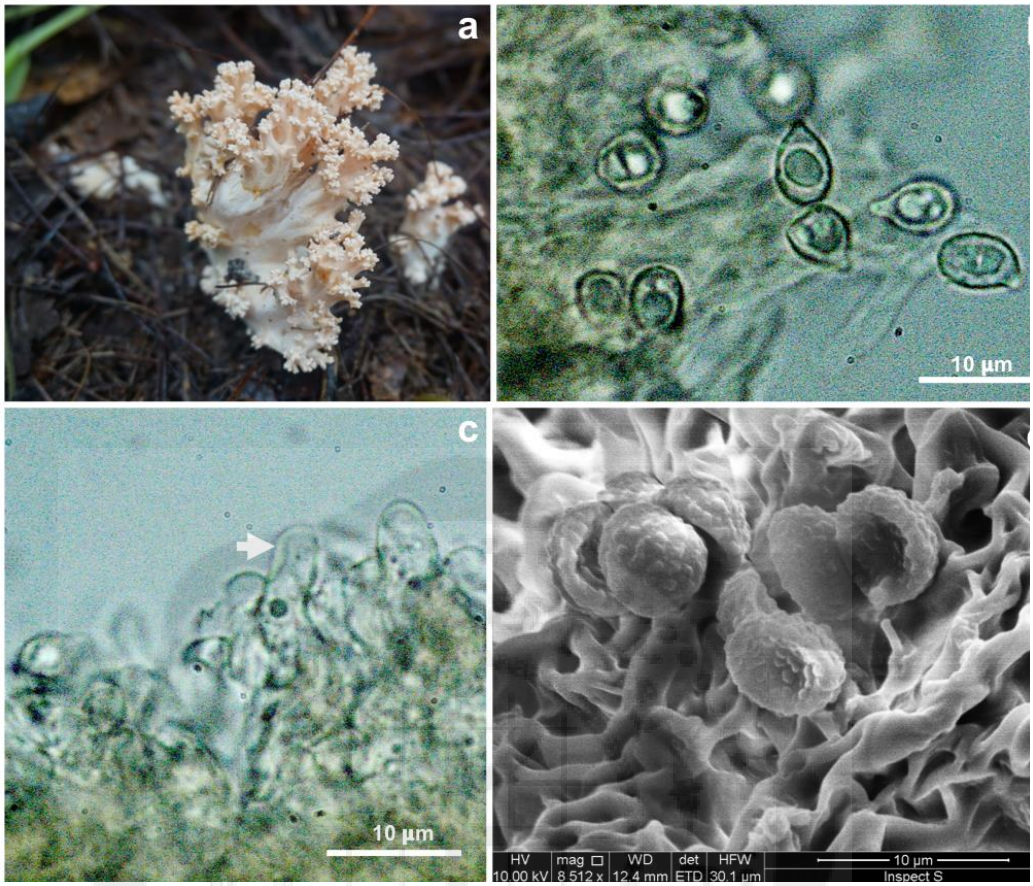
ลักษณะ	***Ramaria* sp. 9**	***Ramaria* sp. 10**
ลักษณะดอกเห็ด		
ขนาด กว้าง x สูง (เซนติเมตร)	2-4 x 4-10	4-11 x 6-10
สีของดอกเห็ด		
ฐาน	สีขาวครีม (buff)	สีขาวอ่อนอมชมพู (pinkish white)
ส่วนกลาง (กิ่ง)	สีครีมน้ำตาล (pale coffee)	สีน้ำตาลอ่อนอมชมพู (pinkish buff)
ปลาย	สีเหลือง (yellow)	สีน้ำตาลอ่อนอมชมพู (pinkish buff)
ฐานของดอกเห็ด	ฐานร่วม (compound) อวบและยาวเล็กน้อย	ฐานร่วม (compound) กว้างใหญ่มาก
การแตกกิ่ง		
ลักษณะ	แตกกิ่งตรงไม่ยาวมาก กิ่งปลายงอ กิ่งปิด	แตกกิ่งสั้นๆ คล้ายบล็อคโคลี่
จำนวนชั้น (ชั้น)	6-10	6-8
กิ่งปลาย	unequal development of branches	poly dichotomy
ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์		
เบสิดิโอสปอร์		
ขนาด ยาว x กว้าง (ไมโครเมตร)	9-12 x 4-6(-7.4)	5-8(-9.5) x 4-5
สีและรูปร่าง	ค่อนข้างรี (elipsoid) เหลืองอมเขียว ใส (yellowish green, clear)	ค่อนข้างกลม (ovoid) สีเหลืองอมเขียว ใส (yellowish green, clear)
ลวดลายบนผิวสปอร์	ขรุขระเป็นตุ่มนูน (verrucose)	ขรุขระเป็นตุ่มนูน (verrucose)
เบสิเดีย	holobasidia แบบ clavate	holobasidia แบบ clavate
สเตอริกมา	2-4	2-4

ตาราง 18 (ต่อ)

ลักษณะ	*Ramaria* sp. 9	*Ramaria* sp. 10
ซิสทิเดีย	cylindrical และ clavate	cylindrical และ clavate
แคลมป์ คอนเนคชั่น	ไม่พบ	ไม่พบ
ลักษณะภายใต้กล้อง	ภาพประกอบ 22	ภาพประกอบ 23
ตัวอย่างที่ศึกษา	PKWS15-92	PKWS15-181



ภาพประกอบ 22 *Ramaria* sp.9 (PKWS15-92) a) ดอกเห็ด, b) เบสิดิโอสปอร์, c) ซิสทีเดีย (ลูกศร) และ d) เบสิ-เดีย และเบสิดิโอสปอร์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดมีลวดลายขรุขระเป็นตุ่มนูน (verrucose)



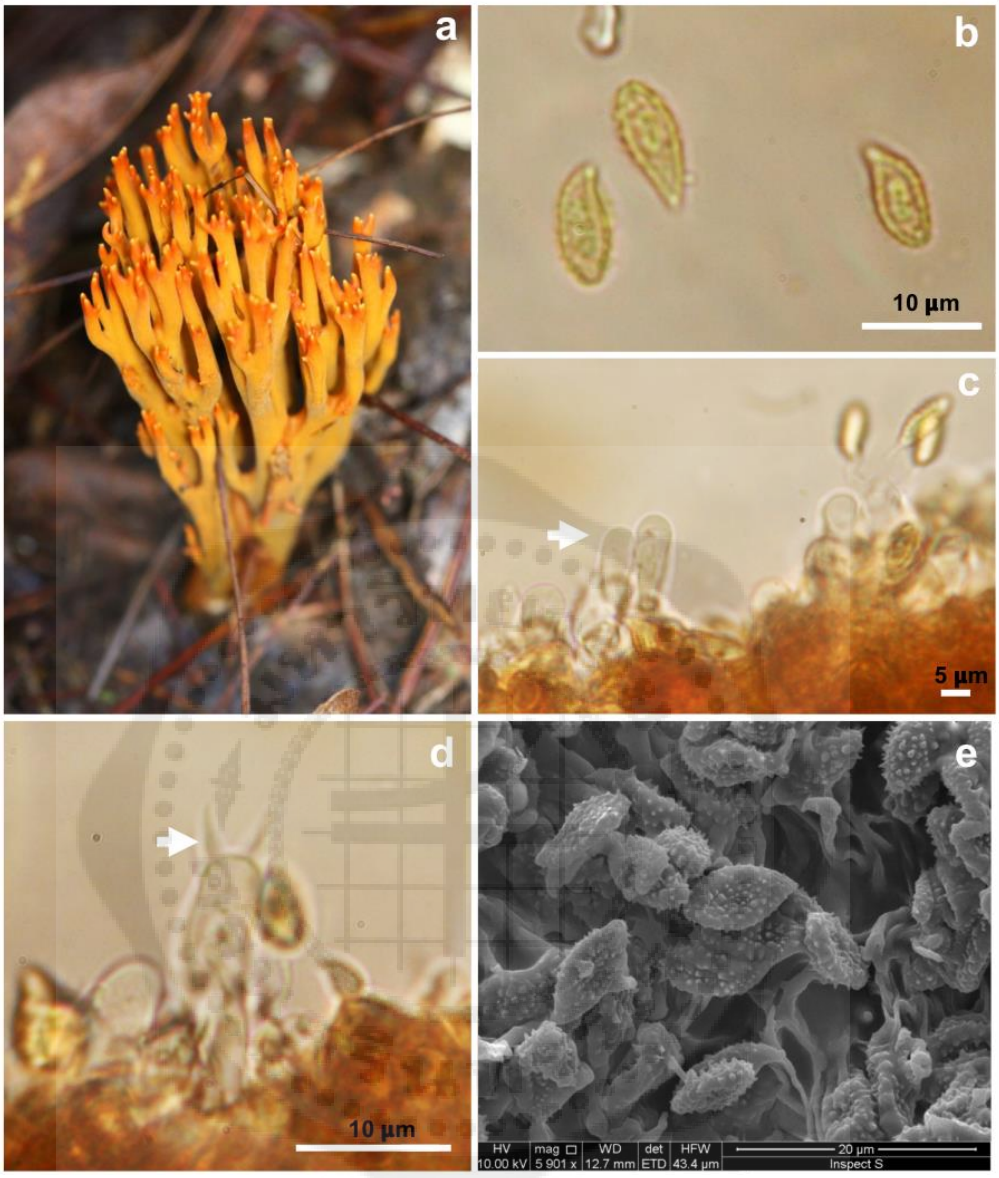
ภาพประกอบ 23 *Ramaria* sp.10 (PKWS15-181) a) ดอกเห็ด, b) เบสิดิโอสปอร์ค่อนข้างกลม มีลวดลายขรุขระเล็กน้อย, c) เบสิเดีย (ลูกศร) และ d) เบสิดิโอสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

ตาราง 19 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดปะการังสกุล *Phaeoclavulina cokeri* และ *Lentaria* sp.

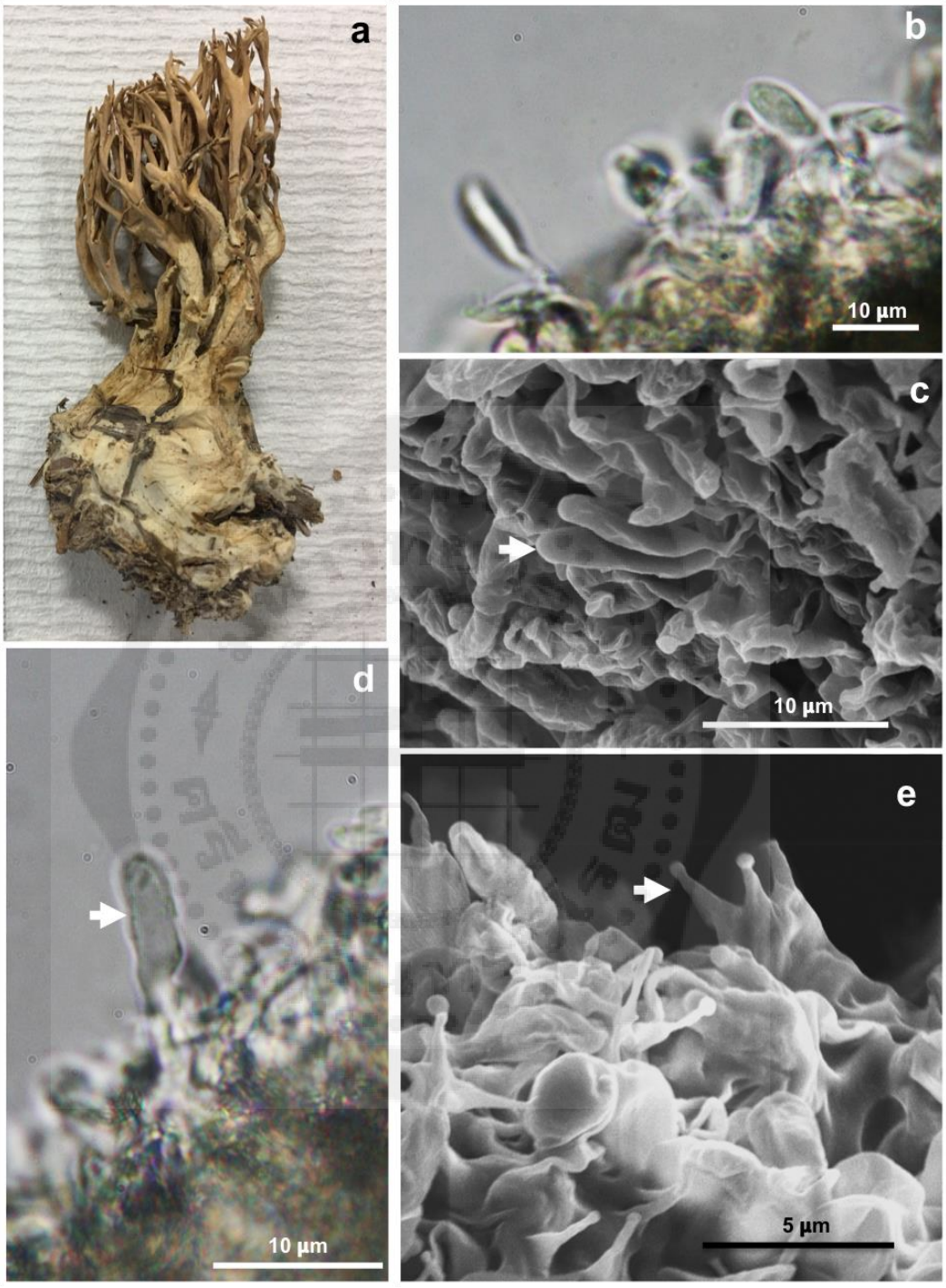
ลักษณะ	***Phaeoclavulina cokeri*** **(R.H. Petersen) Giachini**	***Lentaria*** **sp.**
ลักษณะดอกเห็ด		
ขนาด กว้าง x สูง (เซนติเมตร)	4-6 x 8-10	1-6 x 4-11
สีของดอกเห็ด		
ฐาน	สีขาว (white)	สีน้ำตาล (straw)
ส่วนกลาง (กิ่ง)	สีน้ำตาลอมส้ม (brownish orange)	สีน้ำตาล (straw)
ปลาย	สีส้ม (orange)	สีครีม ถึง ขาวอมน้ำตาล (pale milk coffee)
ฐานของดอกเห็ด	ฐานร่วม (compound)	ฐานร่วม (compound)
การแตกกิ่ง		
ลักษณะ	แตกกิ่งตรงยาว ค่อนข้างปิด	แตกกิ่งตรงเรียว กิ่งปิด
จำนวนชั้น (ชั้น)	6-8	6-8
กิ่งปลาย	double dichotomy	unequal development of branches
ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์		
เบสิดิโอสปอร์		
ขนาด ยาว x กว้าง (ไมโครเมตร)	(9-)10-12(-13.6) x 4-6(-7.6)	(8.5-)9.2-12.5(-13.9) x (2.2-)2.8-3.6(-4.1)
สีและรูปร่าง	ค่อนข้างรี (ellipsoid) สีน้ำตาลแดง (reddish brown)	ยาวรี (slander elongate ellipsoid) เขียวใส (green, clear)
ลวดลายบนผิวสปอร์	หนามแหลม (spiny)	เรียบ (smooth)
เบสิเดีย	holobasidia แบบ clavate	holobasidia แบบ clavate
สเตอริกมา	2-4	2-4
ซิสทิเดีย	clavate	cylindrical

ตาราง 19 (ต่อ)

ลักษณะ	*Phaeoclavulina cokeri* (R.H. Petersen) Giachini	*Lentaria* sp.
แคลมป์ คอนเนคชั่น	พบมาก	ไม่พบ
ลักษณะภายใต้กล้อง	ภาพประกอบ 24	ภาพประกอบ 25
ตัวอย่างที่ศึกษา	PKWS15-194	PKWS15-164



ภาพประกอบ 24 *P. cokeri* (PKWS15-194) a) ดอกเห็ด, b) เบสิดิโอสปอร์มีลวดลายขรุขระเป็นตุ่มนูน (verrucose), c) ซิสทิเดีย (ลูกศร) และเบสิดิโอสปอร์ที่ติดอยู่บนปลายเบสิเดียม, d) เบสิเดียม (ลูกศร) และ e) เบสิดิโอสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด



ภาพประกอบ 25 *Lentaria* sp. PKWS15-164 a) ดอกเห็ด, b) เบสิดิโอสปอร์รูปร่างยาวผิวเรียบ c) เบสิดิโอสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (ลูกศร), d) ซิสทิเดีย (ลูกศร) และ e) เบสิเดียมและสเตอริกมา (ลูกศร)

ข้อสังเกตของตัวอย่างที่พบในการศึกษาครั้งนี้คือ

R. conjunctipes* var. *tsugensis (PKWS14-18) เมื่อเทียบเคียงกับข้อมูลที่มีรายงานในประเทศไทยพบว่าไม่มีรายงานมาก่อน ซึ่งตัวอย่างที่ศึกษามีลักษณะทางสัณฐานที่คล้ายคลึงกับข้อมูลของ *R. conjunctipes* var. *tsugensis* Marr & D.E. Stuntz โดยมีลักษณะของดอกเห็ด ได้แก่ รูปร่างลักษณะของดอกเห็ด และการแตกกิ่ง รวมทั้งรูปร่างขนาดของสปอร์ ตรงกับที่รายงานโดย Marr & Stunzt (1973)[71] ยกเว้นสีของดอกเห็ดในรายงานกล่าวว่าโคนก้านมีสีขาว กิ่งสีน้ำตาลอมส้ม และปลายกิ่งสีเหลือง ในขณะที่ตัวอย่างที่ศึกษามีสีน้ำตาลครีมตลอดทั้งดอก

R.* aff. *flava* var. *aurea (PKWS15-171) ตัวอย่างที่ศึกษามีลักษณะใกล้เคียงกับ *R. flava* (Schaeff.) Quel. ที่รายงานโดย นิวัฒ เสนาะเมือง (2553)[9] จากอุทยานแห่งชาติน้ำหนาว จังหวัดเพชรบูรณ์ แต่มีการแตกกิ่งในลักษณะปิดมากกว่า และดอกเห็ดมีสีเหลืองอ่อน ที่สำคัญมีขนาดสปอร์เล็กกว่า *R. flava* (11-18.5 x 4-6.5 ไมโครเมตร) นอกจากนี้ข้อมูลของ *R. flava* ที่รายงานโดย EJ.H. Corner (2005)[6] ระบุว่าดอกเห็ดมีสีเหลืองกำมะถันหรือสีเหลืองมะนาว บางครั้งอาจพบรอยช้ำสีไวน์แดง หรือสีแดงอมม่วง ปลายกิ่งแตกแบบ poly dichotomy ที่สำคัญไม่พบซิสทิเดีย แต่ตัวอย่างที่ศึกษาพบซิสทิเดียหลายแบบ อย่างไรก็ตามขนาดสปอร์ใกล้เคียงกับ *R. flava* var. *aurea* (Coker) R.H. Petersen (8.3-11.5(12.6) x 3.3-4.1 ไมโครเมตร)

R.* aff. *rubribrunnescens (PKWS14-17, PKWS14-26, PKWS14-33, PKWS14-47) ตัวอย่างที่ศึกษาใกล้เคียงกับ *R. rubribrunnescens* Marr & D.E. Stuntz. รายงานโดย Exeter et al. (2006)[22] ได้แก่ สีของดอกเห็ดที่มีโคนสีขาวและกิ่งมีสีเหลืองอ่อนอมส้ม (light salmon color) ก้านเมื่อเจริญเต็มที่หรือแก่จะมีสีไวน์ (wine-colored) สปอร์มีขนาด 10-14 x 3.5-5 ไมโครเมตร ผิวสปอร์มีลวดลายขรุขระเล็กน้อยถึงเรียบ และไม่พบแคลมป์ คอนเนคชั่น ในขณะที่ตัวอย่างที่พบมีลักษณะที่แตกต่างเพียงเล็กน้อย ได้แก่ กิ่งมีสีครีมอมน้ำตาลอ่อน (pale buff) สปอร์มีขนาดเล็กกว่าเล็กน้อย (8.5-12.2 x 3.5-5.0 ไมโครเมตร) และที่สำคัญผิวสปอร์มีลวดลายขรุขระเป็นตุ่มนูนชัดเจน ซึ่งยังไม่มีรายงานการค้นพบ *R. rubribrunnescens* ในประเทศไทยมาก่อน

R.* aff. *vinosimaculans (PKWS15-74, PKWS15-236, PKWS15-25, PKWS15-109) ตัวอย่างที่ศึกษามีลักษณะใกล้เคียงกับ *R. vinosimaculans* Marr & D.E. Stuntz[71] เช่น รูปร่างลักษณะของดอกเห็ด การแตกกิ่ง รวมทั้งสีของกิ่งที่มีสีครีมถึงสีเหลือง ที่สำคัญคือรอยช้ำที่ก้านมีสีไวน์แดง ตรงกับลักษณะตัวอย่างที่ศึกษา ยกเว้นขนาดของสปอร์ตัวอย่างที่ศึกษามีขนาดเล็กกว่าเท่ากับ (8-)9.0-12.0 x 4.0-6.0 ไมโครเมตร ส่วน *R. vinosimaculans* ที่รายงานโดย Petersen & Scates (1988)[72] มีขนาดเท่ากับ 11.2-14.0 x 4.3-5.0 ไมโครเมตร Marr & Stuntz (1973)[71] รายงานว่ามี

ขนาดเท่ากับ 9.0-13.5 x 3.5-5.0 ไมโครเมตร อย่างไรก็ตามในประเทศไทยยังไม่มีรายงานการค้นพบ *R. vinosimaculans* มาก่อน

***Ramaria* sp. 1** (PKWS15-95) ตัวอย่างที่ศึกษามีลักษณะทางสัณฐานต่างจากตัวอย่างที่มีรายงานในประเทศไทย แต่มีลักษณะใกล้เคียงกับ *R. verlotensis* Marr & D.E. Stuntz[71] ได้แก่ สีของดอกเห็ดมีสีเหลืองอมส้ม (salmon color) ปลายมีสีเหลืองอ่อน สปอร์มีขนาดเท่ากับ 9.0-11.0 x 4.5-6.0 ไมโครเมตร และมีลวดลายขรุขระเป็นตุ่มนูนชัดเจน ส่วนตัวอย่างที่ศึกษากิ่งและปลายกิ่งมีสีน้ำตาล (straw) สปอร์มีขนาดเท่ากับ (8.2-)9- 12.4(-13) x 4-6 ไมโครเมตร และมีลวดลายขรุขระเป็นตุ่มนูนชัดเจน แต่การแตกกิ่งของ *R. verlotensis* มีลักษณะเป็นก้านสั้นๆ คล้ายดอกกระหล่ำ ซึ่งต่างจากตัวอย่างที่ศึกษา ที่สำคัญพบแคลมป์ คอนเนคชั่น และซิสทิเดีย ซึ่งไม่พบใน *R. verlotensis* นอกจากนี้ตัวอย่างที่ศึกษายังใกล้เคียงกับ *R. vinosimaculans* Marr & D.E. Stuntz[22] ในแง่ของรูปร่างการแตกกิ่ง สีของกิ่ง และขนาดของสปอร์ แต่ต่างตรงที่ก้านดอกไม่พบรอยช้ำสีไวน์แดง และลวดลายที่ผิวสปอร์ขรุขระเล็กน้อยถึงค่อนข้างเรียบ และไม่พบซิสทิเดีย ดังนั้นตัวอย่างที่พบนี้จึงยังไม่สามารถระบุชนิดได้

***Ramaria* sp. 2** (PKWS15-221) มีลักษณะทางสัณฐานที่แตกต่างจากตัวอย่างที่มีรายงานมาก่อน ชนิดที่มีความใกล้เคียงคือ *R. mediterranea* Schild & Franchi ที่รายงานโดย Daniels & Perez-Gorjon (2009)[73] พบในประเทศสเปน และอิตาลี ตัวอย่างที่พบในการศึกษาครั้งนี้มีก้าน กิ่ง และปลายกิ่งสีครีม (pale buff) ฐานของดอกเป็นฐานร่วม (compound) คล้ายกัน แต่ขนาดของสปอร์ตัวอย่างใหญ่กว่ามาก (9.0-13.0 x 4.0-7.0 ไมโครเมตร) และมีลวดลายบนผิวชัดเจน (very strongly verrucose) ในขณะที่สปอร์ของ *R. mediterranea* มีขนาดเพียง (6-)7.5-9(-10) x 3.5-4.5(-5) ไมโครเมตร อีกชนิดที่มีความใกล้เคียงคือ *R. rasilispora* Marr & D.E. Stuntz. var. *rasilispora*[22] ที่มีรูปร่างดอกเห็ด การแตกกิ่งคล้ายคลึงกัน แต่สีของปลายกิ่งมีสีเหลือง (yellowish) สปอร์มีขนาดเล็กกว่าเล็กน้อย (8.3-11.5 x 3.6-4.3 ไมโครเมตร) และผิวค่อนข้างเรียบ ดังนั้นตัวอย่างที่พบนี้จึงยังไม่สามารถระบุชนิดได้

***Ramaria* sp. 3** (PKWS14-02) เป็นตัวอย่างที่มีกิ่งและปลายกิ่งสีน้ำตาลแดงชัดเจน แตกกิ่งแบบ dichotomy ส่วนโคนสีน้ำตาลอ่อนกว่ากิ่ง สปอร์ค่อนข้างใหญ่และมีลวดลายขรุขระเป็นตุ่มนูนชัดเจน ลักษณะต่างๆ เหล่านี้ (ตาราง 15) ยังไม่พบรายงานในประเทศไทยมาก่อน จึงจัดเห็ดกลุ่มนี้เป็นกลุ่มที่ยังไม่สามารถระบุชนิดได้ และมีแนวโน้มว่าจะเป็นชนิดใหม่

***Ramaria* sp. 4** (PKWS14-25, PKWS14-28, PKWS14-31, PKWS14-39, PKWS14-46) เป็นอีกกลุ่มที่มีลักษณะใกล้เคียงกับ *R. verlotensis* Marr & D.E. Stuntz[71] และ *R. rubribrunnescens* Marr & D.E. Stuntz[71] ในแง่ของรูปร่างดอกเห็ด ก้านและกิ่งมีสีเหลืองอมส้ม แต่ตัวอย่างที่ศึกษามีสีครีม สปอร์มีลวดลายขรุขระเป็นตุ่มนูนชัดเจน และสปอร์มีขนาดเล็กกว่า ซึ่งไม่สามารถระบุชนิดได้

***Ramaria* sp. 5** (PKWS15-214) ลักษณะของตัวอย่างก้านและกิ่งมีสีขาวอมน้ำตาล มีขนาดใหญ่ การแตกกิ่งส่วนใหญ่พบบริเวณปลายดอก แต่ละกิ่งมีขนาดสั้น โค้งงอ ปลายกิ่งมีสีเหลือง สปอร์มีลวดลายขรุขระเป็นตุ่มนูนเล็กน้อย ลักษณะไม่ใกล้เคียงกับตัวอย่างที่สืบค้น จึงยังไม่สามารถระบุชนิดได้

***Ramaria* sp. 6** (PKWS15-232) มีลักษณะใกล้เคียงกับ *R. vinosimaculans* Marr & D.E. Stuntz[22] และ *R.* aff. *vinosimaculans* (PKWS15-105, PKWS15-74) ที่พบในการศึกษาครั้งนี้ ต่างที่รูปร่างการแตกกิ่งของดอกเห็ด ตัวอย่างที่ศึกษา PKWS15-232 มีการแตกกิ่งที่ละเอียดกว่า แต่ละกิ่งมีขนาดเล็ก มักแตกที่ส่วนปลาย สีดอกโทนเหลืองครีมที่สว่าง สปอร์มีผิวไม่เรียบขรุขระเป็นตุ่มนูน จึงแยกตัวอย่างนี้ออกจากกลุ่มอื่นๆ ซึ่งยังไม่สามารถระบุชนิดได้

***Ramaria* sp. 7** (PKWS14-12) มีลักษณะใกล้เคียงกับ *R. rasilispora* var. *rasilispora* Marr & D.E. Stuntz[22] คือดอกเห็ดมีสีครีมที่บริเวณฐาน กิ่งและปลายกิ่งมีสีเหลือง ที่สำคัญเนื้อเยื่อดอกเห็ดสดทำปฏิกิริยากับสารละลายไอโอดีนเกิด amyloid reaction อ่อนๆ (weak) ใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง ซึ่งตัวอย่างที่ศึกษาไม่ได้ทำการทดสอบ นอกจากนี้ผิวสปอร์ของ *R. rasilispora* var. *rasilispora* มีลักษณะเรียบหรือขรุขระเป็นตุ่มนูนเล็กน้อย (smooth to very finely warted) สปอร์มีขนาด 8.3-11.5 x 3.6-4.3 ไมโครเมตร ในขณะที่สปอร์ของ PKWS14-12 มีความขรุขระชัดเจน และสปอร์มีขนาดเล็ก 6-8 x 4-5 ไมโครเมตร จึงไม่สามารถระบุชนิดได้

***Ramaria* sp. 8** (PKWS14-30) ลักษณะดอกเห็ดมีสีน้ำตาลครีมหรือสีเหลืองอ่อนอมส้ม (light salmon color) ตลอดทั้งดอก คล้ายสีของ *R. rubribrunnescens* Marr & D.E. Stuntz[71] แต่ลักษณะการแตกกิ่งต่างกัน ที่สำคัญไม่พบรอยช้ำสีน้ำตาลแดงที่ก้าน ฐานร่วมแคบสั้น แตกกิ่งค่อนข้างเปิดเล็กน้อยกิ่งอวบโค้ง 2-4 ชั้น และปลายกิ่งมีลักษณะแตกกิ่งไม่แน่นอน (discussation) ส่วนลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์มีขนาด 5.8-6.8 x 3-4.5 ไมโครเมตร ไม่มีการพบแคลมป์คอนเนคชั่น จากลักษณะที่กล่าวมาข้างต้น ไม่พบการรายงานในประเทศไทยมาก่อน จึงแยกตัวอย่างนี้ออกจากกลุ่มอื่นและยังไม่สามารถระบุชนิดได้

***Ramaria* sp. 9** (PKWS15-92) ลักษณะดอกเห็ดมีฐานสีขาวครีม (buff) กิ่งสีครีมน้ำตาล (pale coffee) และปลายกิ่งสีเหลือง ฐานร่วมยาวเล็กน้อย แตกกิ่งปลายตั้งตรงจำนวนมากคือ 6-10 ชั้น ปลายกิ่งมีลักษณะไม่เท่ากัน (unequal development of branching) สปอร์มีขนาด 9-12 x 4-6 ไมโครเมตร ผิวขรุขระเป็นตุ่มนูนชัดเจน (verrucose) พบ 2-4 สเตอริกมาบนเบสิเดีย พบซิสทิเดียรูปร่าง cylindrical และ clavate และไม่พบแคลมป์คอนเนคชั่น จากลักษณะที่กล่าวมาข้างต้น ไม่พบการรายงานในประเทศไทยมาก่อน จึงแยกตัวอย่างนี้ออกจากกลุ่มอื่น และยังไม่สามารถระบุชนิดได้

***Ramaria* sp. 10** (PKWS15-181) มีสีของดอกเห็ดต่างจากชนิดอื่นๆ ที่พบในการศึกษาครั้งนี้ คือมีก้านสีขาวอมชมพู กิ่งและปลายกิ่งสีน้ำตาลอ่อนอมชมพู คล้ายกับกลุ่มของ *R. botrytis* (Pers.) Ricken มีการแตกกิ่งสั้นๆ คล้ายบล็อคโคลี่ ซึ่งเคยมีรายงานในประเทศไทย[22] แต่ตัวอย่าง PKWS15-181 มีรูปร่างสปอร์เกือบกลม และขนาดค่อนข้างเล็ก (5-8 x 4-5 ไมโครเมตร) ต่างจาก *R. botrytis* (11-17 x 4-6 ไมโครเมตร[22] อย่างชัดเจน จึงจัดอยู่ในกลุ่มที่ยังไม่สามารถระบุชนิดได้

Phaeoclavulina cokeri (PKWS15-194) ตัวอย่างที่ศึกษานี้มีลักษณะสอดคล้องกับ *P. cokeri* (R.H. Petersen) Giachini ที่มีรายงานจากอุทยานแห่งชาติน้ำหนาว จังหวัดเพชรบูรณ์ โดย Maneevun et al. (2012)[8] และ นิวัฒ เสนาะเมือง (2553)[9] มีลักษณะที่สำคัญของสกุลนี้คือ ลวดลายบนผิวสปอร์มีคล้ายหนาม (spiny) ซึ่งต้องศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

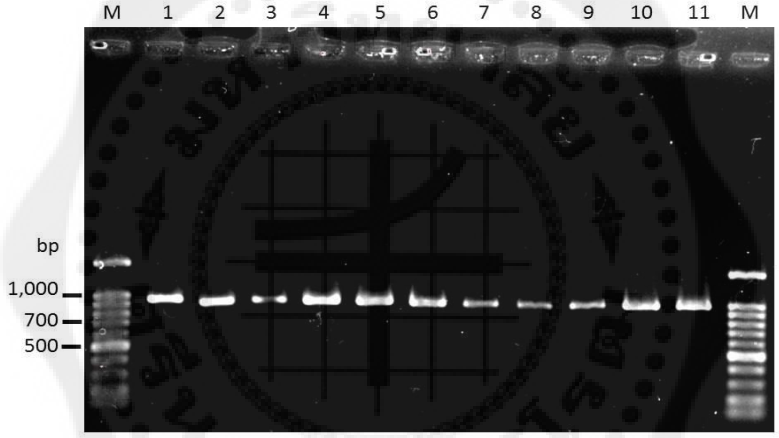
***Lentaria.* sp.** (PKWS15-164) เป็นสกุลหนึ่งที่มีรายงานในประเทศไทยน้อย ก่อนหน้านี้มีรายงานโดย วัชรพรรณ พลอามาตย์ (2554)[21] พบ *Lentaria* sp. จำนวน 1 สปีชีส์ ซึ่งมีขนาดสปอร์เท่ากับ 13.0-16.0 x 4.0-5.0 ไมโครเมตร แต่ในการศึกษาครั้งนี้พบตัวอย่างที่มีขนาดสปอร์เล็กกว่าเท่ากับ (8.5) 9.2-12.5(-14) x (2.2-)2.8-3.5 (-4) ไมโครเมตร คล้ายคลึงกับ *L. patouillardii* (Bres.) Corner[6] ซึ่งมีขนาดสปอร์เท่ากับ 7-8(-10) x 2.0-2.5 ไมโครเมตร ผิวสปอร์เรียบ พบ 4 สเตอริมาบนเบสิเดีย และพบแคลมป์ คอนเนคชั่น ซึ่งต่างจากตัวอย่างที่ศึกษา (ตาราง 19) จึงจัดอยู่ในกลุ่มที่ยังไม่สามารถระบุชนิดได้ ตัวอย่างที่ทำการศึกษา มีความคล้ายกับ *L. bambusina* P.Zhang & Zuo H.Chen[74] ที่มีรายงานจากสาธารณรัฐประชาชนจีนเมื่อเร็วๆ นี้ คือมีขนาดสปอร์เท่ากับ (9-)9.5-13 (-15) x 2.5-3.5 ไมโครเมตร ต่างที่การแตกกิ่งของตัวอย่างเป็นแบบร่วม ฐานมีสีน้ำตาลแดง กิ่งสีน้ำตาลถึงสีครีม ปลายกิ่งมีสีครีมถึงสีขาว พบ 2-4 สเตอริกมา และซิสทิเดีย ในขณะที่ *L. bambusina* โคนและก้านมีสีเดียวกันคือน้ำตาลแดง และปลายกิ่งมีสีขาว ที่สำคัญพบ 4 สเตอริกมา ไม่พบซิสทิเดีย จึงยังไม่สามารถระบุชนิดได้ และมีแนวโน้มที่จะเป็นชนิดใหม่อีกด้วย

1.2 ผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Ramaria* และแผนภูมิวิวัฒนาการ

เนื่องจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Ramaria* เพียงอย่างเดียวนั้นอาจไม่เพียงพอต่อการจัดจำแนกชนิด โดยเฉพาะเมื่อเทียบเคียงกับข้อมูลที่มีรายงานในประเทศไทย เพราะรายงานส่วนใหญ่เป็นบัญชีรายชื่อที่ขาดรายละเอียดทางสัณฐานวิทยา ที่สำคัญขาดข้อมูลทางพันธุกรรมของลำดับนิวคลีโอไทด์ *Ramaria* สปีชีส์ต่างๆ จากประเทศไทย ในฐานข้อมูลนานาชาติ เช่น GenBank และ Unite

ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงได้เลือกตัวแทนเห็ดจำนวน 25 ตัวอย่าง มาสกัดดีเอ็นเอ และเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ large subunit ribosomal DNA (LSU) พบว่ามีขนาดประมาณ 800-900

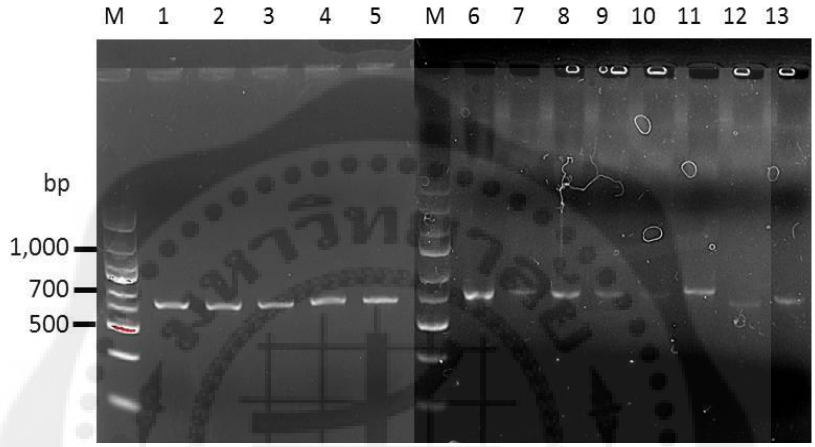
คู่เบส (ภาพประกอบ 26) เมื่อนำไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ แล้วเทียบเคียงกับฐานข้อมูล GenBank และ Unite ผลแสดงในตาราง 20 พบว่ามีเพียงตัวอย่างของ PKWS15-74 เท่านั้นที่มีค่าร้อยละความเหมือน (%identity) เท่ากับร้อยละ 99 กับ *R. rubribrunnescens* (KX670963.1) และร้อยละ 98 กับ *R. vinosimaculans* (KP637052.1) แต่ลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกับ *R. vinosimaculans* มากกว่า ในขณะที่ตัวอย่างส่วนใหญ่ที่ศึกษา มีค่าร้อยละความเหมือน (%identity) ต่ำกว่าร้อยละ 99 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล ทั้งนี้ยังพบว่าตัวอย่างเห็ดที่มีลักษณะทางสัณฐานต่างกัน แต่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของ LSU เหมือนกัน ซึ่งอาจเนื่องจากบริเวณ LSU เหมาะสำหรับการจัดจำแนกชนิดในระดับสกุลมากกว่าสปีชีส์



ภาพประกอบ 26 เจลอิเล็กโตโฟรีซิสของการเพิ่มจำนวนบริเวณ LSU (M) 1,500 bp DNA ladder, (1) PKWS14-01, (2) PKWS14-05, (3) PKWS14-07, (4) PKWS14-12, (5) PKWS14-17, (6) PKWS14-18, (7) PKWS14-19, (8) PKWS14-24, (9) PKWS114-29, (10) PKWS15-31 และ (11) PKWS15-33

จากนั้นได้คัดเลือก 20 ตัวอย่าง มาศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ internal transcribed spacers (ITS) พบว่ามีขนาดประมาณ 500-700 คู่เบส (ภาพประกอบ 27) ผลการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงในตาราง 20 ซึ่งพบว่าทุกตัวอย่างที่ศึกษามีค่าร้อยละความเหมือน ต่ำกว่าร้อยละ 97 คือมีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 82 - 95 แสดงให้เห็นว่าข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Ramaria* ที่ได้จาก

การศึกษาครั้งนี้ ไม่ตรงกับข้อมูลที่มีในฐานข้อมูลนานาชาติมาก่อน ที่สำคัญมีค่าร้อยละความเหมือนต่ำทำให้ขาดข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ในการยืนยัน แต่อย่างไรก็ตามผลการเทียบเคียงที่ได้ช่วยยืนยันชนิดของเห็ดสปีชีส์ต่างๆ ที่พบในการศึกษาครั้งนี้ว่าแตกต่างจากที่มีรายงานในประเทศต่างๆ อย่างชัดเจนอีกด้วย นอกจากนี้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้สามารถใช้เป็นฐานข้อมูลของตัวอย่างเห็ด *Ramaria*, *Phaeoclavulina* และ *Lentaria* ที่ได้จากประเทศไทย เพื่อการเทียบเคียงในอนาคตต่อไป



ภาพประกอบ 27 เจลอิเล็กโตโฟรีซิสของการเพิ่มจำนวนบริเวณ ITS (M) 1,500 bp DNA ladder, (1) PKWS15-194, (2-5) PKWS15-181, (6) PKWS15-222, (7) PKWS15-109, (8) PKWS15-25, (9) PKWS15-235, (10) PKWS15-232, (11) PKWS15-92 (12) PKWS15-74 และ (13) PKWS15-221

ตาราง 20 ผลการเทียบเคียงของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ LSU และ ITS โดยโปรแกรม BAST กับฐานข้อมูล GenBank และ Unite

ชนิด	รหัส	LSU			ITS		
		Blast Result	Accession No.	%Identity	Blast Result	Accession No.	%Identity
R. conjunctipes var. *tsugensis*	PKWS14-18	*Ramaria conjunctipes* var. *Sparsiramosa*	JX287484	98	-	-	-
R. aff. *flava* var. *aurea*	PKWS15-171	*Ramaria vinosimaculans*	KP637052	98	*Ramaria rubribrunnescens*	KT307882	82
R. aff. *rubribrunnescens*	PKWS14-17	*Ramaria rubribrunnescens*	KP658133	98	*Ramaria vinosimaculans*	KP658133	85
	PKWS14-26	*Ramaria rubribrunnescens*	KP658133	98	*Ramaria vinosimaculans*	KP658133	89
	PKWS14-47	*Ramaria rubribrunnescens*	KP658133	98	*Ramaria vinosimaculans*	KP658133	82
R. aff. *vinosimaculans*	PKWS14-54	*Ramaria rubribrunnescens*	KP658133	99	*Ramaria vinosimaculans*	KP658133	87
	PKWS15-74	*Ramaria rubribrunnescens*	KX670963	99	*Ramaria* sp.	KT824242	95
	PKWS15-109	*Ramaria rubribrunnescens*	JX269129	98	*Ramaria vinosimaculans*	KP658133	89
Ramaria sp. 1	PKWS15-95	*Ramaria vinosimaculans*	KP637052	98	*Ramaria verlotensis*	KX574480	94
Ramaria sp. 2	PKWS15-221	*Ramaria rasilispora* var. *rasilispora*	KX670981	96	*Ramaria mediterranea*	AJ408370	93
Ramaria sp. 3	PKWS14-02	*Ramaria botrytis*	EU652386	96	*Ramaria rubrievanescens*	UDB024967	87
	PKWS14-07	*Ramaria botrytis*	EU652386	95	-	-	-

ตาราง 20 (ต่อ)

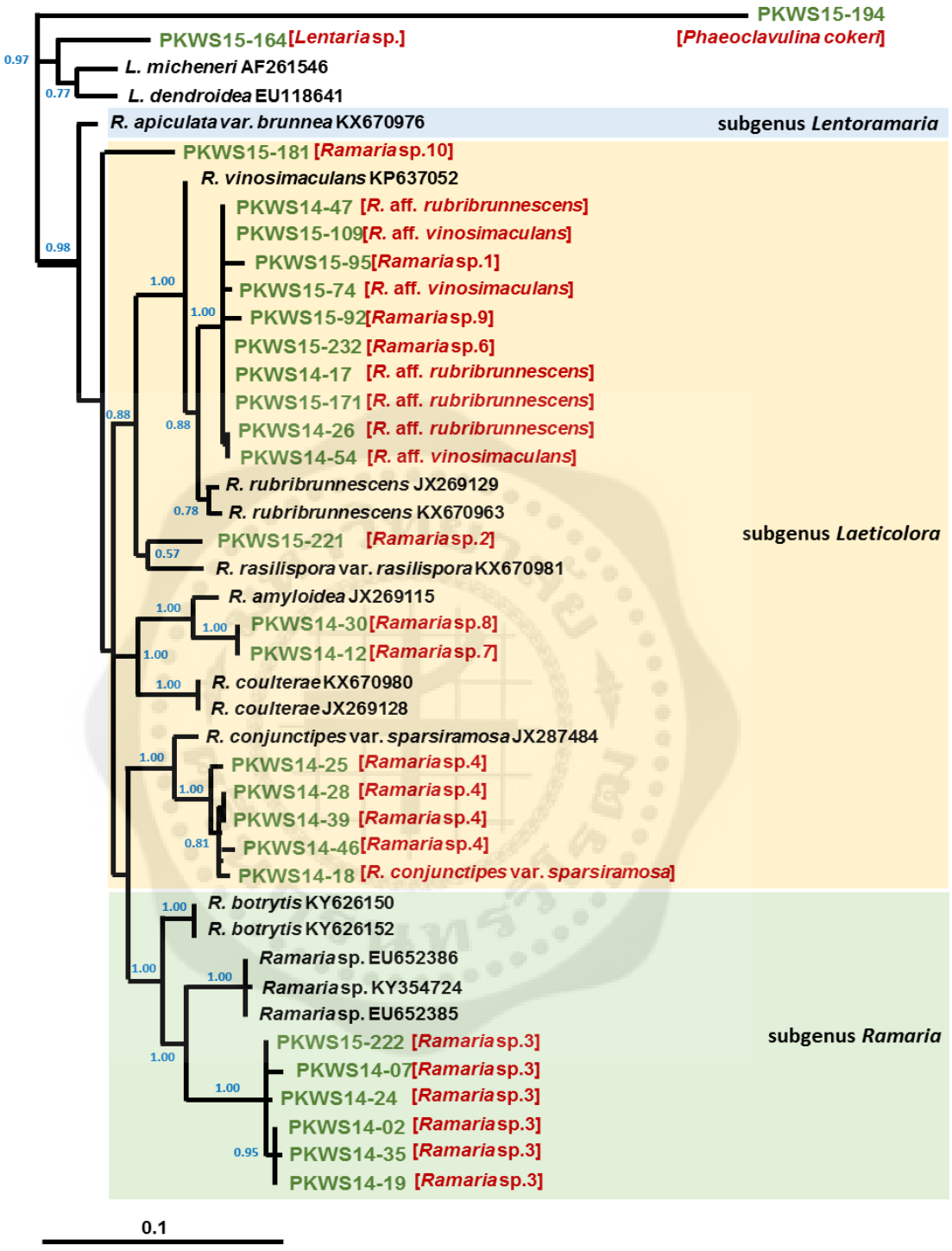
ชนิด	รหัส	LSU			ITS		
		Blast Result	Accession No.	%Identity	Blast Result	Accession No.	%Identity
Ramaria sp. 3	PKWS14-19	*Ramaria botrytis*	EU652386	96	-	-	-
	PKWS14-24	*Ramaria botrytis*	EU652386	95	-	-	-
	PKWS14-35	*Ramaria botrytis*	EU652386	96	-	-	-
Ramaria sp. 4	PKWS14-25	*Ramaria conjunctipes* var. *sparsiramosa*	JX287484	98	*Ramaria verlotensis*	KX574480	94
	PKWS14-28	*Ramaria conjunctipes* var. *sparsiramosa*	JX287484	98	*Ramaria verlotensis*	KX574480	95
	PKWS14-39	*Ramaria conjunctipes* var. *sparsiramosa*	JX287484	98	*Ramaria verlotensis*	KX574480	94
	PKWS14-46	*Ramaria conjunctipes* var. *sparsiramosa*	JX287484	98	-	-	-
	PKWS15-208	-	-	-	*Ramaria verlotensis*	KX574480	93
Ramaria sp. 5	PKWS15-214	-	-	-	*Ramaria* sp.	EU486433	80
Ramaria sp. 6	PKWS15-232	*Ramaria vinosimaculans*	KP637052	98	*Ramaria* sp.	KT824242	76
Ramaria sp. 7	PKWS14-12	*Ramaria amyloidea*	JX269115	97	-	-	-
Ramaria sp. 8	PKWS14-30	*Ramaria amyloidea*	JX269115	97	-	-	-

ตาราง 20 (ต่อ)

ชนิด	รหัส	LSU			ITS		
		Blast Result	Accession No.	%Identity	Blast Result	Accession No.	%Identity
Ramaria sp.9	PKWS15-92	*Ramaria vinosimaculans*	KP637052	98	*Ramaria* sp.	KT824242	97
Ramaria sp.10	PKWS15-181	*Ramaria apiculata*	KX670976	99	*Ramaria* sp.	KY986436	79
Phaeoclavulina cokeri	PKWS15-194	*Ramaria* sp.	KP012956	99	*Ramaria* sp.	KP012956	89
Lentaria sp.	PKWS15-164	*Lentaria micheneri*	AF261546	95	*Lentaria* sp.	KU324496	93

ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ LSU และ ITS นำมาสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ ร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Ramaria* และสกุลใกล้เคียง จากฐานข้อมูล GenBank และ Unite เพื่อแสดงตำแหน่งของตัวอย่างเห็ดที่พบในประเทศไทย ผลแสดงในภาพประกอบ 27 และ 28 ตามลำดับ

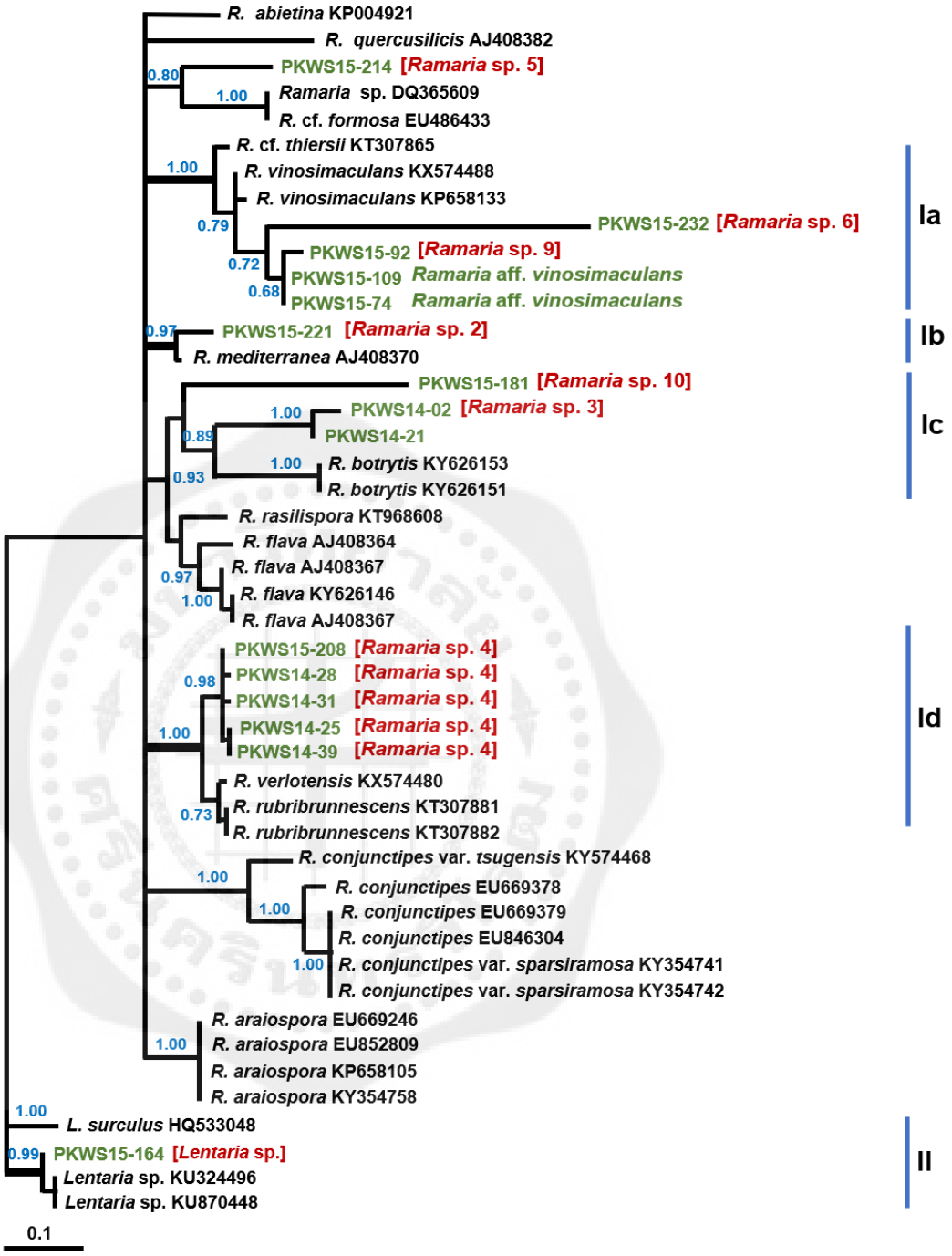
จากแผนภูมิความสัมพันธ์ที่วิเคราะห์ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ LSU ของตัวอย่าง *Ramaria*, *Phaeoclavulina* และ *Lentaria* จำนวน 27 ตัวอย่าง (ภาพประกอบ 27) ที่พบในการศึกษาครั้งนี้ กับตัวอย่างที่ใกล้เคียงจากฐานข้อมูล GenBank จำนวน 16 ตัวอย่าง พบว่าสามารถแบ่งได้เป็น 3 clades ใหญ่คือ clade I เป็นกลุ่มของเห็ดสกุล *Lentaria* รวมตัวอย่าง *Lentatia* sp. PKWS15-164 ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ clade II เป็น *Ramaria* subgenus *Lentoramaria* ของ *R. apiculata* var. *brunnea* ส่วน clade III เป็นกลุ่มใหญ่ที่สุดที่ประกอบด้วย *Ramaria* subgenus *Laeticolora* และ subgenus *Ramaria* จากแผนภูมิความสัมพันธ์แสดงให้เห็นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ LSU สามารถแยกเห็ดปะการัง *Ramaria* ได้ตาม subgenus แต่ไม่สามารถแยกความแตกต่างในระดับสปีชีส์บางสปีชีส์ได้ ตัวอย่างเช่น *Ramaria* sp. 1 (PKWS15-95), *Ramaria* sp.6 (PKWS15-232), *Ramaria* sp. 9 (PKWS15-92), *R.* aff. *rubribrunnescens* (PKWS14-47, PKWS14-17, PKWS14-26), *R.* aff. *vinosimaculans* (PKWS14-54, PKWS15-74, PKWS15-109) ซึ่งเป็นตัวอย่างจากประเทศไทยทั้งหมดจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ทั้งๆ ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างกัน และ *Ramaria* sp.7 (PKWS14-12) จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ *Ramaria* sp. 8 (PKWS14-30) ซึ่งมีลักษณะต่างกัน เป็นต้น แสดงให้เห็นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ LSU ไม่เหมาะที่จะใช้ในการระบุชนิดในระดับสปีชีส์ แต่อย่างไรก็ตามจะสังเกตเห็นว่าตัวอย่าง *Ramaria* จากประเทศไทยจะจับกลุ่มแยกออกจาก *Ramaria* ชนิดอื่นๆ ที่ได้จากฐานข้อมูลนานาชาติ



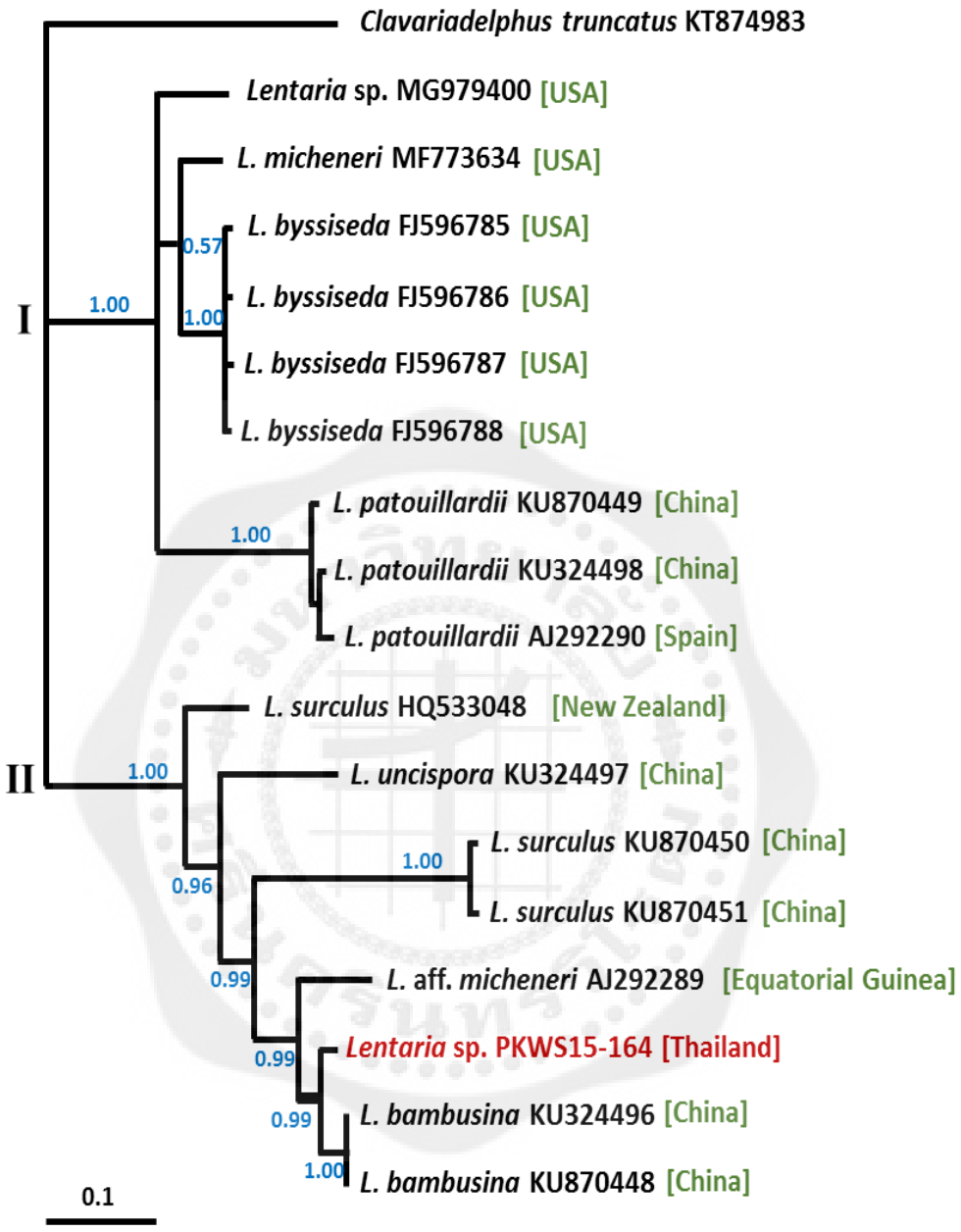
ภาพประกอบ 28 ภาพแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเห็ดปะการังสกุล *Ramaria* โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ LSU ด้วยวิธี Bayesian โดยกำหนดให้ *Phaeoclavulina cokeri* เป็น outgroup ตัวเลขที่กิ่งคือค่า propability

จากแผนภูมิความสัมพันธ์ที่วิเคราะห์ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1 และ 5.8S rDNA ของตัวอย่าง *Ramaria* และ *Lentaria* จำนวน 15 ตัวอย่าง ที่พบในการศึกษาครั้งนี้ กับตัวอย่างที่ใกล้เคียงจากฐานข้อมูล GenBank และ Unite จำนวน 31 ตัวอย่าง พบว่าตัวอย่างที่มีลักษณะใกล้เคียงกันจะจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน (ภาพประกอบ 28) เช่น clade Ia เป็นกลุ่มของ *R. vinosimaculans* และสายพันธุ์ใกล้เคียง รวมทั้ง *R.* aff. *vinosimaculans* (PKWS15-74, PKWS15-109), *Ramaria* sp.6 (PKWS15-232) และ *Ramaria* sp.9 (PKWS15-92) ซึ่งมีโทนสีของดอกเห็ดสีครีม เหลืองอ่อน และมักพบรอยช้ำสีไวน์แดงที่ก้าน ส่วน clade Ib เป็นกลุ่มของ *R. mediterranea* ซึ่งมีเพียงลำดับนิวคลีโอไทด์เดียวในฐานข้อมูล ในขณะที่ clade Ic เป็นกลุ่มของ *R. botrytis* ซึ่งมีดอกเห็ดโทนสีขาวอมชมพู รวมทั้งตัวอย่าง *Ramaria* sp. 8 (PKWS15-181) และ clade Id เป็นกลุ่มที่มีโทนสีเหลืองอมส้มของ *R. rubribrunnescens*, *R. verlotensis* และ *Ramaria* sp.4 (PKWS14-21, PKWS14-25, PKWS14-28, PKWS14-31, PKWS14-39 และ PKWS15-208) ซึ่งเป็นกลุ่มตัวอย่างของประเทศไทยที่แยกออกมาจากชนิดอื่นด้วยค่าความเชื่อมั่น (bootstrap) ที่สูง ทั้งนี้ทุกตัวอย่างที่ยังไม่สามารถระบุชนิดได้ แสดงการแยกกิ่งออกจากกันอย่างชัดเจนอีกด้วย

เนื่องจากเห็ดปะการังในสกุล *Lentaria* sp. (PKWS15-164) ที่พบในการศึกษาครั้งนี้ มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างจากชนิดที่มีรายงานในประเทศไทย และมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS ที่มีค่าร้อยละความเหมือนเท่ากับ 93 กับ *Lentaria bambusina* (GenBank accession number KU324496) ซึ่งเป็นการยืนยันว่าเป็นคนละชนิดกันสอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา นอกจากนี้ *Lentaria* มีจำนวนสปีชีส์ที่ยอมรับเท่ากับ 17 สปีชีส์ ดังนั้นจึงได้นำลำดับนิวคลีโอไทด์ ITS ของ *Lentaria* ทั้งหมดจาก GenBank และ Unite จำนวน 16 ตัวอย่าง มาสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ แสดงในภาพประกอบ 29 พบว่าตัวอย่างจากประเทศไทยแยกกิ่งความสัมพันธ์ออกจาก *L. bambusina* (KU324496 และ KU870448) อย่างชัดเจนด้วยค่า propability เท่ากับ 0.99 ยืนยันได้ว่าต่างสปีชีส์กัน ซึ่งมีแนวโน้มที่จะเป็นสปีชีส์ใหม่และรายงานว่าพบจากประเทศไทยเป็นครั้งแรก



ภาพประกอบ 29 ภาพแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเห็ดปะการังสกุล *Ramaria* โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1-5.8S rDNA ด้วยวิธี Bayesian โดยกำหนดให้ *Lentaria* เป็น outgroup ตัวเลขที่กิ่งคือค่า propability



ภาพประกอบ 30 ภาพแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของ *Lentaria* sp.(PKWS15-164) ที่พบในประเทศไทยกับฐานข้อมูล โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 ด้วยวิธี Bayesian โดยกำหนดให้ *Clavariadelphus truncatus* เป็น outgroup ตัวเลขที่กิ่งคือค่า propability

2 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

ตัวแทนเห็ดปะการัง *Ramaria*, *Phaeoclavulina* และ *Lentaria* ที่มีจำนวนตัวอย่างเพียงพอ 10 ตัวอย่าง นำมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 95 ได้สารสกัดที่มีน้ำหนักอยู่ในช่วง 0.097 – 0.501 กรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท ได้สารสกัดที่มีน้ำหนักอยู่ในช่วง 0.013 – 0.135 กรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (ตาราง 21) จากน้ำหนักสารสกัดแสดงให้เห็นว่าการสกัดด้วยเอทานอลได้น้ำหนักสารมากกว่า ทั้งนี้สารสกัดจากตัวทำละลายทั้งสองชนิดมีสีน้ำตาลอ่อนถึงสีน้ำตาล

ตาราง 21 น้ำหนักสารสกัดจากดอกเห็ด *Ramaria*, *Phaeoclavulina* และ *Lentaria* ด้วยตัวทำละลายเอทานอล และเอทิลอะซิเตท

ชนิด	รหัส	น้ำหนักสารสกัดต่อน้ำหนักตัวอย่างแห้ง 1 กรัม (g/g dry weight)	
		เอทานอล	เอทิลอะซิเตท
Ramaria aff. *flava* var. *aurea*	PKWS15-173	0.230	0.018
R. aff. *vinosimaculans*	PKWS15-74	0.501	0.013
R. aff. *vinosimaculans*	PKWS15-109	0.305	0.019
Ramaria sp. 1	PKWS15-95	0.103	0.019
Ramaria sp. 2	PKWS15-221	0.150	0.017
Ramaria sp. 3	PKWS14-02	0.240	0.019
Ramaria sp. 9	PKWS15-92	0.129	0.020
Ramaria sp. 10	PKWS15-181	0.150	0.020
Phaeoclavulina cokeri	PKWS15-194	0.200	0.018
Lentaria sp.	PKWS15-164	0.097	0.135

สารสกัดที่ได้นำไปทดสอบคุณสมบัติทางชีวภาพ ดังนี้ 1) คุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ 2) คุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ สารฟลาโวนอยด์ และสารประกอบฟีนอลทั้งหมด 3) คุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง 4) คุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

alpha-glucosidase และ alpha-amylase และ 5) คุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA reductase ซึ่งผลแสดงดังต่อไปนี้

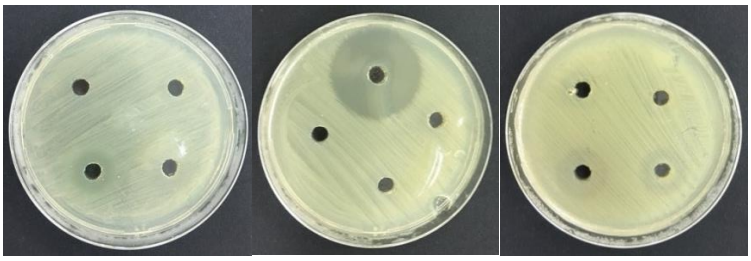
2.1 การศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารต้านการเจริญของจุลินทรีย์

สารสกัดจากเห็ดปะการังด้วยตัวทำละลายเอทานอล และเอทิลอะซิเตท ที่ได้นำมาระเหยตัวทำละลายทั้งสองชนิดออกให้หมด แล้วละลายด้วย DMSO เข้มข้นร้อยละ 10 ก่อนนำมาศึกษาประสิทธิภาพในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ด้วยวิธี agar well diffusion และคำนวณหาค่า MIC และ MBC

2.1.1 การต้านการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี agar well diffusion

นำสารสกัดจากเห็ดปะการังทั้ง 10 ชนิด มาทดสอบประสิทธิภาพในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ จำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27813 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25926 ด้วยวิธี agar well diffusion โดยใช้สาร DMSO เข้มข้นร้อยละ 10 เป็น negative control และ ampicillin เข้มข้น 10 มิลลิกรัมกรัมต่อมิลลิลิตร เป็น positive control พบว่าสารสกัดด้วยเอทานอลส่วนใหญ่สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้มากที่สุด (9 ตัวอย่าง) รองลงมาคือ *E. coli* (6 ตัวอย่าง), *B. subtilis* (4 ตัวอย่าง) และ *P. aeruginosa* (4 ตัวอย่าง) ในขณะที่สารสกัดด้วยเอทิลอะซิเตท สามารถยับยั้งการเจริญของ *B. subtilis* ได้เพียงชนิดเดียวเท่านั้น ได้แก่ *Ramaria* aff. *vinosimaculans* (PKWS15-74), *Ramaria* sp. 1 (PKWS15-95), *Ramaria* sp. 9 (PKWS15-92) และ *Lentaria* sp. (PKWS15-164) นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดด้วยเอทานอลของ *Lentaria* sp. (PKWS15-164) สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ทั้ง 4 สายพันธุ์ (ภาพประกอบ 31)

ทั้งนี้สารสกัดด้วยเอทิลอะซิเตทส่วนใหญ่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ อาจเนื่องจากชนิดของสารสกัดที่ได้จากตัวทำละลายต่างกัน และที่สำคัญคือปริมาณสารสกัดด้วยเอทิลอะซิเตทมีปริมาณน้อยกว่าการสกัดด้วยเอทานอล ซึ่งอาจไม่เพียงพอในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย



ภาพประกอบ 31 ผลการทดสอบสารสกัดด้วยเอทานอลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion

2.1.2 การหาค่า MIC และ MBC

ตัวอย่างสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบได้ นำมาคำนวณหาค่า MIC และ MBC ด้วยวิธี MTT (3-(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) โดยใช้สาร DMSO เข้มข้นร้อยละ 10 เป็น negative control และ ampicillin เข้มข้น 10 มิลลิกรัมกรัมต่อมิลลิลิตร เป็น positive control พบว่ามีสารสกัดจากเอทานอลของเห็ด 4 ชนิด ที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ทั้ง 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *R.* aff. *vinosimaculans* (PKWS15-109), *Ramaria* sp. 2 PKWS15-221, *Ramaria* sp.10 PKWS15-181 และ *Lentaria* sp. PKWS15-164 ซึ่งสารสกัดจากเห็ดที่มีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อ *S. aureus* และ *E. coli* ได้ดีที่สุดคือ *Ramaria* sp. 10 PKWS15-181 (MIC = 7.5 mg/mL, MBC = 15 mg/mL) ส่วนสารสกัดจากเห็ดที่สามารถทำลายเชื้อ *B. subtilis* และ *P. aeruginosa* ได้ดีที่สุดคือ *R.* aff. *vinosimaculans* (PKWS15-109) (MIC = 18.6 mg/mL, MBC = 37.2 mg/mL) และ *Lentaria* sp. PKWS15-164 (MIC = 7.4 mg/mL, MBC = 33.6 mg/mL) ตามลำดับ (ตาราง 22) จากผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเห็ด *Ramaria* ส่วนใหญ่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้อย่างน้อย 1 สายพันธุ์ ยกเว้นสารสกัดจาก *R.* aff. *flava* var. *aurea* (PKWS15-173) ที่ไม่เกิดวงใสในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียตั้งแต่การทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion อาจเนื่องจากสารสกัดที่เตรียมได้จากการทดลองนี้มีความเข้มข้นต่ำที่สุดจึงไม่เพียงพอในการยับยั้งและฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ ในขณะที่สารสกัดจากเอทิลอะซิเตทพบว่าเมื่อนำมาคำนวณหาค่า MIC แล้วไม่สามารถคำนวณได้เพราะที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ทดสอบไม่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์สายพันธุ์ใดได้เลย

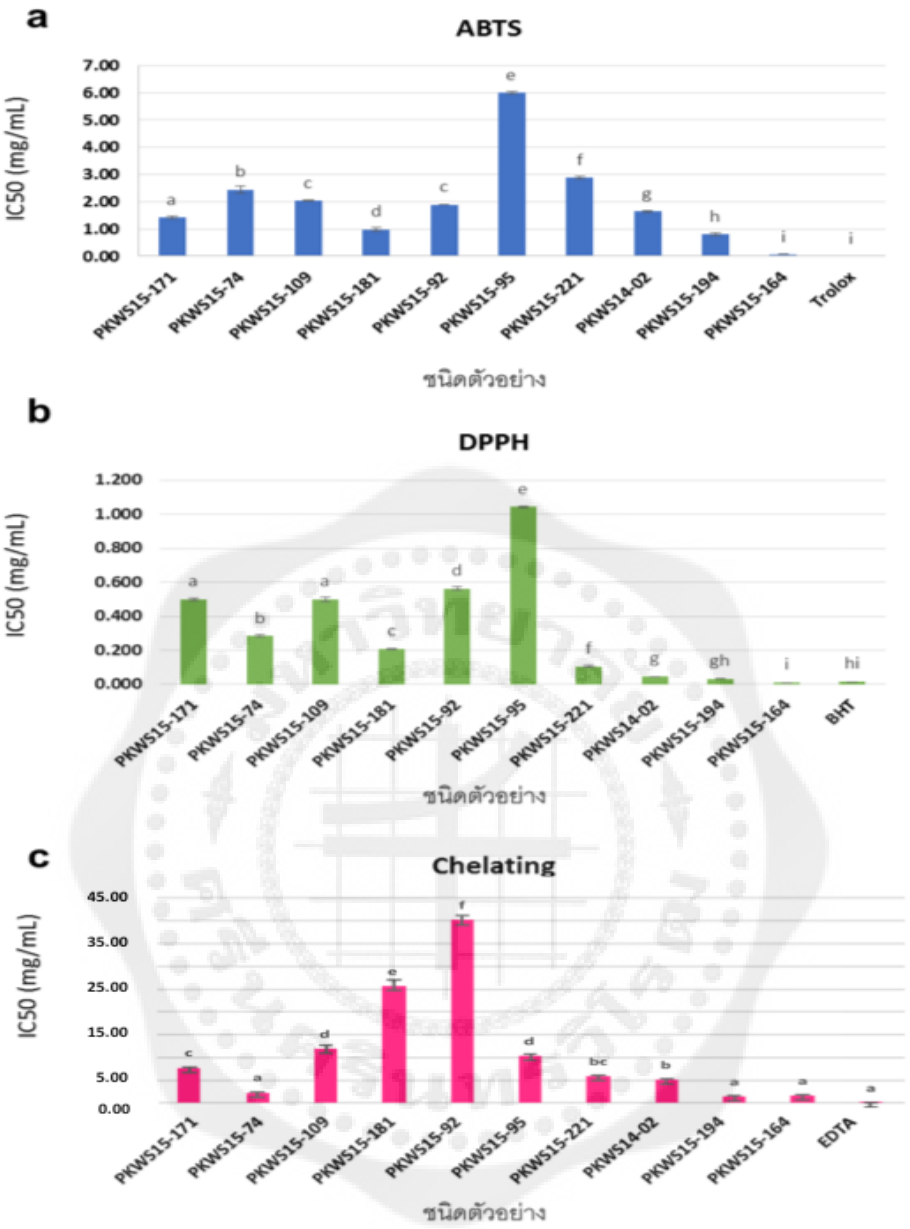
ตาราง 22 ประสิทธิภาพในการยับยั้งและการทำลายจุลินทรีย์ของสารสกัดจากเอทานอลของเห็ดปะการัง

ชนิดของเห็ด	การยับยั้งและการทำลายจุลินทรีย์ (mg/mL)							
	S. aureus ATCC 25926		*B. subtilis* ATCC 6633		*E. coli* ATCC 25922		*P. aeruginosa* ATCC 27813	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
Ramaria aff. *flava* var. *aurea* (PKWS15-173)	-	-	-	-	-	-	-	-
R. aff. *vinosimaculans* (PKWS15-74)	27.4	54.8	-	-	27.4	54.8	-	-
R. aff. *vinosimaculans* (PKWS15-109)	9.3	37.2	18.6	37.2	9.3	37.2	9.3	37.2
Ramaria sp. 1 (PKWS15-95)	16.35	32.7	-	-	-	-	-	-
Ramaria sp. 2 (PKWS15-221)	17.8	17.8	17.8	>35.6	17.8	35.6	17.8	35.6
Ramaria sp. 3 (PKWS14-02)	8.25	16.6	-	-	-	-	-	-
Ramaria sp. 9 (PKWS15-92)	14.2	>14.2	-	-	14.2	>14.2	-	-
Ramaria sp. 10 (PKWS15-181)	7.5	15.0	7.5	>15.0	7.5	15.0	7.5	>15.0
Phaeoclavulina cokeri (PKWS15-194)	7.45	>7.45	-	-	-	-	-	-
Lentaria sp. (PKWS15-164)	16.8	33.6	16.8	>33.6	16.8	33.6	8.4	33.6

2.2 การศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

เนื่องด้วยสารสกัดเห็ดจากเอทิลอะซิเตทมีความเข้มข้นน้อย และมีประสิทธิภาพต่ำ จึงไม่ได้นำมาศึกษาคุณสมบัติของสารออกฤทธิ์ในด้านอื่นๆ ต่อ ส่วนสารสกัดจากเอทานอลทั้ง 10 ตัวอย่าง นำมาละลายในตัวทำละลายที่เหมาะสมก่อนนำมาวัดคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระโดยใช้วิธีการวัดการต้านอนุมูลอิสระด้วยปฏิกิริยาของ diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activities และการต้านอนุมูลอิสระด้วยปฏิกิริยาของ 2,2'-Azino- bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt ($ABTS^{\bullet+}$) radical scavenging activities ซึ่งผลที่ได้รายงานเป็นค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) (mg/mL) ผลแสดงดังภาพประกอบ 32 (ตาราง 23) พบว่าทั้ง 2 วิธีให้ผลไปในทางเดียวกัน และทุกตัวอย่างที่ทดสอบมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระที่ดี โดยตัวอย่างที่มีค่า IC_{50} ต่ำที่สุด 3 อันดับแรก คือ *Lentaria* sp. (PKWS15-164), *P. cokeri* (PKWS15-194) และ *Ramaria* sp. 3 (PKWS14-02) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.009±0.001, 0.032±0.001 และ 0.046±0.004 mg/mL ตามลำดับ เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH ซึ่งสารสกัดจาก *Lentaria* sp. (PKWS15-164) และ *P. cokeri* (PKWS15-194) นั้นมีค่าไม่ต่างจาก positive control ชนิด BHT (IC_{50} = 0.015±0.0003 mg/mL) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ในขณะที่เมื่อทดสอบด้วยวิธี ABTS พบว่าเป็นตัวอย่างที่มีค่า IC_{50} ต่ำที่สุด 3 อันดับแรก คือ *Lentaria* sp. (PKWS15-164), *P. cokeri* (PKWS15-194) และ *Ramaria* sp. 10 (PKWS15-181) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.069±0.003, 0.800±0.049 และ 0.984±0.075 mg/mL ซึ่งค่าของสารสกัดจาก *Lentaria* sp. (PKWS15-164) ไม่ต่างจาก positive control ชนิด Trolox (IC_{50} = 0.002±0.01 mg/mL) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งทั้งวิธี DPPH และ ABTS อาศัยหลักการเดียวกันคือสารสกัดสามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของสารอนุมูลอิสระของ $DPPH^{\bullet+}$ และ $ABTS^{\bullet+}$ โดยการให้อิเล็กตรอนเพื่อยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาต่อเนื่อง นอกจากนี้ได้วัดความสามารถของสารสกัดในแง่ของการเป็นตัวยับยั้งการแย่งจับอิเล็กตรอนโดยโลหะเหล็ก chelating agent โดยใช้ ferrous chloride เทียบกับ positive control ชนิด EDTA (IC_{50} = 0.050±0.001 mg/mL) ผลแสดงในภาพประกอบ 32 พบว่าตัวอย่างที่มีค่า IC_{50} ต่ำที่สุด 3 อันดับแรกคือ *Lentaria* sp. (PKWS15-164), *P. cokeri* (PKWS15-194) และ *R.* aff. *vinosimaculans* (PKWS15-74) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1.676±0.221, 1.499±0.229 และ 2.282±0.123 mg/mL ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากผลการวิเคราะห์แสดงว่าสารสกัดจากเห็ดทุกตัวอย่างที่ทดสอบมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดี



ภาพประกอบ 32 กราฟแสดงประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจาก *Ramaria*, *Phaeoclavulina* และ *Lentaria* ด้วยวิธี a) DPPH, b) ABTS และ c) chelating agent

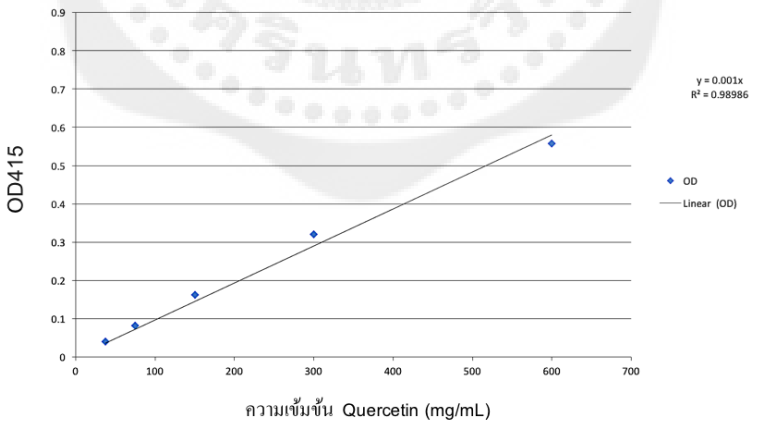
หมายเหตุ: ตัวอักษร a-i แสดงค่านัยสำคัญทางสถิติ จากการวัดผลจำนวน 3 ซ้ำ

2.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์และสารประกอบฟีนอลทั้งหมด

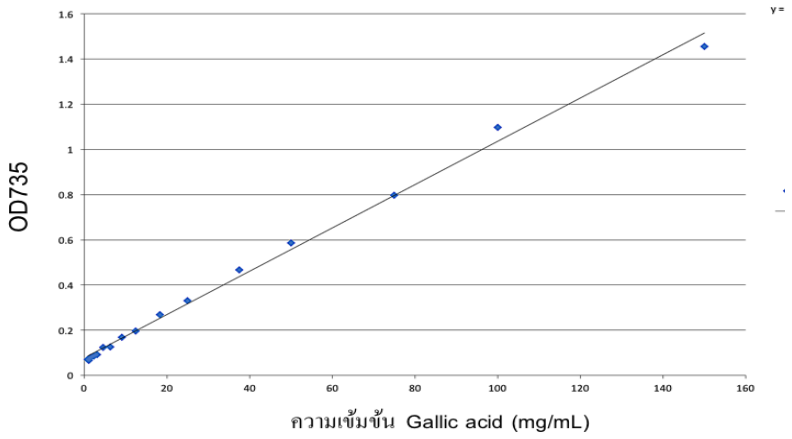
ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ เทียบเคียงกับกราฟมาตรฐานของ Quercetin (ภาพประกอบ 33) โดยรายงานผลเป็น g QE/g extract พบว่าสารสกัดทั้ง 10 ตัวอย่าง มีค่าอยู่ในช่วง 53.049±1.694 ถึง 3,909.517±58.556 g QE/g extract ซึ่งตัวอย่างที่มีค่าสูงที่สุดคือ *Lentaria* sp. (PKWS15-164) *P. cokeri* (PKWS15-194) และ *Ramaria* sp. 3 (PKWS14-02) ตามลำดับ (ตาราง 23)

นอกจากนี้ได้วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด ด้วยวิธีมาตรฐาน Folin-Ciocalteu's method โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของสาร Gallic acid (ภาพประกอบ 34) รายงานผลเป็น g GAE/g extract พบว่าสารสกัดทั้ง 10 ตัวอย่าง มีค่าอยู่ในช่วง 5.756±0.247 ถึง 461.955±8.783 g GAE/g extract ซึ่งตัวอย่างที่มีค่าสูงที่สุดคือ *Lentaria* sp. (PKWS15-164) *P. cokeri* (PKWS15-194) และ *Ramaria* sp. 3 (PKWS14-02) ตามลำดับ (ตาราง 23)

เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดกับประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระพบว่ามีความสัมพันธ์กันคือ ตัวอย่างที่มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระสูง (IC_{50} ต่ำ) จะมีปริมาณสารประกอบฟีนอลที่สูงด้วย ผลกราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดและประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระที่วัดด้วยวิธี DPPH (r^2 = 0.98), ABTS (r^2 = 0.94) และ Ferrous ion chelating assay (r^2 = 0.63) (ภาพผนวก ง)



ภาพประกอบ 33 กราฟมาตรฐานของ Quercetin



ภาพประกอบ 34 กราฟมาตรฐานของ Gallic acid

ตาราง 23 ประสิทธิภาพของสารสกัดจากเห็ดปะการังในการต้านอนุมูลอิสระ สารฟลาโวนอยด์ และสารประกอบฟีนอลทั้งหมด

ชนิด	รหัส	Antioxidant activities (IC50 mg/mL)			Total flavonoid content (g QE/g extract)	Total phenolic content (g GAE/g extract)
		DPPH	ABTS	Chelating agent		
Ramaria aff. *flava* var. *aurea*	PKWS15-173	0.500±0.009^{a}	1.426±0.055^{a}	7.720±0.224^{c}	75.031±0.887^{a}	9.873±0.272^{ab}
R. aff. *vinosimaculans*	PKWS15-74	0.285±0.007^{b}	2.444±0.135^{b}	**2.282±0.123^{a}**	94.030±1.033^{ab}	14.733±0.388^{b}
R. aff. *vinosimaculans*	PKWS15-109	0.501±0.013^{a}	2.029±0.010^{c}	11.961±1.369^{d}	60.809±1.880^{a}	5.756±0.247^{a}
Ramaria sp. 1	PKWS15-95	1.043±0.005^{e}	6.001±0.060^{e}	25.692±2.199^{e}	58.503±0.654^{a}	12.355±1.378^{ab}
Ramaria sp. 2	PKWS15-221	0.106±0.004^{f}	2.883±0.060^{f}	40.163±1.821^{f}	56.785±0.534^{a}	15.352±1.417^{b}
Ramaria sp. 3	PKWS14-02	**0.046±0.001^{g}**	1.649±0.032^{g}	10.327±0.653^{d}	**138.784±2.531^{b}**	**41.304±0.702^{c}**
Ramaria sp. 9	PKWS15-92	0.564±0.013^{d}	1.892±0.013^{c}	5.862±0.560^{bc}	53.049±1.694^{a}	13.164±0.712^{ab}
Ramaria sp. 10	PKWS15-181	0.209±0.004^{c}	**0.984±0.075^{d}**	5.092±0.436^{b}	74.185±0.980^{a}	39.687±0.919^{c}
Phaeoclavulina cokeri	PKWS15-194	**0.032±0.001^{gh}**	**0.800±0.049^{h}**	**1.499±0.229^{a}**	**3765.877±33.753^{c}**	**148.471±1.445^{d}**
Lentaria sp.	PKWS15-164	**0.009±0.001^{i}**	**0.069±0.003^{i}**	**1.676±0.221^{a}**	**3909.517±58.556^{d}**	**461.955±8.783^{e}**
BHT		0.015±0.001^{hi}				
Trolox			0.002±0.010^{i}			
EDTA				0.050±0.001^{a}		

หมายเหตุ: ตัวอักษรภาษาอังกฤษ a-i ในตารางแสดงให้เห็นความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในแต่ละการทดลองตามคอลัมน์ที่ $p<0.05$

2.4 คุณสมบัติของสารสกัดในการต้านการเจริญของเซลล์มะเร็ง

สารสกัดเอทานอล และเอทิลอะซิเตท ที่มีความเข้มข้นสูง ของเห็ดปะการังจำนวน 3 ตัวอย่าง ได้แก่ *R.* aff. *vinosimaculans* (PKWS15-109), *Ramaria* sp. 1 (PKWS15-95) และ *Lentaria* sp. (PKWS15-164) ส่งไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง 3 ชนิด คือ มะเร็งเต้านม (MCF7-breast cancer) มะเร็งช่องปาก (KB-Oral cavity cancer) และ มะเร็งปอด (NCI-H187-small cell lung cancer) ด้วยวิธี Resazurin microplate assay (REMA) ณ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ จากผลการทดสอบพบว่าสารสกัดจากเห็ดทั้ง 3 ตัวอย่างที่สกัดด้วยเอทานอลและเอธิลอะซิเตท ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 10 mg/mL ในขณะที่ positive control ของสาร tamoxifen และ doxorubicin มีค่า IC_{50} เท่ากับ 7.83 และ 9.55 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (เมื่อทดสอบกับเซลล์มะเร็งเต้านม) สาร ellipticine และ doxorubicin มีค่า IC_{50} เท่ากับ 3.06 และ 0.678 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (เมื่อทดสอบกับเซลล์มะเร็งช่องปาก) ส่วนสาร ellipticine และ doxorubicin มีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.85 และ 0.134 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (เมื่อทดสอบกับเซลล์มะเร็งปอด)

2.5 คุณสมบัติของสารสกัดในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ alpha-glucosidase และ alpha-amylase

สารสกัดเอทานอลของเห็ดปะการังจำนวน 10 ตัวอย่าง นำมาทดสอบคุณสมบัติในการลดปริมาณน้ำตาล โดยวัดจากประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ alpha-glucosidase และ alpha-amylase โดยเทียบกับยาที่ใช้ในการรักษาโรคเบาหวาน acarbose พบว่ามีสารสกัดจากเห็ดเพียง 3 ชนิด ที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ alpha-glucosidase ได้ ซึ่งตัวอย่างที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุด ได้แก่ *Ramaria* sp. 10 (PKWS15-181) (IC_{50} = 0.216 ±0.026 mg/mL) รองลงมาคือ *P. cokeri* (PKWS15-194) (IC_{50} = 12.91 ±0.111 mg/mL) ซึ่งมีประสิทธิภาพไม่ต่างจากยา acarbose มีค่า IC_{50} = 33.78 ±0.523 mg/mL อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ *R.* aff. *vinosimaculans* (PKWS15-74) มีค่าน้อยที่สุดคือมีค่า IC_{50} = 48.231± 1.115 mg/mL ทั้งนี้ไม่มีสารสกัดจากเห็ดชนิดใดที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ alpha-amylase ได้ ในขณะที่ยา acarbose สามารถยับยั้งได้ดีมีค่า IC_{50} = 3.514± 0.018 mg/mL (ตาราง 24)

ตาราง 24 ประสิทธิภาพของสารสกัดจากเห็ดปะการังในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ alpha-glucosidase และ alpha-amylase

ชนิด	รหัส	การยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ (IC_{50}) mg/mL	
		Alpha-glucosidase	Alpha-amylase
Ramaria aff. *flava* var. *aurea*	PKWS15-173	-	-
R. aff. *vinosimaculans*	PKWS15-74	48.231±1.115[b]	-
R. aff. *vinosimaculans*	PKWS15-109	-	-
Ramaria sp. 1	PKWS15-95	-	-
Ramaria sp. 2	PKWS15-221	-	-
Ramaria sp. 3	PKWS14-02	-	-
Ramaria sp. 9	PKWS15-92	-	-
Ramaria sp. 10	PKWS15-181	0.216±0.026[a]	-
Phaeoclavulina cokeri	PKWS15-194	12.908±0.11[a]	-
Lentaria sp.	PKWS15-164	-	-
Acarbose		33.782±0.523[ab]	3.514±0.018

หมายเหตุ: ตัวอักษรภาษาอังกฤษในตารางแสดงให้เห็นความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในแต่ละการทดลองตามคอลัมน์ที่ $p<0.05$

2.6 คุณสมบัติของสารสกัดในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA reductase

สารสกัดเอทานอลของเห็ดปะการังจำนวน 10 ตัวอย่าง นำมาทดสอบคุณสมบัติในการลดคอเลสเตอรอล โดยวัดจากประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA reductase โดยเทียบกับยารักษาโรคไขมันสูง Pravastatin รายงานผลเป็นอัตราการยับยั้ง (% inhibition rate) (ตาราง 25) พบว่ามีสารสกัด 8 ตัวอย่าง ที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ มีค่า อยู่ในช่วง 13.13 – 97.98 % inhibition rate ตัวอย่างที่มีอัตราการยับยั้งสูงที่สุด ได้แก่ *P. cokeri* (PKWS15-194) รองลงมาคือ *Ramaria* sp.2 (PKWS15-221) และ *Lentaria* sp. (PKWS15-164) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 97.98, 85.86 และ 72.73 % ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดจาก *P. cokeri* (PKWS15-194) มีอัตราการยับยั้งเอนไซม์ที่สูงกว่า Pravastatin อีกด้วย ในขณะที่สารสกัดจาก *R.* aff.

vinosimaculans (PKWS15-74) และ *Ramaria* sp. 3 (PKWS14-02) ไม่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้

ตาราง 25 ประสิทธิภาพของสารสกัดจากเห็ดปะการังในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA reductase

ชนิด	รหัส	อัตราการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA reductase (%inhibition rate)
Ramaria aff. *flava* var. *aurea*	PKWS15-173	13.13
R. aff. *vinosimaculans*	PKWS15-74	ND
R. aff. *vinosimaculans*	PKWS15-109	76.76
Ramaria sp. 1	PKWS15-95	28.28
Ramaria sp. 2	PKWS15-221	85.86
Ramaria sp. 3	PKWS14-02	ND
Ramaria sp. 9	PKWS15-92	38.39
Ramaria sp. 10	PKWS15-181	37.38
Phaeoclavulina cokeri	PKWS15-194	97.98
Lentaria sp.	PKWS15-164	72.73
Pravastatin		95.51

หมายเหตุ: ND คือ Not detected ตรวจไม่พบการยับยั้ง

3 ผลการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลโดยวิธี Liquid Chromatography-Mass Spectrophotometry (LC-MS)

เนื่องจากข้อมูลของสารสกัดเอทานอลจากเห็ดปะการังทั้ง 10 ตัวอย่างที่ศึกษา มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระที่ดี และมีปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดที่สูง จึงนำสารสกัดดังกล่าวมาศึกษารูปแบบทางเคมี (chemical profile) ด้วยวิธี HPLC ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 272 นาโนเมตร จากนั้นวิเคราะห์พีคที่ปรากฏด้วยการหามวลโมเลกุลด้วยเครื่อง LC-MS เพื่อวิเคราะห์มวลโมเลกุลของสารที่พบเป็นหลัก เทียบกับฐานข้อมูล massbank นอกจากนี้ได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณ

สารประกอบฟีนอลที่มีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระเทียบเคียงกับสารมาตรฐานจำนวน 7 ชนิด

3.1 การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค High performance liquid chromatography (HPLC)

สารสกัดเอทานอลจากเห็ดปะการังทั้ง 10 ตัวอย่าง นำมาวิเคราะห์รูปแบบทางเคมีของสารด้วยเทคนิค HPLC ที่ความยาวคลื่น 272 นาโนเมตร โดยใช้ระบบที่อาศัยความเข้มข้นของโมบายเฟสที่ต่างกันในแต่ละช่วงเวลา (gradient) และใช้สารมาตรฐาน คือ gallic acid พบว่าสารแต่ละชนิดมีการแสดงออกของพีคหลัก (หรือพีคที่ตรวจพบความเข้มข้นของสารสูง) ในเวลาที่แตกต่างกัน แสดงดังตาราง 26 (ภาคผนวก จ) โดยสารสกัดส่วนใหญ่พบในช่วง 8 นาทีแรกของการวิเคราะห์ พีคหลักแสดงด้วยสัญลักษณ์ “ * ” พบว่าสารสกัดแต่ละตัวอย่างมีพีคหลักจำนวน 1-3 พีค เท่านั้น นอกนั้นเป็นพีคย่อย แสดงให้เห็นว่าสารหลักที่ตรวจพบในสารสกัดน่าจะคล้ายคลึงกันซึ่งอาจเป็นสารชนิดเดียวกัน สารสกัดที่มีพีคตรงกันมากที่สุดที่เวลา 2.7 นาที มี 6 ตัวอย่าง เป็นสารหลักที่พบปริมาณสูงใน *R.* aff. *vinosimaculans* (PKWS15-109), *Ramaria* sp. 1 (PKWS15-95) และ *Ramaria* sp. 9 (PKWS15-92) ส่วนที่เวลา 3.6 นาที ตรวจพบสารหลักที่มีปริมาณสารสูงที่สุด และตรงกันจำนวน 3 ตัวอย่าง ได้แก่ *R.* aff. *flava* var. *aurea* (PKWS15-173), *R.* aff. *vinosimaculans* (PKWS15-109) และ *Ramaria* sp. 10 (PKWS15-181) นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดจาก *P. cokeri* (PKWS15-194) และ *Lentaria* sp. (PKWS15-164) มีสารหลักที่พบปริมาณสูงต่าง จาก *Ramaria* ชนิดอื่น คือ *P. cokeri* (PKWS15-194) พบสารหลักที่เวลา 2.97, 3.52 และ 4.60 นาที ส่วน *Lentaria* sp. (PKWS15-164) พบสารหลักที่เวลา 2.53 และ 2.83 นาที

ตาราง 26 ผลของพีคสารสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลจาก *Ramaria*, *Phaeoclavulina* และ *Lentaria* ซึ่งตรวจวัดได้ที่เวลาต่างๆ ความยาวคลื่น 272 นาโนเมตร ด้วยเทคนิค HPLC

เวลา (นาที)	ตัวอย่างเห็ดที่ศึกษา									
	Ramaria aff. *flava* var. *aurea*	R. aff. *vinosi-maculans*	R. aff. *vinosi-maculans*	*Ramaria* sp. 1	*Ramaria* sp. 2	*Ramaria* sp. 3	*Ramaria* sp. 9	*Ramaria* sp. 10	*Phaeo-clavulina cokeri*	*Lentaria* sp.
	PKWS 15-173	PKWS 15-74	PKWS 15-109	PKWS 15-95	PKWS 15-221	PKWS 14-02	PKWS 15-92	PKWS 15-181	PKWS 15-194	PKWS 15-164
0-1	-	-	-	-	0.27	-	-	-	0.28	-
	-	-	-	-	-	0.37	-	-	-	-
	-	-	-	-	0.60	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	0.70	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	0.86	-
1-2	-	-	-	-	-	-	-	-	1.20	-
2-3	2.27	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	2.33	-	-	-	2.30	-	-	2.31	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.53*
	-	2.60	-	-	2.63*	2.69*	-	-	-	-
	2.75	2.76*	-	2.71*	-	-	2.71*	2.71	2.71	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.83*
	2.97	2.94*	-	-	-	-	-	-	2.97*	-
3-4	-	-	-	-	-	3.07*	3.01*	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	3.18	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	3.28	-	-
	3.38	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	3.52*	3.52
	3.61*	-	3.61*	-	-	-	-	3.65*	-	
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.88
4-5	-	-	-	-	4.18	-	-	-	-	
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.27
	-	-	-	4.43	-	-	4.49	-	-	-
	-	-	-	-	-	4.60	-	-	4.60*	-
	-	-	-	-	-	4.78	-	-	-	-
5-6	-	-	5.60	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	5.89	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	5.96	-	-
7-8	-	-	-	-	-	-	-	7.17	-	-

หมายเหตุ: แถบสีเทาแสดงตำแหน่งของพีคสารที่พบในตัวอย่างตั้งแต่ 3 ตัวอย่างขึ้นไป และเครื่องหมาย * คือพีคที่พบสารมากที่สุดในแต่ละตัวอย่าง

3.2 การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC-ESI-MS

จากผลการวิเคราะห์รูปแบบทางเคมีของสารสกัดเอทานอลจากเห็ดปะการังจำนวน 10 ตัวอย่าง ในเบื้องต้นด้วยวิธี HPLC ผลแสดงในตาราง 26 ได้นำมาวิเคราะห์ต่อด้วยระบบของโมบายเฟสและคอลัมน์เดิมจากการทดลองก่อนหน้านี้ โดยการทำให้สารเป็นไอออน (electrospray ionization interface, ESI) ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 272 นาโนเมตร เพื่อวิเคราะห์มวลโมเลกุลของสารด้วยเครื่อง mass spectrophotometry กำหนดให้สแกนหามวลโมเลกุลของสารที่มีขนาดระหว่าง 100-800 และคัดเลือกมวลโมเลกุลของสารที่มีค่าสูงสุด 10 อันดับแรกแสดงผลในตาราง 27 โดยสัญลักษณ์ " * " คือ มวลโมเลกุลของสารที่พบที่เวลาตรงกับผลการทดลองก่อนหน้านี้และเป็นพีคหลัก

ผลการทดลองพบว่าสารที่มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 416 – 416.1 เป็นสารที่พบในสารสกัดจากเห็ดปะการังทุกตัวอย่าง ซึ่งตัวอย่างที่พบปริมาณสูงได้แก่ *R.* aff. *flava* var. *aurea* (PKWS15-173), *R.* aff. *vinosimaculans* (PKWS15-109) และ *Ramaria* sp.10 (PKWS15-181) เมื่อนำไปเทียบเคียงกับฐานข้อมูล massbank พบว่ามีมวลโมเลกุลใกล้เคียงกับสาร Puerarin (416.1036) (ภาพประกอบ 23) ซึ่งมีรายงานว่ามีฤทธิ์ทางยาช่วยในการเพิ่มการไหลเวียนของหลอดเลือดหัวใจ ลดการก่อตัวของลิ่มเลือด[75] และสาร Ramipril (416) มีรายงานว่าเป็นกลุ่มยาใช้ในการรักษาโรคความดันโลหิตสูง[76]

สารที่มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 180.8-181 พบในสารสกัดจำนวน 9 ตัวอย่าง ยกเว้น *R.* aff. *vinosimaculans* (PKWS15-109) และพบปริมาณสูงใน *Ramaria* sp.1 (PKWS15-95), *Ramaria* sp.2 (PKWS15-221), *Ramaria* sp.3 (PKWS14-02), *Ramaria* sp.9 (PKWS15-92) เมื่อนำไปเทียบเคียงกับฐานข้อมูล massbank พบว่ามีมวลโมเลกุลใกล้เคียงกับสาร Caffeic acid (180) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ[77]

สารที่มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 213.9-214 พบในสารสกัดจำนวน 8 ตัวอย่าง ในปริมาณไม่สูงเมื่อนำไปเทียบเคียงกับฐานข้อมูล massbank พบว่ามีมวลโมเลกุลใกล้เคียงกับสาร Phenoxybenzoic acid (214.0576) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

สารที่มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 195 พบในสารสกัดจำนวน 7 ตัวอย่าง ในปริมาณไม่สูงเมื่อนำไปเทียบเคียงกับฐานข้อมูล massbank พบว่ามีมวลโมเลกุลใกล้เคียงกับสาร Dimethyluric acid (195.0518 และ 195.4028) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

สารที่มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 187-187.1 พบในสารสกัดจำนวน 5 ตัวอย่าง ในปริมาณไม่สูงเมื่อนำไปเทียบเคียงกับฐานข้อมูล massbank พบว่ามีมวลโมเลกุลใกล้เคียงกับสาร Catechin (187) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

นอกจากนี้ยังพบสารมวลโมเลกุลเท่ากับ 255.2 ในสารสกัดจาก *R.* aff. *flava* var. *aurea* (PKWS15-173) และ *Ramaria* sp.3 (PKWS14-02) ซึ่งมีมวลโมเลกุลใกล้เคียงกับสาร Riboflavin (255.2) หรือวิตามิน B2 เมื่อเทียบกับฐานข้อมูลอีกด้วย ส่วนผลของการเทียบเคียงมวลโมเลกุลของสารสกัดอื่นๆ แสดงในตาราง 27 และภาพประกอบ 35 อย่างไรก็ตามผลที่ได้เป็นการเทียบเคียงกับฐานข้อมูล massbank เท่านั้นซึ่งต้องวิเคราะห์เปรียบเทียบกับสารบริสุทธิ์อีกครั้งจึงจะยืนยันผลได้อย่างถูกต้อง

ตาราง 27 การวิเคราะห์ชนิดสารประกอบฟีนอลจากสารสกัดเห็ด *Ramaria*, *Phaeoclavulina* และ *Lentaria* ด้วยวิธี HPLC-ESI-MS

ชนิดของสารสกัด	รหัส	m/z	Retention time
Ramaria aff. *flava* var. *aurea*	PKWS15-173	214 [4]	2.507-2.600
		180.9* [1]	2.623-2.877
		416.1* [5]	**3.572-3.734**
		195 [3]	7.382-7.861
		128	9.959-10.823
		187 [2]	32.561-32.738
		121, 265 [11]	34.320-34.744
		329.1	36.047-36.418
		255.2 [10]	39.881-44.942
R. aff. *vinosimaculans*	PKWS15-109	181, 221* [1]	2.337-2.854
		176.8* [8]	**2.947-3.062**
		416.1 [5]	3.595-3.764
		146 [6]	4.775-5.006
		195 [3]	7.305-8.239
		128	10.036-10.630
		152.9	19.347-19.794
		383.1 [14]	27.377-27.878
		265 [11]	34.304-34.705
		213.9 [4]	2.399-2.584

ตาราง 27 (ต่อ)

ชนิดของสารสกัด	รหัส	m/z	Retention time
R. aff. *vinosimaculans*	PKWS15-74	172.9, 222 [9]	2.623-3.101
		416.1* [5]	**3.595-3.741**
		409	5.824-5.986
		195 [3]	6.827-7.321
		187 [2]	32.422-32.653
		154.9, 199	34.165-34.335
		329	35.963-36.256
Ramaria sp. 1	PKWS15-95	214 [4]	2.507-2.569
		144.1, 173, **180.9* [1]**	**2.661-2.862**
		176.9 [8]	2.939-3.055
		416.1 [5]	3.487-3.757
		195.0 [3]	7.089-8.161
		128	9.210-10.684
		383.1 [14]	27.570-27.786
		187.1 [2]	32.507-32.638
Ramaria sp. 2	PKWS15-221	**180.8, 222* [1]**	**2.445-3.255**
		243	3.286-3.410
		134	3.433-3.510
		129, 194, 416 [5]	3.595-3.718
		128	7.583-8.246
		214 [4]	27.300-27.570
		172.9	30.185-30.401
Ramaria sp.3	PKWS14-02	214 [4]	2.507-2.584
		180.8* [1]	**2.646-2.854**
		176.9* [8]	**2.947-3.109**

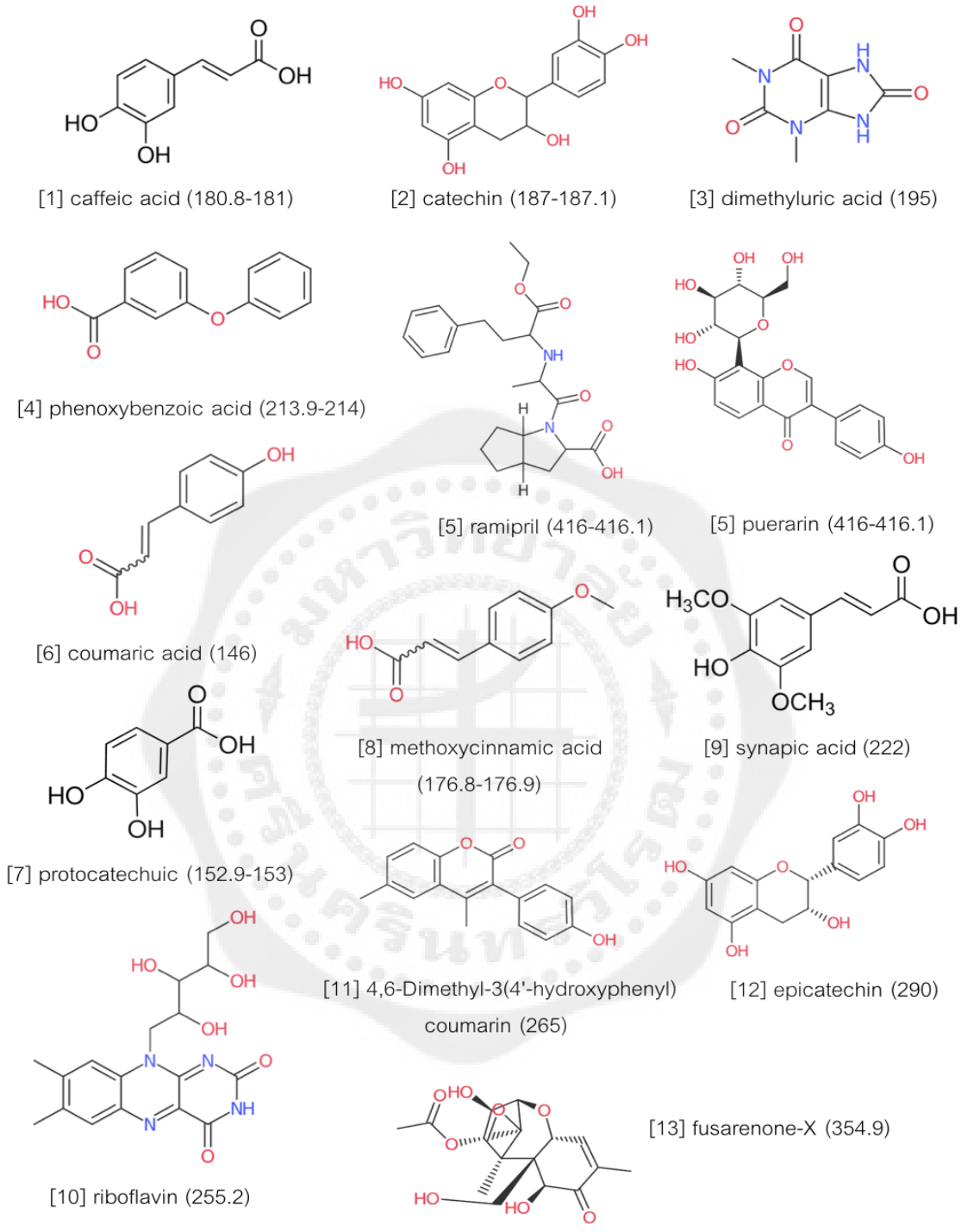
ตาราง 27 (ต่อ)

ชนิดของสารสกัด	รหัส	m/z	Retention time
Ramaria sp.3	PKWS14-02	416.1 [5]	3.510-3.772
		195 [3]	7.429-8.215
		128	10.175-10.992
		152.9 [7]	19.432-19.979
		459.1	27.308-27.523
		187 [2]	32.538-32.723
		255.2 [10]	42.296-45.320
Ramaria sp.9	PKWS15-92	218	2.322-3.422
		214.8 [4]	2.449-2.584
		181* [1]	**2.646-2.800**
		176* [8]	**2.939-3.070**
		354.9 [13]	3.194-3.255
		416.1 [5]	3.610-3.746
		146, 195 [3]	4.821-4.983
		128, 290 [12]	9.689-10.630
Ramaria sp.10	PKWS15-181	180.9* [1]	2.661-2.846
		416* [5]	**3.602-3.710**
		195 [3]	4.790-5.014
		128, 290 [12]	8.200-9.018
		125	12.821-13.577
		136	26.660-26.791
		214 [4]	27.439-27.562
		383 [14]	27.662-27.724
		329.2	35.893-36.479

ตาราง 27 (ต่อ)

ชนิดของสารสกัด	รหัส	m/z	Retention time
Phaeoclavulina cokeri	PKWS15-194	214 [4]	2.368-2.222
		180.8 [1]	2.646-2.693
		416.1* [5]	**3.595-3.749**
		145.9	4.806-4.037
		168.9	9.588-10.098
		128	10.344-10.892
		109, 153 [7]	19.154-20.056
		232.6	23.751-24.338
		193.0	36.834-36.996
Lentaria sp.	PKWS15-164	223	2.09-2.34
		189.9*	**2.5-3.2**
		416.1* [5]	3.55-3.98
		128, 132.9	8.99-10.46
		109, 153 [7]	18.81-19.75
		459.1	27.33-27.75
		187 [2]	32.53-32.66
		180.9 [1]	33.09-33.33

หมายเหตุ: * หมายถึงมวลโมเลกุลของสารที่ตรงกับเวลาที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC, ตัวอักษรหนา หมายถึงมวลโมเลกุลของสารที่พบเป็นพีคหลักในปริมาณสูงจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC และตัวเลขที่อยู่ในเครื่องหมาย [ ] หมายถึงเลขอ้างอิงโครงสร้างสารแสดงในภาพประกอบ 35



ภาพประกอบ 35 โครงสร้างทางเคมีของสารที่ได้จากการเทียบเคียงน้ำหนักโมเลกุลของสารกับฐานข้อมูล massbank

3.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลลิกบางชนิดเทียบกับสารมาตรฐาน ด้วยเทคนิค MRM-MS/MS

สารสกัดเอทานอลของเห็ดปะการัง 10 ตัวอย่าง นำมาวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลบางชนิดที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยเทียบกับสารมาตรฐาน 7 ชนิด ได้แก่ gallic acid, salicylic acid, valnilic acid, syringic acid, valnilin, coumaric acid และ benzoic acid ด้วยเครื่อง MRM-MS/MS ผลแสดงในตาราง 28 พบว่าสารสกัดทุกตัวอย่างตรวจพบสารมาตรฐานทั้ง 7 ชนิด ในปริมาณที่แตกต่างกัน ได้แก่ สาร gallic acid พบปริมาณ 45.09-4560.34 ไมโครกรัมต่อลิตร มากที่สุดใน *P. cokeri* (PKWS15-194) สาร salicylic acid พบปริมาณ 62.64-697.23 ไมโครกรัมต่อลิตร มากที่สุดใน *Ramaria* sp.2 (PKWS15-221) สาร valnilic acid พบปริมาณ 22.92-469.54 ไมโครกรัมต่อลิตร มากที่สุดใน *Lentaria* sp. (PKWS15-164) สาร syringic acid พบปริมาณ 1.21-58.73 ไมโครกรัมต่อลิตร มากที่สุดใน *Lentaria* sp. (PKWS15-164) สาร valnilin acid พบปริมาณ 22.92-469.54 ไมโครกรัมต่อลิตร มากที่สุดใน *Lentaria* sp. (PKWS15-164) สาร coumaria acid พบปริมาณ 2.66-211.77 ไมโครกรัมต่อลิตร มากที่สุดใน *R.* aff. *vinosimaculans* (PKWS15-74) และ สาร benzoic acid พบปริมาณ 5.10-31.95 ไมโครกรัมต่อลิตร มากที่สุดใน *Ramaria* sp.2 (PKWS15-221) จากผลรวมของสารประกอบฟีนอลที่ตรวจวัดพบว่าสารสกัดจาก *P. cokeri* (PKWS15-194) มีปริมาณสูงที่สุดเท่ากับ 5,186.85 ไมโครกรัมต่อลิตร รองลงมาคือ *Lentaria* sp. (PKWS15-164) มีปริมาณเท่ากับ 1,267.53 ไมโครกรัมต่อลิตร และ *Ramaria* sp.10 (PKWS15-181) มีปริมาณเท่ากับ 1,141.23 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ สอดคล้องกับผลการวัดสารต้านอนุมูลอิสระ สารฟลาโวนอยด์ และสารประกอบฟีนอลทั้งหมด ในการทดลองก่อนหน้านี้

ตาราง 28 ปริมาณสารประกอบกรดฟีนอลิกชนิดต่างๆ ที่ตรวจพบจากสารสกัดจากเห็ดปะการังด้วยเทคนิค MRM-MS/MS โดยเทียบกับสารมาตรฐาน

ชนิดของสารสกัด	รหัส	ปริมาณสารต่างๆ ที่ตรวจพบ (µg/L)							
		Gallic acid	Salicylic acid	Valnilic acid	Syringic acid	Valnilin	Coumaric acid	Benzoic acid	ปริมาณสารทั้งหมด
Ramaria aff. *flava* var. *aurea*	PKWS15-173	66.67	85.28	47.61	5.80	15.94	5.93	21.92	249.15
R. aff. *vinosimaculans*	PKWS15-109	18.67	62.64	35.75	4.23	15.05	5.41	19.67	161.42
R. aff. *vinosimaculans*	PKWS15-74	65.00	311.93	99.59	2.83	15.02	**211.77**	6.69	712.83
Ramaria sp.10	PKWS15-181	651.75	374.08	48.65	4.21	38.68	8.66	15.20	1141.23
Ramaria sp.9	PKWS15-92	48.11	95.66	22.92	3.30	15.23	6.31	22.42	213.95
Ramaria sp.1	PKWS15-95	105.98	238.54	136.32	8.41	31.77	60.63	6.19	587.84
Ramaria sp.2	PKWS15-221	129.33	**697.23**	28.36	4.34	33.95	25.09	**31.95**	950.25
Ramaria sp.3	PKWS14-02	45.09	133.03	45.39	1.21	44.26	2.66	23.39	295.03
Phaeoclavulina cokeri	PKWS15-194	**4560.34**	502.10	35.69	4.55	25.90	33.60	24.67	**5186.85**
Lentaria sp.	PKWS15-164	221.86	400.08	**469.54**	**58.73**	**91.50**	20.72	5.10	1267.53

บทที่ 5
สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

เห็ดปะการังจำนวน 39 ตัวอย่าง จากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียว จังหวัดชัยภูมิ สามารถจัดจำแนกชนิดตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ large subunit ribosomal DNA (LSU rDNA) และ internal transcribed spacers (ITS) พบว่าสามารถจัดจำแนกได้ 3 สกุล คือ *Ramaria* (37 ตัวอย่าง) *Phaeoclavulina* (1 ตัวอย่าง) และ *Lentaria* (1 ตัวอย่าง) ซึ่ง *Ramaria* เป็นสกุลที่พบมากที่สุด ประกอบด้วย 14 สปีชีส์ ซึ่งทุกสปีชีส์ยังไม่เคยมีรายงานในประเทศไทยมาก่อน และเป็นชนิดที่ยังไม่สามารถระบุได้อย่างถูกต้องถึง 10 สปีชีส์ ได้แก่ *Ramaria conjunctipes* var. *tsugensis* (จำนวน 1 ตัวอย่าง), *R.* aff. *flava* var. *aurea* (จำนวน 1 ตัวอย่าง), *R.* aff. *rubribrunnescens* (จำนวน 5 ตัวอย่าง), *R.* aff. *vinosimaculans* (จำนวน 7 ตัวอย่าง), *Ramaria* sp.1 (จำนวน 3 ตัวอย่าง), *Ramaria* sp.2 (จำนวน 2 ตัวอย่าง), *Ramaria* sp.3 (จำนวน 6 ตัวอย่าง), *Ramaria* sp.4 (จำนวน 6 ตัวอย่าง), *Ramaria* sp.5 (จำนวน 1 ตัวอย่าง), *Ramaria* sp.6 (จำนวน 1 ตัวอย่าง), *Ramaria* sp.7 (จำนวน 1 ตัวอย่าง), *Ramaria* sp.8 (จำนวน 1 ตัวอย่าง), *Ramaria* sp.9 (จำนวน 1 ตัวอย่าง) และ *Ramaria* sp.10 (จำนวน 1 ตัวอย่าง) ส่วน *Phaeoclavulina* พบ 1 สปีชีส์ ได้แก่ *P. cokeri* ซึ่งเคยมีรายงานการค้นพบในประเทศไทยแล้ว ในขณะที่สกุล *Lentaria* พบ 1 สปีชีส์ ที่ยังไม่สามารถระบุสปีชีส์ได้และมีแนวโน้มเป็นสปีชีส์ใหม่ของโลกอีกด้วย

ในประเทศไทยมีรายงานจำนวน *Ramaria* ที่พบแล้วเพียง 32 สปีชีส์ (ตาราง 1)[7-9,16-19] ซึ่งมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาต่างจากตัวอย่างที่พบในการศึกษาครั้งนี้ ดังนั้น *R. conjunctipes* var. *tsugensis*, *R.* aff. *flava* var. *aurea*, *R.* aff. *rubribrunnescens* และ *R.* aff. *vinosimaculans* จึงเป็นรายงานแรกที่พบในประเทศไทย นอกจากนี้ยังมี *Ramaria* อีก 10 สปีชีส์ ที่ยังไม่สามารถระบุสปีชีส์ได้ เนื่องจากมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างจากข้อมูลของสปีชีส์ที่เคยมีรายงานมาก่อน ซึ่งในจำนวนนี้มีแนวโน้มที่จะเป็นสปีชีส์ใหม่ของโลกอย่างน้อย 2 สปีชีส์ ที่มีจำนวนและข้อมูลตัวอย่างสมบูรณ์ ได้แก่ *Ramaria* sp.2 (PKWS15-221 และ PKWS15-235) และ *Ramaria* sp.4 (PKWS14-25, PKWS14-28, PKWS14-31, PKWS14-39, PKWS15-208) ส่วนอีก 8 สปีชีส์ ที่ยังไม่สามารถระบุสปีชีส์ได้นั้น บางตัวอย่างมีจำนวนดอกเห็ดน้อย หรือไม่สมบูรณ์ หรือขาดข้อมูลทางสัณฐานวิทยาบางประการที่ใช้ในการระบุสปีชีส์ หรือมีลักษณะก่ำกึ่งกับสปีชีส์ที่เคยมีรายงานมาก่อนมากกว่า 1 สปีชีส์ ทำให้ยังไม่สามารถระบุสปีชีส์ได้ชัดเจนว่าเป็นสปีชีส์ใหม่หรือไม่ ซึ่งต้องศึกษาเทียบเคียงกับตัวอย่างต้นแบบแรก (holotype) ในหอพันธุ์ไม้ (herbarium) รวมทั้งพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างต้นแบบแรกกับตัวอย่างที่ศึกษา อย่างไรก็ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใช้

ในการระบุ สปีชีส์ของ *Ramaria* นั้นมีความสำคัญอย่างมาก ซึ่งส่วนใหญ่ข้อมูลที่ใช้เทียบเคียงและอ้างอิงมักเป็นข้อมูลจากเอกสารหรือตำราจากการศึกษาตัวอย่างในต่างประเทศเนื่องจากในประเทศไทยมีข้อมูลจำกัด ซึ่งอาจมีลักษณะบางประการที่แตกต่างกันเนื่องจาก สภาพภูมิอากาศ ลักษณะของดิน และชนิดของพืชอาศัยในกรณีที่ดำรงชีวิตเป็นไมคอร์ไรซา สำหรับประเทศไทยมีรายงานว่าพบการเจริญในป่าสน หรือสนผสมเต็งรังซึ่งมีการเจริญของพืชในวงศ์ยางและสน[8,19] นอกจากนี้ผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ LSU ของตัวอย่าง *Ramaria* ที่ศึกษาจำนวน 25 ตัวอย่าง พบว่าไม่สามารถแยกความแตกต่างในระดับสปีชีส์ที่ใกล้เคียงกันได้ แต่สามารถแยกกลุ่มตาม subgenus คือ subgenus *Lentoramaria*, *Laeticolora* และ *Ramaria* ได้เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ LSU มีความแปรปรวนน้อยในระดับสปีชีส์[25,26] และเหมาะสำหรับการจัดกลุ่มในระดับสกุลมากกว่าแต่สังเกตได้ว่าตัวอย่างของ *Ramaria* ที่พบจากประเทศไทยนั้นแยกกิ่งความสัมพันธ์ออกจากตัวอย่างในฐานข้อมูล GenBank ที่มาจากประเทศต่างๆ ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Humpert, et al. (2001)[25] ที่ศึกษาแผนภูมิวิวัฒนาการของเห็ดสกุล *Ramaria* และสกุลใกล้เคียง โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ LSU และ mitochondrial small subunit ribosomal DNA พบว่าสปีชีส์ต่างๆ ของ subgenus *Ramaria* รวมอยู่ใน clade เดียวกันและมีความสัมพันธ์แบบ monophyletic เช่นเดียวกับการศึกษาของ Giachini, et al. (2010)[26] ในขณะที่ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของ *Ramaria* ที่ศึกษาจำนวน 14 ตัวอย่าง พบว่ามีค่าร้อยละความเหมือนของทุกตัวอย่างต่ำกว่า 97 (เป็นค่าที่ยอมรับว่าเป็นสปีชีส์เดียวกัน) คืออยู่ในช่วงร้อยละ 76-95 เนื่องจากในฐานข้อมูล GenBank และ Unite ไม่มีข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Ramaria* จากประเทศไทยมาก่อน อย่างไรก็ตามแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการแสดงการแยกกิ่งของ *Ramaria* spp. ที่ไม่สามารถระบุสปีชีส์ได้ออกจากสปีชีส์อื่นๆ ด้วยค่าpropability ที่สูง (0.99-1.00) ซึ่งสนับสนุนผลของลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันของแต่ละสปีชีส์[25,26]

ส่วน *Phaeoclavulina* เป็นสกุลที่แยกมาจาก *Ramaria* subgenus *Echinoramaria* มีการเจริญบนซากไม้ ดอกเห็ดมีสีหม่น แต่ปลายกิ่งมีสีสด เช่น สีเขียว ฟ้า ส้ม เป็นต้น ลักษณะที่สำคัญของเห็ดสกุลนี้คือลวดลายบนผิวสปอร์มีลักษณะคล้ายหนาม (spiny)[6] ซึ่งต้องศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ในการศึกษาครั้งนี้พบ 1 สปีชีส์ คือ *P. cokeri* (PKWS15-194) เคยมีรายงานแล้วจากอุทยานแห่งชาติน้ำหนาว จังหวัดเพชรบูรณ์ [8,9] ซึ่งในประเทศไทยมีรายงานเพียง 2 สปีชีส์ ได้แก่ *P. cokeri* (R.H. Petersen) Giachini และ *P. cyanocephala* (Berk. & M.A. Curtis) Giachini[8,9,16,17] แม้ว่าผลของการเทียบเคียงของลำดับนิวคลีโอไทด์ ITS มีค่าร้อยละความเหมือนเท่ากับ 89 กับ *Ramaria* sp. (Accession No. KP012956) อาจเนื่องจากในฐานข้อมูลไม่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ ITS ของ *P. cokeri*

ในขณะที่ *Lentaria* เป็นอีกสกุลหนึ่งที่จัดอยู่ในกลุ่มของเห็ดปะการัง ประกอบด้วย 17 สปีชีส์ทั่วโลก[78] มีการเจริญบนซากไม้และผิวสปอร์เรียบ[6] ในประเทศไทยมีเพียงรายงานเดียวที่พบโดยวัชรพรรณ พลอามาตย์ (2554) ซึ่งไม่ได้ระบุสปีชีส์ ตัวอย่าง *Lentaria* sp. ที่รายงานมีขนาดสปอร์เท่ากับ 13.0-16.0 x 4.0-5.0 ไมโครเมตร พบในโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด (มูลนิธิชัยพัฒนา) จังหวัดจันทบุรี[21] ส่วนตัวอย่าง *Lentaria* sp. (PKWS15-164) ที่พบในการศึกษาครั้งนี้มีลักษณะและขนาดของสปอร์ใกล้เคียงกับ *L. bambusina* P.Zhang & Zuo H.Chen[74] แต่ต่างที่สีของดอกเห็ด จำนวนสเตอริกมาที่พบ รวมทั้งซิสทิเดีย จึงยังไม่สามารถระบุสปีชีส์ได้ นอกจากนี้ผลของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS แสดงค่าร้อยละความเหมือนสูงสุดกับ *L. bambusina* (Accession No. KU324496 และ KU870448) เท่ากับร้อยละ 93 ประกอบกับแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการแสดงการแยกกิ่งของ *Lentaria* sp. (PKWS15-164) ออกจาก *Lentaria* สปีชีส์อื่นๆ ด้วยค่าความเชื่อมั่นที่สูง เป็นการยืนยันว่า *Lentaria* sp. (PKWS15-164) น่าจะเป็นสปีชีส์ที่ต่างจากที่เคยมีรายงานมาก่อน ซึ่งรายงานจากประเทศไทยเป็นครั้งแรก ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ LSU และ ITS ของ *Ramaria*, *Phaeoclavulina* และ *Lentaria* ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ รวม 46 ข้อมูล (LSU 26 ข้อมูล และ ITS 20 ข้อมูล) เป็นการสร้างฐานข้อมูลของตัวอย่างเห็ดปะการังที่พบในประเทศไทย เพื่อใช้เทียบเคียงและเป็นแหล่งอ้างอิงในระดับชาติและนานาชาติต่อไปในอนาคต

จากการแยกเพาะเลี้ยงเชื้อเห็ดปะการังบริสุทธิ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ต่างกัน 3 ชนิด ได้แก่ Potato dextrose agar (PDA), Modified Norkarn's C (MNC)[65] และ Czapek's Dox agar[66] พบว่าไม่สามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์ได้ในการศึกษาครั้งนี้ อาจเนื่องมาจากเห็ดปะการังมีลักษณะเป็นกิ่งก้านที่มีขนาดเล็ก เปราะ แตกหักง่าย ทำให้แยกเนื้อเยื่อชั้นในออกมาเพาะเลี้ยงได้ยาก และเกิดการปนเปื้อนจากราชนิดอื่นได้ง่ายเพราะเส้นใยของเห็ดเจริญช้า ที่สำคัญไม่พบการเจริญของเส้นใยราจากสปอร์ นอกจากนี้อาจเนื่องมาจากชนิดของอาหารที่เพาะเลี้ยงซึ่งก่อนหน้านี้มีรายงานว่า *R. botrytis* สามารถแยกเพาะเลี้ยงได้บนอาหาร DTM (ประกอบด้วย glucose 20 กรัม, starch 30 กรัม, yeast extract 4 กรัม, soytone 2 กรัม, $MgSO_4$ 0.6 กรัม, $FeCl_2$ 0.2 มิลลิกรัม, pyridoxine 1 มิลลิกรัม, agar 15 กรัม ต่อปริมาตร 1 ลิตร, pH 5)[79] และมีรายงานอีกว่าการเพาะเลี้ยงเห็ดบางชนิดที่สามารถผลิตสารหรือเอนไซม์ ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญนั้นควรแยกเพาะเลี้ยงโดยใช้อาหารเหลวก่อนในเบื้องต้นซึ่งอาจใช้กระดาษกรองที่ปราศจากเชื้อช่วยในการพยุงเนื้อเยื่อดอกเห็ดไม่ให้จมลงในอาหาร และเมื่อสารต่างๆ ที่เห็ดผลิตออกมาในระยะแรกเจือจางในอาหารเหลวแล้ว จะทำให้เกิดการเจริญของเส้นใย เมื่อเส้นใยเห็ดเจริญจึงย้ายมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งต่อไป[80]

จากข้อมูลและชนิดของเห็ดได้คัดเลือกตัวแทนเห็ดปะการัง *Ramaria*, *Phaeoclavulina* และ *Lentaria* ที่มีจำนวนตัวอย่างเพียงพอ 10 ตัวอย่าง นำมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ

95 และตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท พบว่าได้สารสกัดจากตัวทำละลายเอทานอล (0.097 – 0.501 กรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) มากกว่าเอทิลอะซิเตท (0.013 – 0.135 กรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) เมื่อคำนวณต่อน้ำหนักแห้งของเห็ดเริ่มต้นที่เท่ากัน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Liu, et al. (2013) ที่ศึกษาสารสกัดจากเห็ด *R. flava* ที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ ได้แก่ เอทานอล, เอทิลอะซิเตท, ปิโตรเลี่ยม อีเทอร์, บิวทานอล และ น้ำ พบว่าสารสกัดจากเอทานอลให้ปริมาณสารสูงที่สุด รองลงมาคือ บิวทานอล, ปิโตรเลี่ยม อีเทอร์, น้ำ และเอทิลอะซิเตท ตามลำดับ[1] ทั้งนี้ขึ้นกับความมีขั้วของสารสกัดและสารจากเห็ดแต่ละชนิดที่สามารถละลายได้ในตัวทำละลายดังกล่าว สารสกัดเห็ดปะการังที่ได้นำไปทดสอบคุณสมบัติทางชีวภาพดังนี้ 1) คุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ 2) คุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ สารฟลาโวนอยด์ และสารประกอบฟีนอลทั้งหมด 3) คุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง 4) คุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ alpha-glucosidase และ alpha-amylase และ 5) คุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA reductase

คุณสมบัติของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์จำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bacillus subtilis* ATCC6633, *Escherichia coli* ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27813 และ *Staphylococcus aureus* ATCC25926 ด้วยวิธี agar well diffusion จากนั้นคำนวณหาค่า MIC และ MBC ด้วยวิธี MTT assay พบว่าสารสกัดจากเห็ด *Ramaria* ส่วนใหญ่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้อย่างน้อย 1 สายพันธุ์ ยกเว้นสารสกัดจาก *R.* aff. *flava* var. *aurea* (PKWS15-173) ที่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบได้ อาจเนื่องจากสารสกัดที่เตรียมได้ในการทดลองนี้มีความเข้มข้นต่ำที่สุดจึงไม่เพียงพอในการยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรียทดสอบ จากผลการทดลอง *S. aureus* ถูกยับยั้งได้มากที่สุด (MIC = 7.45 – 17.8 mg/mL) รองลงมาคือ *E. coli* (MIC = 9.3 – 33.6 mg/mL), *B. subtilis* (MIC = 7.5 – 18.6 mg/mL) และ *P. aeruginosa* (MIC = 7.5 - 17.8 mg/mL) นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดจากเอทานอลสามารถยับยั้งได้ดีกว่าสารสกัดจากเอทิลอะซิเตท อาจเนื่องจากความเข้มข้นของสารสกัดที่ได้จากเอทิลอะซิเตทมีปริมาณน้อยไม่เพียงพอในการยับยั้ง หรือชนิดของสารออกฤทธิ์ที่สามารถละลายได้ในเอทานอลมากกว่าเอทิลอะซิเตท หรือประสิทธิภาพการละลายของสารสกัดจากเอทิลอะซิเตทต่ำ หรือไม่มีสารออกฤทธิ์ในสารสกัดที่ได้ แม้ว่างานวิจัยของ Ramesh & Manohar (2010) ศึกษาสารสกัดจากเมทานอลของ *R. formosa* พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบได้หลายชนิด รวมทั้ง *S. aureus* และ *P. aeruginosa* มีค่า MIC เท่ากับ 2 mg/mL และ 3 mg/mL ตามลำดับ[40] ส่วนงานวิจัยของ Centko, et al. (2012) รายงานว่าสารสกัดจากเอทานอลของ *R. botrytis* สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *P. multocida*, *S. agalactiae* และ *S. pyogenes* ได้ และมีค่า MBC เท่ากับ 20, 20 และ 10 mg/mL ตามลำดับ[42] ส่วนสารสกัดเอทานอลจาก *R. flava* ที่รายงานโดย Liu, et al. (2013) ในการยับยั้งการ

เจริญของ *S. aureus*, *B. subtilis* และ *E. coli* พบว่ามีค่า MIC เท่ากับ 6.25, 25, 100 mg/mL ตามลำดับ[1] ในขณะที่ Han, et al. (2016) ทดสอบสารสกัดจากเห็ด *R. botrytis* ด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิด (อะซิโตน เอธิลอะซิเตท เอทานอล และ เมทานอล) และทดสอบคุณสมบัติในการต้านการเจริญของแบคทีเรียพบว่าสารสกัดด้วยเอธิลอะซิเตทสามารถต้านการเจริญของแบคทีเรียได้ 4 สายพันธุ์ คือ *Enterobacter cloacae*, *E. coli*, *P. aeruginosa* และ *S. aureus* รองลงมาคือ เอทานอล เมทานอล และอะซิโตน[43] จากข้อมูลที่อ้างอิงข้างต้นแสดงให้เห็นว่าคุณสมบัติของสารสกัดจาก *Ramaria* ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์นั้น ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์เห็ดและชนิดของตัวทำละลายในการสกัด อย่างไรก็ตามในประเทศไทยยังไม่มีรายงานการศึกษาสารสกัดจากเห็ดปะการังในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์มาก่อน ข้อมูลที่ได้นี้จึงเป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำไปพัฒนาขั้นตอนการสกัดและการทดสอบประสิทธิภาพต่อไป

คุณสมบัติของสารสกัดเอทานอลจากเห็ดปะการังในการต้านอนุมูลอิสระที่ทดสอบในการทดลองนี้มี 3 หลักการด้วยกัน คือ

1) วิธี DPPH และ ABTS radical scavenging activities เป็นหลักการทดสอบที่วัดความสามารถของสารสกัดในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของสารอนุมูลอิสระของ $DPPH^{\bullet+}$ และ $ABTS^{\bullet+}$ โดยการให้อิเล็กตรอนเพื่อยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาต่อเนื่อง วิธีนี้เป็นที่ยอมรับและนิยมใช้ในเกือบทุกการทดสอบสารต้านอนุมูลอิสระ ผลการทดสอบด้วยวิธี DPPH ของสารสกัดเห็ดปะการังมีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 0.009±0.001- 1.043±0.005 mg/mL ส่วนการทดสอบด้วย ABTS มีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 0.069±0.003- 6.001±0.060 mg/mL ซึ่งพบว่าสารสกัดจากตัวอย่าง *Lentaria* sp. (PKWS15-164) มีค่า IC_{50} ต่ำที่สุด และมีค่าไม่ต่างจาก positive control (BHT และ trolox) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในงานวิจัยของ Liu, et al. (2013) ในการทดสอบสารต้านอนุมูลอิสระของ *R. flava* ที่สกัดด้วยเอทานอลโดยวิธี DPPH พบว่ามีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.034±0.003 mg/mL[1] ซึ่งอยู่ในช่วงเดียวกับตัวอย่างที่ศึกษา และการศึกษาของ Aprotosoaie, et al. (2017) ในการทดสอบสารสกัดเอทานอลของ *R. largentii* ด้วยวิธี ABTS พบว่ามีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.0643±0.002 mg/mL[5] แม้ว่าการศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระจากเห็ดปะการังมีไม่มากนั้น แต่ผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าเห็ดกลุ่มนี้มีแนวโน้มในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดีได้

2) วิธี Ferrous ion chelating assay (หรือ chelating activity) อาศัยหลักการในการเป็นสารยับยั้งการแย่งจับอิเล็กตรอนของโลหะเหล็ก เนื่องจาก ferrous ions ในปฏิกิริยาทำให้เกิดอนุมูลอิสระของไฮดรอกซิล (OH) ซึ่งเป็นสารตัวกลางของไฮดรอกไซด์ ไอออน สามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นกับดีเอ็นเอทำให้เกิดมิวเตชั่นของยีน (gene mutation) ได้ดังนั้นการแย่งจับอิเล็กตรอนของโลหะ ferrous ions จึงมีบทบาทสำคัญในการลดการเกิดอนุมูลอิสระของไฮดรอกซิล[81] ในการทดลอง

นี้จึงเป็นการศึกษาคุณสมบัติของสารสกัดในการเป็น metal chelator เพื่อยับยั้งการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของ ferrous ion-ferrozine[82] เมื่อเทียบกับ positive control (EDTA) พบว่าสารสกัดของ *Lentaria* sp. (PKWS15-164), *P. cokeri* (PKWS15-194) *R.* aff. *vinosimaculans* (PKWS15-74) มีค่า IC_{50} ไม่ต่างจาก positive control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลการทดสอบของสารสกัดเอทานอลจาก *R. largentii* ด้วยวิธี Ferrous ion chelating assay มีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.497±0.006 mg/mL[5] ในขณะที่สารสกัดเมทานอลจาก *R. flava* มีค่า IC_{50} เท่ากับ 20 mg/mL[38] นอกจากนี้งานวิจัยของ Khatua, et al. (2015) ที่สกัดสารจากเห็ด *R. aurea* ด้วยสารละลายโพลีฟีนอล พบว่ามีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.95 mg/mL[83] เป็นต้น จากผลการทดสอบที่ได้นี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเห็ดปะการังมีประสิทธิภาพที่ดีในการเป็น metal chelator

3) การวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu's method เป็นการวัดทางอ้อม เนื่องจากสารประกอบฟีนอลบางชนิดมีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น ฟลาโวนอยด์ และ ฟีนอลลิก แอซิด ผลของปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดจากสารสกัดเห็ดปะการังมีค่าอยู่ในช่วง 5.756±0.247 ถึง 461.955±8.783 g GAE/g extract ซึ่งตัวอย่างที่มีค่าสูงที่สุดคือ *Lentaria* sp. (PKWS15-164), *P. cokeri* (PKWS15-194) แล *Ramaria* sp.3 (PKWS14-02) ตามลำดับ ในงานวิจัยของ Gursoy, et al. (2010) วัดปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดของ *R. flava*, *Rhizopogon roseolus* และ *Russula delica* ที่สกัดด้วยเมทานอลพบว่า *R. flava* มีปริมาณสูงที่สุดเท่ากับ 10.51 ug GAE/mg extract[38] ในขณะที่ Liu, et al. (2013) รายงานปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดของ *R. flava* จากการสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ พบว่าสารสกัดด้วยเอทานอลมีค่าเท่ากับ 12.95±0.41 mg GAE/g dry weight[1] เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดกับประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระพบว่ามีความสัมพันธ์กันคือตัวอย่างที่มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระสูง (มีค่า IC_{50} ต่ำ) จะมีปริมาณสารประกอบฟีนอลที่สูงด้วย ผลแสดงโดยกราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดกับประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระที่วัดด้วยวิธี DPPH (r^2 = 0.98), ABTS (r^2 = 0.94) และ Ferrous ion chelating assay (r^2 = 0.63) สอดคล้องกับงานวิจัย Vamanu; & Nita (2013) ที่ศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดกับสารต้านอนุมูลอิสระพบว่ามีความสัมพันธ์ไปในทางเดียวกัน เช่น การศึกษากราฟความสัมพันธ์ของสารประกอบฟีนอลทั้งหมดกับสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเห็ด *Boletus edulis* ด้วยวิธี ABTS มีค่า r^2 เท่ากับ 0.86 เมื่อสกัดด้วยเมทานอล และ r^2 เท่ากับ 0.94 เมื่อสกัดด้วยเอทานอล[84]

ส่วนผลการวัดปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัดเห็ดปะการังในการศึกษาครั้งนี้พบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 53.049±1.694 ถึง 3,909.517±58.556 g QE/g extract ซึ่งตัวอย่างที่มีค่าสูงที่สุดคือ *Lentaria* sp. (PKWS15-164), *P. cokeri* (PKWS15-194) และ *Ramaria*

sp.3 (PKWS14-02) ตามลำดับ สอดคล้องกับปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด ผลการวัดปริมาณฟลาโวนอยด์ที่ได้มีค่าค่อนข้างสูง เมื่อเทียบกับสารสกัดด้วยเมทานอลของ *R. flava* พบว่ามีปริมาณเท่ากับ 500 mg QE/mg extract[38] ส่วนการศึกษาสารสกัดจาก *R. subalpine* โดย Acharya, et al. (2017) พบว่ามีปริมาณสารฟลาโวนอยด์เท่ากับ 2,500±0.500 mg QE/mg extract นอกจากนี้ยังพบเบต้าแคโรทีน (0.0239±0.002 µg/mg extract), ไลโคปีน (0.0122±0.002 µg/mg extract) และแอสคอร์บิก แอซิด (0.083±0.007 µg/mg extract)[4] สารประกอบฟลาโวนอยด์มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ช่วยลดระดับคลอเลสเตอรอลในเลือด ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ และช่วยป้องกันการเกิดมะเร็ง[85]

คุณสมบัติในการต้านการเจริญของเซลล์มะเร็งของสารสกัดเห็ดปะการังจำนวน 3 ตัวอย่าง (*R.* aff. *vinosimaculans* (PKWS15-109), *Ramaria* sp.1 (PKWS15-95) และ *Lentaria* sp. (PKWS15-164) ที่สกัดด้วยเอทานอลและเอทิลอะซิเตท ซึ่งคัดเลือกไปทดสอบกับเซลล์มะเร็ง 3 ชนิด ได้แก่ มะเร็งเต้านม (MCF7-breast cancer) มะเร็งช่องปาก (KB-Oral cavity cancer) และ มะเร็งปอด (NCI-H187-small cell lung cancer) ในเบื้องต้นพบว่าไม่สามารถยับยั้งได้ แม้ว่าในงานวิจัยของ Liu, et al. 2013 รายงานว่าสารสกัดเอทานอลจาก *R. flava* มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 (IC_{50} = 66.54 µg/mL) รองลงมาคือเซลล์มะเร็งปอด NCI-H520 (IC_{50} = 134.44 µg/mL) และเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร BGC-803 (IC_{50} = 743.99 µg/mL) เมื่อทดสอบด้วยวิธี MTT assay[1] ส่วนสารสกัดจาก *R. flava* โดย Sadi, et al. (2016) พบว่าสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งตับ HepG2 ได้[48] รวมทั้งสารสกัดจาก *R. botrytis* คือ ubiquitin-like antitumor protein (RBUP) ซึ่งมีความเป็นพิษกับเซลล์มะเร็งพบว่าสามารถต้านการเจริญของเซลล์มะเร็งปอด A549 ได้ดี[49] อย่างไรก็ตามจากตัวอย่างที่ศึกษาในการทดลองนี้ไม่พบฤทธิ์ดังกล่าว อาจเนื่องจากสารที่สกัดได้ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งทดสอบ หรือมีปริมาณน้อยจนไม่สามารถยับยั้งได้

คุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ alpha-glucosidase และ alpha-amylase ของสารสกัดเอทานอลจากเห็ดปะการังพบว่ามีสารสกัดจากเห็ดเพียง 3 ชนิด ที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ alpha-glucosidase ได้ โดยเฉพาะ *Ramaria* sp.10 (PKWS15-181) (IC_{50} = 0.22 ±0.026 mg/mL) รองลงมาคือ *Phaeoclavulina cokeri* (PKWS15-194) (IC_{50} = 12.91 ±0.111 mg/mL) ซึ่งมีประสิทธิภาพดีกว่ายา acarbose (IC_{50} = 33.78 ±0.523 mg/mL) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ไม่มีสารสกัดจากเห็ดชนิดใดที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ alpha-amylase ได้ ส่วนยา acarbose สามารถยับยั้งได้ดีมีค่า IC_{50} = 3.51 ±0.018 mg/mL รายงานสารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ alpha-glucosidase และ alpha-amylase จากเห็ด *Ramaria* นั้นมีจำนวนน้อย ตัวอย่างเช่นสารสกัดเอทานอลของ *R. largentii* สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

alpha-glucosidase ได้ มีค่า IC_{50} = 8.6±0.1 µg/mL (acarbose มีค่า IC_{50} = 72.2±0.3 µg/mL)[84] นอกจากนี้มีรายงานว่าสารสกัดจากเห็ดกินได้ *Hericium erinaceus* มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ alpha-glucosidase ซึ่งพบว่าเป็นสารในกลุ่มพอลิแซคคาไรด์[87] Xu, et al. (2010) ได้ศึกษาสารสกัดพอลิแซคคาไรด์ จากเห็ด *Inonotus obliquus* ในหนูที่เป็นโรคเบาหวานโดยให้หนูกินสารสกัดปริมาณ 150 และ 300 mg/kg ของน้ำหนักตัว พบว่าสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ร้อยละ 16.64 และร้อยละ 20.09 (ในวันที่ 7) และร้อยละ 29.71 และร้อยละ 36.36 (ในวันที่ 21) ตามลำดับ[52] อย่างไรก็ตามคุณสมบัติของสารสกัดจากเห็ดปะการังที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ alpha-glucosidase ได้นี้มีแนวโน้มที่ดีในการพัฒนาต่อยอดเพื่อใช้ในการรักษาโรคระดับน้ำตาลในเลือดสูงได้ เนื่องจากเอนไซม์ชนิดนี้เป็นเอนไซม์สำคัญในกระบวนการเมแทบอลิซึ่มที่สามารถย่อยโอลิโกแซคคาไรด์เปลี่ยนเป็นน้ำตาลกลูโคสดังนั้นการยับยั้งหรือการชะลอการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าวจึงสามารถช่วยลดหรือชะลอการเพิ่มขึ้นของปริมาณน้ำตาลในเลือดได้[50]

คุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA reductase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในกระบวนการสังเคราะห์คอเลสเตอรอล ผลการทดสอบพบว่าสารสกัดส่วนใหญ่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ มีค่าร้อยละของการยับยั้ง (%inhibition rate) อยู่ในช่วง 13.13 – 97.98 ตัวอย่างที่มีอัตราการยับยั้งสูงที่สุด ได้แก่ *P. cokeri* (PKWS15-194) รองลงมาคือ *Ramaria* sp.2 (PKWS15-221) และ *Lentaria* sp. (PKWS15-164) ซึ่งมีค่าเท่ากับร้อยละ 97.98, 85.86 และ 72.73 ตามลำดับ ที่สำคัญสารสกัดจาก *P. cokeri* (PKWS15-194) มีอัตราการยับยั้งเอนไซม์ที่สูงกว่า positive control ชนิด pravastatin อีกด้วย แม้ว่าก่อนหน้านี้มีรายงานว่าสารสกัดจากเห็ด *Pleurotus sapidus*, *P. saca* และ *P. ostreatus* ที่สามารถผลิตสาร mevinolin มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA reductase ได้และเมื่อนำไปทดสอบกับหนูทดลองก็พบว่าสามารถลดระดับคอเลสเตอรอลได้ดี[86] อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้จากสารสกัดเห็ดปะการัง *Ramaria*, *Phaeoclavulina* และ *Lentaria* มาก่อน ซึ่งการยับยั้งเอนไซม์ HMG-CoA reductase จะช่วยลดระดับคอเลสเตอรอลได้ เช่นเดียวกับการทำงานของยาในกลุ่ม statins เช่น pravastatin, lovastatin และ simvastatin เป็นต้น

การวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลของสารสกัดเอทานอลจากเห็ดปะการังด้วยวิธี LC-ESI-MS โดยการแยกสารสกัดเบื้องต้นด้วยเทคนิค HPLC จากนั้นวิเคราะห์มวลโมเลกุลของสารที่แยกได้ด้วยเทคนิค ESI-MS โดยสารสกัดที่แยกผ่านคอลัมน์ HPLC แล้วจะทำให้สารเกิดการแตกตัวเป็นไอออน (electrospray ionization, ESI) และวัดค่ามวลต่อประจุ (m/z) ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้กำหนดให้สแกนหามวลโมเลกุลของสารที่มีขนาดระหว่าง 100-800 m/z แล้วเทียบค่ากับฐานข้อมูล massbank พบว่าสารสกัดเห็ดปะการังที่ทดสอบทุกตัวอย่างพบพีคของสารที่มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 416 – 416.1 m/z เมื่อ

เทียบกับฐานข้อมูล massbank พบว่ามีมวลโมเลกุลใกล้เคียงกับสาร puerarin (416.1036) ซึ่งมีรายงานว่ามีฤทธิ์ทางยาช่วยในการเพิ่มการไหลเวียนของหลอดเลือดหัวใจ ลดการก่อตัวของลิ่มเลือด และสาร ramipril (416) ซึ่งมีรายงานว่าเป็นกลุ่มยาใช้ในการรักษาโรคความดันโลหิตสูง นอกจากนี้ยังพบพีคของสารที่มีมวลโมเลกุลต่างๆ แตกต่างกันในแต่ละชนิดของสารสกัดเมื่อเทียบกับฐานข้อมูล massbank พบว่าใกล้เคียงกับสารต่างๆ ดังนี้ caffeic acid (180-180.1), dimethyluric acid (195), phenoxybenzoic acid (213.9-214), coumaric acid (146), methoxylcinamic acid (176.8-176.9), synaptic acid (222), protpchatechuic acid (152.9-153), 4,6-dimethyl-3(4'-hydroxyphenyl) coumarin (265) และ epichatechin (290) ซึ่งสารเหล่านี้มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ ชะลอวัย และต้านมะเร็ง[88] นอกจากนี้ยังพบพีคที่มีมวลโมเลกุลตรงกับสาร riboflavin (225.2) หรือ วิตามิน B_2 และ fusarenone (354.9) ซึ่งมีรายงานว่าเป็นสารทุติยภูมิที่พบในราอีกด้วย อย่างไรก็ตามผลที่ได้เป็นการเทียบเคียงกับฐานข้อมูล massbank เท่านั้นซึ่งต้องวิเคราะห์เปรียบเทียบกับสารบริสุทธิ์ หรือทำการแยกสารให้บริสุทธิ์แล้ววิเคราะห์จึงจะยืนยันผลได้อย่างถูกต้องแท้จริง แต่อย่างไรก็ตามสารสกัดที่วิเคราะห์พบสารประกอบฟีนอลจำนวนมากที่มีแนวโน้มเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดีและ/หรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจอีกด้วย

ดังนั้นจึงได้นำสารสกัดจากเห็ดปะการังมาวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลลิก แอซิด บางชนิดที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยเทียบกับสารมาตรฐาน 7 ชนิด ได้แก่ gallic acid, salicylic acid, valnilic acid, syringic acid, valnilin, coumaric acid และ benzoic acid ด้วยเครื่อง MRM-MS/MS พบว่าสารสกัดทุกตัวอย่างตรวจพบสารมาตรฐานทั้ง 7 ชนิด ในปริมาณที่แตกต่างกัน และผลรวมของสาร ฟีนอลลิก แอซิด ที่ตรวจวัดได้พบว่าสารสกัดจาก *P. cokeri* (PKWS15-194) มีปริมาณสูงที่สุด รองลงมาคือ *Lentaria* sp. (PKWS15-164) และ *Ramaria* sp.10 (PKWS15-181) สอดคล้องกับผลการวัดสารต้านอนุมูลอิสระ สารฟลาโวนอยด์ และสารประกอบฟีนอลทั้งหมด ในการทดลองก่อนหน้านี้เคยมีรายงานการศึกษาสารประกอบฟีนอลจากสารสกัดจากเห็ดกินได้ 4 ชนิด ได้แก่ *Phlebopus portentosus*, *Rugiboletus extremiorientalis*, *Russula emetic*, *Russula* sp. ด้วยเทคนิค HPLC เทียบกับสารมาตรฐานและวัดที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร พบสาร gallic acid, protocatechuic acid, catechin, vanillic acid, syringic acid, rutin, sinapic acid, ferulic acid, m-coumaric acid, rosmarinic acid, quercetin และ apigenin ในสารสกัดเห็ดแต่ละชนิดแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์[39] นอกจากนี้งานวิจัยของ Nowacka, et al. (2015) ศึกษาสารประกอบฟีนอลจากสารสกัดเห็ดจำนวน 31 ชนิด ด้วยวิธี LC-ESI-MS เทียบกับสารมาตรฐานพบสาร gallic acid, protocatechuic acid, gentisic acid, 4-OH-benzoic acid, vanillic acid, caffeic acid, syringic acid, coumaric acid, ferulic acid, salicylic acid, veratric acid, synaptic acid, 3-OH-cinnamic acid และ

rosmarinic acid[89] ซึ่งบางชนิดสอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้ และเมื่อไม่นานมานี้ Yahia, et al. (2017) ได้ศึกษาสารสกัดจากเห็ดป่ากินได้ในประเทศแมกซิโก รวมทั้ง *R. flava* ด้วยวิธี LC-ESI-MS พบสาร caffeic acid, malic acid, protocatechuic acid derivative, shikimic acid, vanillic acid desoxyhexoside, catequin hexosemalonate-carboxyl, sinapic acid และ isoramnethin ซึ่งส่วนใหญ่เป็นสารฟีนอลลิก แอซิด เช่นกัน[77]

ผลที่ได้จากงานวิจัยนี้นอกจากจะได้ฐานข้อมูลของเห็ดปะการังชนิดต่างๆ ที่เพิ่มขึ้นในประเทศไทยแล้ว ยังได้ฐานข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS และ LSU เพื่อใช้ในการระบุสปีชีส์ที่สามารถใช้เทียบเคียงและอ้างอิงของสายพันธุ์ที่พบในประเทศ รวมทั้งความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของชนิดเห็ดที่พบในประเทศไทยกับต่างประเทศ ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้พบ *Ramaria* ที่คาดว่าจะเป็นชนิดใหม่ของโลกอย่างน้อย 2 สปีชีส์และ *Lentaria* 1 สปีชีส์นอกจากนี้สารสกัดจากตัวแทนเห็ดปะการังที่ศึกษายังมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจได้แก่ สารต้านการเจริญของจุลินทรีย์ สารต้านอนุมูลอิสระ สารฟลาโวนอยด์ สารประกอบฟีนอล สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ alpha-glucosidase และ HMG-CoA reductase อีกด้วย

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

1. Lui K, Junli W, Le Z, Qian W. Anticancer, antioxidant and antibiotic of mushroom *Ramaria flava*. Food and Chemical Toxicology 2013;58:375-380.
2. Nasim G, Al M, Shabbir A. A study of genus *Ramaria* from Ayubia National Park, Pakistan. Mycopath 2008;6(1&2):43-46.
3. Brett DS, Karren DB, Katherine TA, Shahan K, Rohan AD. The discovery, synthesis and antimalarial evaluation of natural product-based polyamine alkaloids. Tetrahedron Letters 2013;54:5188-5191.
4. Acharya K, Das K, Soumitra P, Dutta AK, Hembrom ME, Khatua S, Parihar A. Exploring a novel edible mushroom *Ramaria subalpina*: chemical characterization and antioxidant activity. Pharmacognosy Journal 2017;9(1):30-34.
5. Aprotosoaie A, Clara Z, Daniela E, Mihai CT, Voichita G, Gherghel D, Silion M, Trifan A, Miron A. Antioxidant and antigenotoxic potential of *Ramaria largentii* Marr & D. E. Stuntz, a wild edible mushroom collected from Northeast Romania. Food and Chemical Toxicology 2017:1-9.
6. Corner EJH. Monograph of *Clavaria* and allied genera. London: Oxford University press; 2005. pp. 543-63.
7. แอมมณี มณีวัลย์. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางพันธุกรรมของเห็ดปะการัง (Coral fungi) ในเขตอุทยานแห่งชาติน้ำหนาว [วิทยานิพนธ์ วท.ม. จุลชีววิทยาทางการเกษตร]. ขอนแก่น: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2553.
8. Maneevun A, Jolyon D, Sanoamuang N. *Phaeoclavulina* and *Ramaria* (Gomphaceae, Gomphales) from Nam Nao National Park, Thailand. Tropical Natural History 2012;12(2):147-164.
9. นิวัฒ เสนาะเมือง. เห็ดป่าเมืองไทย : ความหลากหลายและการใช้ประโยชน์. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: หจก. ยูนิเวอร์แซล กราฟิค แอนด์ เทรนดิ้ง; 2553.
10. Wikipedia. Retrieved April 16, 2017 from https://en.wikipedia.org/wiki/Ramaria_flava#/media/File:AD2009Sep06_Ramaria_flava_01.jpg. 2009.
11. Ronald L. Exeter. Retrieved April 16, 2017 from http://www.mykoweb. com/CAF/species/Ramaria_formosa.html. 2014

12. David Noble. Retrieved April 16, 2017 from http://www.david-noble.net/ Tasmania/Reserve Apr14/ Acropolis2.html. 2014.
13. Daniel Winkler. Retrieved April 16, 2017 from http://mushroaming.com/ Bhutan_Mushrooms. 2009.
14. George Barron. Retrieved April 16, 2017 from https://atrium.lib.uoguelph.ca/xml ui/handle/10214/4188. 2012.
15. Agorastos Papatsanis. Retrieved April 16, 2017 from http://www. discoverwildlife.com/ gallery/fabulous-fungi-photo-gallery-agorastos-papatsanis. 2013.
16. Chandrasrikul A, Suwanarit P, Sandwanit U, Lumyong S, Payapanon N, Sanoamuang N, Pukahuta C, Petcharat V, Sardsud U, Duengkea K, Klinhom S, Thongkantha S, Thongklam S. Checklist of mushrooms (Basidiomycetes) in Thailand. 2nd ed. Bangkok: Integrated Promoting Technology Co., Ltd; 2011.
17. สำนักงานพัฒนาเศรษฐกิจจากฐานชีวภาพ (องค์การมหาชน). บัญชีรายการทรัพย์สินชีวภาพเห็ด. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: สำนักงานพัฒนาเศรษฐกิจจากฐานชีวภาพ (องค์การมหาชน); 2557.
18. ปรียาภรณ์ ดอกไม้. สังคมราเอคโตไมคอร์ไรซาในป่าสนผสมเต็งรัง และการทดสอบการสร้างไมคอร์ไรซาของราเอคโตไมคอไรซาชนิดกินได้ในสภาวะทดลอง. [ปริญญานิพนธ์ วท.ม. เทคโนโลยีชีวภาพ]. กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ; 2557.
19. Dokmai P, Phosri C, Khangrang R, Suwannasai N. Above-and below-ground ectomycorrhizal diversity in a pine-oak forest in northeastern Thailand. Chiang Mai Journal of Science 2015;42(1):79-87.
20. Giachini AJ, Hosaka K, Nouhra E, Spatafora J, Trappe JM. Phylogenetic relationships of the Gomphales based on nuc-25S-rDNA, mit-12S-rDNA, and mit-atp6-DNA combined sequences. Fungal Biology 2010;114:224-234.
21. วัชรพรรณ พลอามาตย์ และผู้แต่งคนอื่นๆ. ความหลากหลายของเห็ดในโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด (มูลนิธิชัยพัฒนา) ตำบลตกพรม อำเภอขลุง จังหวัดจันทบุรี. [ม.ป.ท.]. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; 2554.
22. Exeter RL, Norvell L, Cazares E. *Ramaria* of the Pacific Northwestern United States. 1st. Oregon: Salem district Bureau of Land Management; 2006.

23. อนงค์ จันทร์ศรีกุล, พูนพิลัย สุวรรณฤทธิ์, อุทัยวรรณ แสงวณิช, Morinaka T, Nishizawa Y, Murakami Y. ความหลากหลายของเห็ดราขนาดใหญ่ในประเทศไทย. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; 2551.
24. Dictionary of the Fungi. (2016). Retrieved April 16, 2017 from http://www.davidmoore.org.uk/21st_Century_Guidebook_to_Fungi_PLATINUM/Assets/Hyphal_differentiation_Resources.html (online)
25. Petersen RH. New or interesting Clavarioid fungi from Yunnan, China. Acta Botanica Yunnanica 1986;8(3):281-294.
26. Humpert AJ, Muench EL, Giachini AJ, Castellano MA, Spatafora JW. Molecular phylogenetics of *Ramaria* (Gomphales) and related genera: evidence from nuclear large subunit and mitochondrial small subunit rDNA sequences. Mycologia 2001;93:465-477.
27. Giachini AJ, Hosaka K, Nouhra E, Spatafora J, Trappe JM. Phylogenetic relationships of the Gomphales based on nuc-25S-rDNA, mit-12S-rDNA, and mit-atp6-DNA combined sequences. Fungal Biology 2010;114:224-234.
28. Petersen EJ, Henry TB, Zhao J, MacCuspie RI, Kirschling TL, Dobrovolskaia M, Hackley V, Xing B, White JC. Identification and avoidance of potential artifacts and misinterpretations in nanomaterial ecotoxicity measurements. Environmental Science and Technology 2014;48:4226-4246.
29. Wu H, Gao L, Yuan Z, Wang S. Life cycle assessment of phosphorus use efficiency in crop production system of three crops in Chaohu Watershed, China. Journal of Cleaner Production 2016;139:1298-1307.
30. Ka KH, Jeong SL, Park H. Ectomyycorrhizal formation of *Ramaria botrytis* using *Pinus densiflora* seedling. The Korean Journal of mycology 2009;37(1):111-113.
31. Nouhra ER, Horton TR, Cazares E, Castellano M. Morphological and molecular characterization of selected *Ramaria mycorrhizae.* Mycorrhiza 2005;15:55-59.
32. Colak A, Faiz Ö, Sesli E. Nutritional composition of some wild edible mushrooms. Turkish Journal of Biochemistry 2009;34(1):25-31.
33. บุหรัน พันธุ์สวรรค์. อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 2556;21:275-286.

34. Wikipedia. Retrieved April 20, 2017 from https://en.wikipedia.org/wiki/ antioxidant. 2017.
35. Siu K, Chen X, Wu J. Constituents actually responsible for the antioxidant activities of crude polysaccharides isolated from mushrooms. Journal of Functional Food 2014;11:548-556.
36. Zhang LF, Sun TT, Zou L. Extraction of total triterpenoids from *Inonotus baumii* and its inhibitory activity on breast cancer cells (MCF-7) *in vitro*. Drug Evaluation and Research 2015;38:497-502.
37. Liu XT, Winkler A, Schwan W, Volk T, Rott M, Monte A. Antibacterial compounds from mushrooms II. lanostane triterpenoids and an ergostane steroid with activity against *Bacillus cereus* isolated from *Fomitopsis pinicola*. Planta Medica 2010;76:464-466.
38. Zhang Z, Guoying LV, Huijuan P, Yongzhi WU, Leifa FAN. Effects of different during methods and extraction condition on antioxidant properties of Shiitake (*Lentinus edodes*). Food Science and Technology Research 2009;5:547-552.
39. Gursoy N, Sarikurkcu C, Tepe B, Solak MH. Evaluation of antioxidant activities of 3 edible mushrooms: *Ramaria flava* (Schaef.: Fr.) Quél., *Rhizopogon roseolus* (Corda) T.M. Fries., and *Russula delica* Fr. Food Science and Biotechnology 2010;19(3):691-696.
40. Kaewnarin K, Suwannarach N, Kumla J, Lumyong S. Phenolic profile of various wild edible mushroom extracts from Thailand and their antioxidant properties, anti-tyrosinase and hyperglycaemic inhibitory activities. Journal of Functional Foods 2016;27:352-364.
41. Ramesh Ch, Manohar G. Antimicrobial properties, antioxidant activity and bioactive compounds from six wild edible mushrooms of western ghats of Karnataka, India. Pharmacognosy Research 2010;2(2):107-112.
42. Alves MJ, Ferreira IC, Martins A, Pintado M. Antimicrobial activity of wild mushroom extracts against clinical isolates resistant to different antibiotics. Journal of Applied Microbiology 2012;113(2):466-475.
43. Centko RM, Ramón GS, Taylor T, Patrick BO, Thompson CJ, Miao VP, Andersen RJ. Ramariolides A-D, antimycobacterial butenolides isolated from the mushroom *Ramaria cystidiophora*. Journal of Natural Products 2012;75:2178-2182.

44. Han SR, Kim KH, Kim HJ, Jeong SH, Oh TJ. Comparison of biological activities using several solvent extracts from *Ramaria botrytis.* Indian Journal of Science and Technology 2016;9(41):1-6.

45. Chomcheon P, Kheawkum B, Sriwiset P, Dulsamphan S, Dulsamphan C. Antibacterial activity of crude extracts from edible mushrooms *Pleurotus citrinopileatus* and *Tricholoma crassum* Berk. Thai Journal of Pharmaceutical Sciences 2013;37:107-111.

46. Xue Z, Li J, Cheng A, Yu W, Zhang Z, Kou X, Zhou F. Structure identification of triterpene from the mushroom *Pleurotus eryngii* with inhibitory effects against breast cancer. Plant Foods for Human Nutrition 2015;70(3):291-296.

47. Zhang M, Cheung PCK, Chiu LCM, Wong EYL, Ooi VEC. Cell-cycle arrest and apoptosis induction in human breast carcinoma MCF-7 cells by carboxymethylated beta-glucan from the mushroom sclerotia of *Pleurotus tuber-regium*. Carbohydrate Polymers 2006;66:455-462.

48. Zheng L, Si J, Wong YS. Ergosterol peroxide and 9,11-dehydroergosterol peroxide from Ling Zhi or Reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (W. Curt.: Fr.) P. Karst. (Aphyllophoromycetideae) mycelia inhibit the growth of human breast adenocarcinoma MCF-7 cells. International Journal of Medicinal Mushrooms 2009;11(3):249-257.

49. Sadi G, Kaya A, Yalcin HA, Emsen B, Kocabas A, KIrtem DI, Altay A. Wild edible mushrooms from Turkey as possible anticancer agents on HepG2 cells together with their antioxidant and antimicrobial properties. International Journal of Medicinal Mushrooms 2016;18(1):83-95.

50. Zhou R, Han YJ, Zhang MH, Zhang KR, Ng TB, Liu F. Purification and characterization of a novel ubiquitin-like antitumour protein with hemagglutinating anddeoxyribonuclease activities from the edible mushroom *Ramaria botrytis*. AMB Express 2017;7(47):1-11.

51. Kiho T, Morimoto H, Kobayashi T, Ysai S, Ukai S, Aizawa K. Effect of a polysaccharide (TAP) from the fruiting bodies of *Tremella aurantia* on glucose metabolism in mouse liver. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 2000;64:417-419.

52. Xu X, Pang C, Yang CJ, Zheng YT, Xu HY, Lu ZM, Xu ZH. Antihyperglycemic and anti lipid peroxidative effects of polysaccharides extracted from medicinal mushroom Chaga, *Inonotus obliquus* (Pers.: Fr.) Pilát (Aphyllophoromycetideae) on alloxan-diabetes mice. International Journal of Medical Mushroom 2010;12:235-244.

53. Li PJ, Lei YL, Zhan H. The effects of the king oyster mushroom *Pleurotus eryngii* (higher basidiomycetes) on glycemic control in alloxan-induced diabeticmice. International Journal of Medicinal Mushrooms 2014;16(3):219-225.

54. Su CH, Lai MN, Ng LT. Inhibitory effects of medicinal mushrooms on alpha-amylase and alpha-glucosidase–enzymes related to hyperglycemia. Food and Function 2013;4(4):644-649.

55. Bae SM, Han SM, Lee YH, Jung YK, Ji JH, Lee JS. Extraction and characterization of an antihyperglycemic alpha-glucosidase inhibitor from edible mushroom, *Pleurotus cornucopiae.* Microbiology and Biotechnology Letters 2016;44(2):124-129.

56. Gunde-Cimerman N and Cimerman A. *Pleurotus* fruiting bodies contain the inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaral-Coenzyme A reductase-lovastatin. Experimental mycology 1995:19;1-6.

57. Kai W, Li B, Ke M, Jinjin Z, Baosong C, Junjie H, Jinwei R, Huajun L, Hongwei L. A novel class of alpha-glucosidase and HMG-CoA reductase inhibitors from *Ganoderma leucocontextum* and the anti-diabetic properties of ganomycin I in KK-A^{y} mice. European Journal of Medicinal Chemistry 2017:127;1035-1046.

58. Carlos F, Barbas I, Dennis RB, Jamie KS, Gregg JS. Quantitation of DNA and RNA. Cold Spring Harber Protocol 2007;47-48.

59. Tedersoo L, Jairus T, Horton BM, Abarenkov K, Suvi T, Saar I, Kõljalq U. Strong host preference of ectomycorrhizal fungi in a Tasmanian wet sclerophyll forest as revealed by DNA barcoding and taxon-specific primers. New Phytologist 180;2008:479-490.

60. White TJ, Bruns T, Lee S, Tayor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA gene for phylogenetics. San Diego: Academic Press; 1990.

61. Gardes M, Bruns TD. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes: application to the identification of mycorrhizae and rusts. Molecular Ecology 1993;2(2):113-118.

62. Vilgalys R, Hester M. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. Journal of Bacteriology 1990;712(8):4238-4246.

63. RBC bioscience. Retrieved November 01, 2017 from https://download.Rbc bioscience.com/RBC%20Cloning%20System/TA%20Cloning%20Vector/RBC%20TA %20 Cloning%20Vector%20Kit/RC001-RC013%20protocol%20V2.0.pdf. 2011.

64. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research 1994;22 (22):4673-4680.

65. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Sudhir K. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. molecular biology and evolution 2013;30(12):2725-2729.

66. Yamada A, Katsuya K. Mycorrhizal association of isolates from sporocarps and ectomycorrhizas with *Pinus densiflora* seedlings. Mycoscience 1995;36:315-323.

67. Murphy BR, Batke SP, Doohan FM, Hodkinson TR. Media manipulations and the culture of beneficial fungal root endophytes. International Journal of Biology 2015;7(3):1916-1967.

68. Sudha G, Vadivukkarasi S, Shree RBI, Lakshmanan P. Antioxidant activity of various extracts from an edible mushroom *Pleurotus eous*. Food Science and Biotechnology 2012;21(3):661-668.

69. Boonsong S, Klaypradit W, Wilaipun P. Antioxidant activities of extracts from five edible mushrooms using different extractants. Agriculture and Natural Resources 2016;50:89-97.

70. Tamil IG, Dineshkumar B, Nandhakumar M, Senthilkumar M, Mitra A. *In vitro* study on alpha-amylase inhibitory activity of an Indian medicinal plant, *Phyllanthus amarus*. Indian Journal of Pharmacology 2010;42(5):280-282.

71. Marr CD, Stunzt DE. *Ramaria* of west Washington. 1st ed. Leutershausen: Strauss & Cramer GmbH: 1973.

72. Petersen RH and Scates C. Vernally fruiting taxa of Ramaria from the Pacific northwest. Mycotaxa 1988;33:101-144.

73. Daniels PP and Perez-Gorjon S. Natas en Gomphales IV *Ramaria mediterranea*, nuevas citas para la peninsula iberica. Boletín de la Sociedad Micológica de Madrid 2009;33:75-79.

74. Li NL, Ling W, Zuo HC, Tolgor B, Ping Z. The species of *Lentaria* (Gomphales, Basidiomycota) from China based on morphological and molecular evidence. Mycological Progress 2017;16:605–612.

75. Zhou YX, Zhang H, Peng C. Puerarin: a review of pharmacological effects. Phytotherapy Research. 2014;28(7):961-975.

76. Ostergren J, Sleight P, Dagenais G, Danisa K, Bosch J, Qilong Y, Yusuf S. Impact of ramipril in patients with evidence of clinical or subclinical peripheral arterial disease. European Heart Journal 2004;(25)1:17–24.

77. Yahia EM, Gutiérrez OF, Moreno PMA. Identification of phenolic compounds by liquid chromatography-mass spectrometry in seventeen species of wild mushrooms in Central Mexico and determination of their antioxidant activity and bioactive compounds. Food Chemistry 2017(1);226:14-22.

78. Kirk PM, Cannon PF, Minter DW, Stalpers JA. *Dictionary of the Fungi.* 10th. Wallingford, UK: CAB International; 2008. pp. 368.

79. Lee TH and Han YH. Cultural Characteristics for the Enhanced Mycelial Growth of *Ramaria botrytis.* Mycobiology 2005;33(1):12–14.

80. Watling R. How to identify mushroom to genus V: cultural and developmental feature. 1st ed. California: Eureka printing: 1989.

81. Klaunig JE, Wang Z, Pu X, Zhou S. Oxidative stress and oxidative damage in chemical carcinogenesis. Toxicology and Applied Pharmacology 2011(254);2:86-99.

82. Tung Y, Wu J, Hsieh C, Chen P, Chang S. Free radical-scavenging phytochemicals of hot water extracts of *Acacia confuse* leaves detected by an on-line screening method. Food Chemistry 2009;115:1019-1024.

83. Khatua S, Mitra P, Chandra S, Acharya K. *In Vitro* Protective Ability of *Ramaria aurea* Against Free Radical and Identification of Main Phenolic Acids by HPLC. Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants 2015(4);21:380-391.
84. Vamanu E and Nita s. Antioxidant capacity and the correlation with major phenolic compounds, anthocyanin, and tocopherol content in various extracts from the wild edible Boletus edulis mushroom. BioMed Research International. 2013;2013:1-11.
85. Seleem D, Pardi V, Mendonca R, Murata M. Review of flavonoids: a diverse group of natural compounds with anti-*Candida albicans* activity *in vitro*. Archives of Oral Biology 2017;76:76-83.
86. Axinte DE. edible macromycetes from natural ecosystems: physico-chemical and biological studies [DOCTORAL THESIS SUMMARY]. 2016.
87. Chaiyasut C, Sivamaruthi BS. Anti-hyperglycemic property of *Hericium erinaceus* - A mini review. Asian Pacific journal of tropical tiomedicine 2017;7(11):1036-1040.
88. Gunde-Cimerman N, Plemenitas A, Cimerman A. *Pleurotus* fungi produce mevinolin, an inhibitor of HMG CoA reductase. FEMS Microbiological Letter 1993;113(3)
89. Nowacka N, Nowak R, Drozd M, Olech M, Los R, Malm A. Antibacterial, antir phenolic compound of thirty-one polish mushroom. PLOS ONE 2015;(10)1

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
สารเคมีและบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์

ภาคผนวก ก

สารเคมีและบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. 0.5X Tris borate (TBE) buffer

Tris borate buffer (TBE)	50	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น ปรับปริมารตสุดท้ายให้เท่ากับ	950	มิลลิลิตร

นำมาผสมกันจนสารละลาย TBE ละลายหมดแล้วบรรจุขวด

2. 1% Agarose

Agarose	1	กรัม
0.5X Tris borate (TBE) buffer	100	มิลลิลิตร

นำมาผสมกันแล้วให้ความร้อนจนผง agarose ละลาย

3. 10% KOH

Potassium hydroxide (KOH)	10	กรัม
น้ำกลั่น ปรับปริมารตสุดท้ายให้เท่ากับ	100	มิลลิลิตร

นำมาผสมกันจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกันแล้วบรรจุขวด

4. 10% KI

Potassium iodide (KI)	10	กรัม
น้ำกลั่น ปรับปริมารตสุดท้ายให้เท่ากับ	100	มิลลิลิตร

นำมาผสมกันจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกันแล้วบรรจุขวด

5. 0.1% Phosphoric acid

Phosphoric acid	1	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น ปรับปริมารตสุดท้ายให้เท่ากับ	1	ลิตร

นำมาผสมกันจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกันแล้วกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman® No.1 จากนั้นบรรจุใส่ขวด

6. 0.14 M Potassium persulfate

Potassium persulfate ($K_2S_2O_8$)	0.1892	กรัม
น้ำกลั่น ปรับปริมารตสุดท้ายให้เท่ากับ	5	มิลลิลิตร

นำมาผสมกันจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกันแล้วบรรจุขวดสีชา

7. 0.1 M Calcium chloride

Calcium chloride ($CaCl_2$)	11.1	กรัม
น้ำกลั่น ปรับปริมารตสุดท้ายให้เท่ากับ	100	มิลลิลิตร

นำมาผสมกันจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกันแล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วบรรจุขวดแล้วเก็บไว้ในที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

8. 0.1 M Calcium chloride + 15% glycerol

Calcium chloride ($CaCl_2$)	11.1	กรัม
Glycerol	15	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น ปรับปริมารตสุดท้ายให้เท่ากับ	100	มิลลิลิตร

สารละลายนี้จะแบ่งการเตรียมออกเป็น 2 ส่วน คือ 1. การเตรียมส่วนของ glycerol เข้มข้นร้อยละ 30 โดยเติม glycerol ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 35 มิลลิลิตร 2. การเตรียม calcium chloride เข้มข้น 0.2 โมลาร์ โดยเติม calcium chloride 11.1 กรัม ในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเทส่วนผสมที่ 1 และ 2 เข้าด้วยกัน นำมาผสมกันจนเป็นเนื้อเดียวกันแล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว บรรจุขวดแล้วเก็บไว้ในที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

9. 1:10 Folin-ciocalteu reagent

Folin-ciocalteu reagent	10	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น ปรับปริมารตสุดท้ายให้เท่ากับ	100	มิลลิลิตร

นำมาผสมกันจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกันแล้วบรรจุภาชนะทึบแสง

10. 0.7 M Na_2CO_3

Na_2CO_3	75	กรัม
น้ำกลั่น ปรับปริมารตสุดท้ายให้เท่ากับ	1	ลิตร

นำมาผสมกันจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกันแล้วบรรจุขวด

11. 1:10 $AlCl_3$ (w/v)

$AlCl_3$	1	กรัม
น้ำกลั่น ปรับปริมารตสุดท้ายให้เท่ากับ	10	มิลลิลิตร

นำมาผสมกันจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกันภายในตู้ดูดควัน เนื่องจากสาร $AlCl_3$ มีน้ำหนักเบา สามารถลอยฟุ้งออกมาจากขวดได้ และเมื่อผสมกับน้ำแล้วสารจะเกิดความร้อนสูงและเดือดได้

12. 1 M NaOH

NaOH	4	กรัม
น้ำกลั่น ปรับปริมารตสุดท้ายให้เท่ากับ	100	มิลลิลิตร

นำมาผสมกันจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกันแล้วบรรจุขวด

13. 5 mM *p*-Nitrophenyl-alpha-D-glucopyranoside (PNPG)

PNPG	0.0603	กรัม
น้ำกลั่น ปรับปริมารตสุดท้ายให้เท่ากับ	100	มิลลิลิตร

นำมาผสมกันจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกันแล้วบรรจุขวดสีชา

14. 2% Hexadecetyl trimethylammonium bromide (CTAB)

CTAB	4	กรัม
1 mM Tris (pH 8)	20	มิลลิลิตร
0.25 mM EDTA	16	มิลลิลิตร
NaCl	16.4	กรัม
polyvinylpyrrolidone (PVP)	4	กรัม
Beta-mercaptoethanol	20	ไมโครลิตร

ในการใช้งานจึงจะเติม Beta-mercaptoethanol

15. 7 mM 2,2′-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) solution

ABTS	0.0192	มิลลิกรัม

140 mM Potassium persulfate	88	ไมโครลิตร
น้ำกลั่น ปรับปริมารตสุดท้ายให้เท่ากับ	5	มิลลิลิตร

นำมาผสมจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกันในขวดที่มีการห่อด้วยกระดาษฟอยล์ จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 12-16 ชั่วโมง นำมาตรวจค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตโฟโตมิเตอร์ โดยปรับให้มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.7 ก่อนนำไปทดสอบ

16. 0.2 mM 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) solution

DPPH	7.9	มิลลิกรัม
Methanol ปรับปริมารตสุดท้ายให้เท่ากับ	100	มิลลิลิตร

นำมาผสมกันจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกันและเก็บไว้ในขวดที่มีการห่อด้วยกระดาษฟอยล์

17. Acetonitrile

Acetonitrile	1	ลิตร
Phosphoric acid	1	มิลลิลิตร

นำมาผสมกันจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกันแล้วกรองด้วยแผ่นกรองเมมเบรนเซลลูโลสอะซิเตท (cellulose acetate filter) จากนั้นบรรจุใส่ขวด

18. Melzer's reagent

Iodine	1.5	กรัม
Potassium iodide	5	กรัม
Chloral hydrate	100	กรัม
น้ำกลั่น ปรับปริมารตสุดท้ายให้เท่ากับ	100	มิลลิลิตร

นำส่วนผสมไปให้ความร้อนโดยห้ามเดือด จนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกันแล้วบรรจุขวดสีชา

19. 0.71 mM Gallic acid

Gallic acid	2.4	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น ปรับปริมารตสุดท้ายให้เท่ากับ	20	มิลลิลิตร

นำมาผสมกันจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกันแล้วบรรจุขวด

20. 2 mM Ferrous chloride

Ferrous chloride ($FeCl_2$)	25	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น ปรับปริมารตสุดท้ายให้เท่ากับ	100	มิลลิลิตร

นำมาผสมกันจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกันแล้วบรรจุขวด

21. 5 mM Ferrozine

Ferrozine	93	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น ปรับปริมารตสุดท้ายให้เท่ากับ	100	มิลลิลิตร

นำมาผสมกันจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกันแล้วบรรจุขวด

22. 1% Soluble starch

soluble starch	1	กรัม
น้ำกลั่น ปรับปริมารตสุดท้ายให้เท่ากับ	100	มิลลิลิตร

นำมาผสมกันและนำไปให้ความร้อนโดยเครื่องไมโครเวฟ จนกว่าน้ำแป้งจะมีลักษณะใสหรือจนกว่าสารละลายเป็นเนื้อเดียว รอให้เย็นตัวแล้วบรรจุขวด

23. 1 M Sodium phosphate buffer pH 6.9

Na_2HPO_4	54.0	กรัม
NaH_2PO_4	77.9	กรัม
น้ำกลั่น ปรับปริมารตสุดท้ายให้เท่ากับ	1	ลิตร

อัตราส่วนนี้เป็นอัตราส่วนที่ทำให้ 1 M Sodium phosphate buffer มีค่า pH 6.9 จากนั้นผสมให้เข้ากัน สามารถใช้ได้โดยไม่ต้องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดัน

24. 0.1 M Sodium phosphate buffer pH 6.9

Na_2HPO_4	5.40	กรัม
NaH_2PO_4	7.79	กรัม
น้ำกลั่น ปรับปริมารตสุดท้ายให้เท่ากับ	1	ลิตร

อัตราส่วนนี้เป็นอัตราส่วนที่ทำให้ 0.1 M Sodium phosphate buffer มีค่า pH 6.9 จากนั้นผสมให้เข้ากัน สามารถใช้ได้โดยไม่ต้องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดัน

25. 20 mM Sodium phosphate buffer pH 6.9 in 6mM NaCl

Na_2HPO_4	5.40	กรัม
NaH_2PO_4	7.79	กรัม
NaCl	0.35	กรัม
น้ำกลั่น ปรับปริมารตสุดท้ายให้เท่ากับ	1	ลิตร

อัตราส่วนนี้เป็นอัตราส่วนที่ทำให้ 1 mM Sodium phosphate buffer มีค่า pH 6.9 จากนั้นผสมให้เข้ากัน สามารถใช้ได้โดยไม่ต้องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดัน เนื่องจากสารมีความเข้มข้นต่ำ จึงต้องทำการเจือจาง buffer จากสต็อกที่มีความเข้มข้นสูง โดยใช้น้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร และ buffer 200 มิลลิลิตร และจากนั้นจึงทำการเติมเกลือ NaCl เป็นขั้นตอนสุดท้าย

26. 0.04 mM Quercetin

Quercetin	2.4	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น ปรับปริมารตสุดท้ายให้เท่ากับ	20	มิลลิลิตร

นำมาผสมกันจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกันแล้วบรรจุขวด

27. 0.1 g/ mL Streptomycin solution

Streptomycin	1	กรัม
น้ำกลั่น ปรับปริมารตสุดท้ายให้เท่ากับ	10	มิลลิลิตร

นำมาผสมกันจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกันแล้วกรองด้วย 0.22 µm filter

28. Dinitrosalicylic acid reagent

Dinitrosalicylate salt	5	กรัม
NaOH	8	กรัม
Sodium potassium tartrate	150	กรัม
น้ำกลั่น ปรับปริมารตสุดท้ายให้เท่ากับ	500	มิลลิลิตร

ทำการละลาย Dinitrosalicylate salt ใน 2M NaOH (8 กรัม) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 80-90 องศาเซลเซียส จากนั้น เติมสารละลาย Sodium potassium tartrate (150 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร) ในขณะที่สารละลายยังร้อน จากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 500 มิลลิลิตร บรรจุขวดสีชาหรือขวดที่มีการห่อฟอยด์เพื่อป้องกันแสง เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

29. 10 mM Trolox

Trolox	0.014	กรัม
น้ำกลั่น ปรับปริมารตสุดท้ายให้เท่ากับ	10	มิลลิลิตร

นำมาผสมกันจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกันแล้วบรรจุขวด

30. 0.12 mM 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium (MTT)

MTT	10	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น ปรับปริมารตสุดท้ายให้เท่ากับ	2	มิลลิลิตร

นำมาผสมกันจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกันแล้วบรรจุขวด

31. **น้ำกลั่นสำหรับ** HPLC

น้ำกลั่น	1	ลิตร
Phosphoric acid	0.1	มิลลิลิตร

นำมาผสมกันจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรให้เท่ากับ 10 ลิตร แล้วกรองด้วยแผ่นกรองเมมเบรนเซลลูโลสอะซิเตท จากนั้นบรรจุใส่ขวด

32. 10 mg/L Benzoic acid

Benzoic acid	0.01	มิลลิกรัม
เอทานอล ปรับปริมารตสุดท้ายให้เท่ากับ	10	มิลลิลิตร

กรองด้วย PTPE syringe filter แล้วบรรจุขวดสีชา

33. 10 mg/L Coumaric acid

Coumaric acid	0.01	มิลลิกรัม
เอทานอล ปรับปริมารตสุดท้ายให้เท่ากับ	10	มิลลิลิตร

กรองด้วย PTPE syringe filter แล้วบรรจุขวดสีชา

34. 10 mg/L gallic acid

Gallic acid	0.01	มิลลิกรัม
เอทานอล ปรับปริมารตสุดท้ายให้เท่ากับ	10	มิลลิลิตร

กรองด้วย PTPE syringe filter แล้วบรรจุขวดสีชา

35. 10 mg/L salicylic acid

Salicylic acid	0.01	มิลลิกรัม
เอทานอล ปรับปริมารตสุดท้ายให้เท่ากับ	10	มิลลิลิตร

กรองด้วย PTPE syringe filter แล้วบรรจุขวดสีชา

36. 10 mg/L syringic acid

Syringic acid	0.01	มิลลิกรัม
เอทานอล ปรับปริมารตสุดท้ายให้เท่ากับ	10	มิลลิลิตร

กรองด้วย PTPE syringe filter แล้วบรรจุขวดสีชา

37. 10 mg/L vanillic acid

Vanillic acid	0.01	มิลลิกรัม
เอทานอล ปรับปริมารตสุดท้ายให้เท่ากับ	10	มิลลิลิตร

กรองด้วย PTPE syringe filter แล้วบรรจุขวดสีชา

38. 10 mg/L vanillin

Vanillin	0.01	มิลลิกรัม
เอทานอล	10	มิลลิลิตร

กรองด้วย PTPE syringe filter แล้วบรรจุขวดสีชา

39. Solution I

Glucose	90.2	มิลลิกรัม
Tris-HCL	30.25	มิลลิกรัม
EDTA	29.2	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น ปรับปริมารตสุดท้ายให้เท่ากับ	10	มิลลิลิตร

นำส่วนผสมละลายเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรให้เท่ากับ 10 มิลลิลิตร แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน

40. **Solution II**

NaOH	8	มิลลิกรัม
SDS	2	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น ปรับปริมารตสุดท้ายให้เท่ากับ	10	มิลลิลิตร

นำส่วน แยกเป็น 2 ส่วน โดยละลายสารในน้ำกลั่นอย่างละ 5 มิลลิลิตร ละลายเนื้อเดียวกัน แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว จากนั้น เมื่อจะใช้งาน เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน และก่อนใช้งาน จึงค่อยเทส่วนผสมทั้ง 2 ผสมกัน

41. **Solution III**

Potassium acetate	29.46	กรัม
น้ำกลั่น ปรับปริมารตสุดท้ายให้เท่ากับ	88.5	มิลลิลิตร

นำส่วนผสมละลายเนื้อเดียวกัน ปรับ pH ด้วย galcial acetic acid ปริมาตร 22.5 มิลลิลิตร แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน

42. **3M sodium acetate**

Sodium acetate	24.6	กรัม
น้ำกลั่น ปรับปริมารตสุดท้ายให้เท่ากับ	100	มิลลิลิตร

นำส่วนผสมละลายเนื้อเดียวกัน ปรับ pH ด้วย galcial acetic acid แล้วค่อยปรับปริมาตรอีกครั้งให้ครบ 100 มิลลิลิตร ด้วยนน้ำกลั่น แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน

ภาคผนวก ข
อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

ภาคผนวก ข

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

1. **Potato dextrose agar (PDA)**

Potato dextrose agar	39	กรัม
น้ำกลั่น ปรับปริมารตสุดท้ายให้เท่ากับ	1	ลิตร

นำส่วนผสมไปให้ความร้อนจนวุ้นละลาย ปรับปริมาตรให้เท่ากับ 1 ลิตร แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว จากนั้นรอให้เย็นตัวลงประมาณ 50 องศาเซลเซียส แล้วจึงเติมยา streptomycin ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อลิตร

2. **Modified Norkrans's C agar (MNC)**

NH_4-Tartate	500	มิลลิกรัม
KH_2PO_4	1,000	มิลลิกรัม
$MgSO_4.7H_2O$	500	มิลลิกรัม
Glucose	10	กรัม
Casein hydrolysate	0.23	กรัม
Yeast extract	0.5	กรัม
Thiamine HCl	50	ไมโครกรัม
0.5 M $FeCl_3$	1	มิลลิลิตร
0.5 M $ZnSO_4$	1	มิลลิลิตร
Agar	15	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น ปรับปริมารตสุดท้ายให้เท่ากับ	1	ลิตร

ปรับ pH ให้มีค่าเท่ากับ 5.6-5.8 ก่อนเติมวุ้น นำส่วนผสมไปให้ความร้อนจนวุ้นละลาย ปรับปริมาตรให้เท่ากับ 1 ลิตร แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วหลัง จากนั้น รอให้เย็นตัวลงประมาณ 50 องศาเซลเซียส แล้วจึงเติมยา streptomycin ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อลิตร

3. Czapek's dox agar

Sucrose	30	กรัม
$NaNO_2$	2	กรัม
K_3PO_4	1	กรัม
$MgSO_4$	0.5	กรัม
KCl	0.5	กรัม
$FeSO_4$	0.01	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น ปรับปริมารตสุดท้ายให้เท่ากับ	1	ลิตร

ในการเตรียม จะผสมส่วนผสมทั้งหมดยกเว้น sucrose ในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ได้ 900 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปให้ความร้อนก่อนจะนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ส่วน sucrose นั้น จะทำการผสมกับน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ที่เหลือ แล้วนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เพื่อป้องกันการไหม้ของน้ำตาล จากนั้นนำทั้ง 2 ส่วน มาผสมกันด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ จากนั้นรอให้เย็นประมาณ 50 องศาเซลเซียส แล้วจึงเติมยา streptomycin ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อลิตร

4. Miller Luria Bertani Broth (LB broth)

Miller Luria Bertani media	21	กรัม
น้ำกลั่น ปรับปริมารตสุดท้ายให้เท่ากับ	1	ลิตร

นำส่วนผสมไปให้ความร้อนจนเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรให้เท่ากับ 1 ลิตร แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

5. Miller Luria Bertani Agar (LB Agar)

Miller Luria Bertani media	21	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น ปรับปริมารตสุดท้ายให้เท่ากับ	1	ลิตร

นำส่วนผสมไปให้ความร้อนจนเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรให้เท่ากับ 1 ลิตร แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

6. **Müller Hinton agar (MHA)**

Müller Hinton media	38	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น ปรับปริมารตสุดท้ายให้เท่ากับ	1	ลิตร

นำส่วนผสมไปให้ความร้อนจนเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรให้เท่ากับ 1 ลิตร แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

7. **Müller Hinton broth (MHB)**

Müller Hinton media	38	กรัม
น้ำกลั่น ปรับปริมารตสุดท้ายให้เท่ากับ	1	ลิตร

นำส่วนผสมไปให้ความร้อนจนเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรให้เท่ากับ 1 ลิตร แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

ภาคผนวก ค

วิธีการทดลองสำหรับชุดทดลองสำเร็จ (Kits) และการเตรียมอื่น ๆ

ภาคผนวก ค
วิธีการทดลองสำหรับชุดทดลองสำเร็จ (Kits) และการเตรียมอื่น ๆ

1. FAVOPREP™ genomic DNA extraction kit

การสกัดดีเอ็นเอผ่านชุดทดลองสำเร็จเริ่มจากการบดชิ้นเนื้อเยื่อให้ละเอียด จากนั้นเติมสาร FAPG1 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำเนื้อเยื่อที่บ่มไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์ที่ 11,239g เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูดสารละลายออกมาแล้วเติมสาร FAPG2 ปริมาตร 130 ไมโครลิตร และนำไปแช่เย็นที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงดูดส่วนของเหลวมากรองด้วย filter column จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,239g เวลา 2 นาที อีกครั้ง แล้วเก็บเอาส่วนของเหลวมาเติม FAPG3 ปริมาตร 1.5 เท่า ของของเหลวที่วัดปริมาตรได้แล้วนำไปกรองด้วย FAPG column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,239g เวลา 2 นาที และเก็บส่วนของ FGPG column ซึ่งมีดีเอ็นเออยู่มา ล้างดีเอ็นเอด้วย W1 buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 11,239 g เวลา 2 นาที และล้างด้วย wash buffer ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่เงื่อนไขเดิม จากนั้นเท wash buffer ทิ้ง แล้วปั่นแห่งต่ออีก 5 นาทีเพื่อกำจัด buffer ให้หมดไป และชะดีเอ็นเอด้วย elution buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

2. FAVOPREP™ purification mini kit

การทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ผ่านชุดทดลองสำเร็จเริ่มจากการนำ PCR products หรือชิ้นวุ้นที่มีแถบดีเอ็นเอ เติมสาร FADF ปริมาตรเป็น 5 เท่าของปริมาตรของเหลวทั้งหมด (ในกรณีที่ต้องการดีเอ็นเอผ่านชิ้นวุ้น จะเติมสาร FADF ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และต้องบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรือจนกว่าวุ้นจะละลายหมด) จากนั้นจึงดูดส่วนของของเหลวมากรองด้วย FADF column จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,239g เวลา 2 นาที เพื่อกำจัดส่วนที่เป็นของเหลวและเก็บส่วนของดีเอ็นเอที่อยู่ใน column จากนั้นล้างดีเอ็นเอด้วย wash buffer ปริมาตร 750 ไมโครลิตร และปั่นเหวี่ยงที่เงื่อนไขเดิม จากนั้นเท wash buffer ทิ้งแล้วปั่นแห้งต่ออีก 5 นาทีเพื่อกำจัด buffer ให้หมดไป และชะดีเอ็นเอด้วย elution buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร

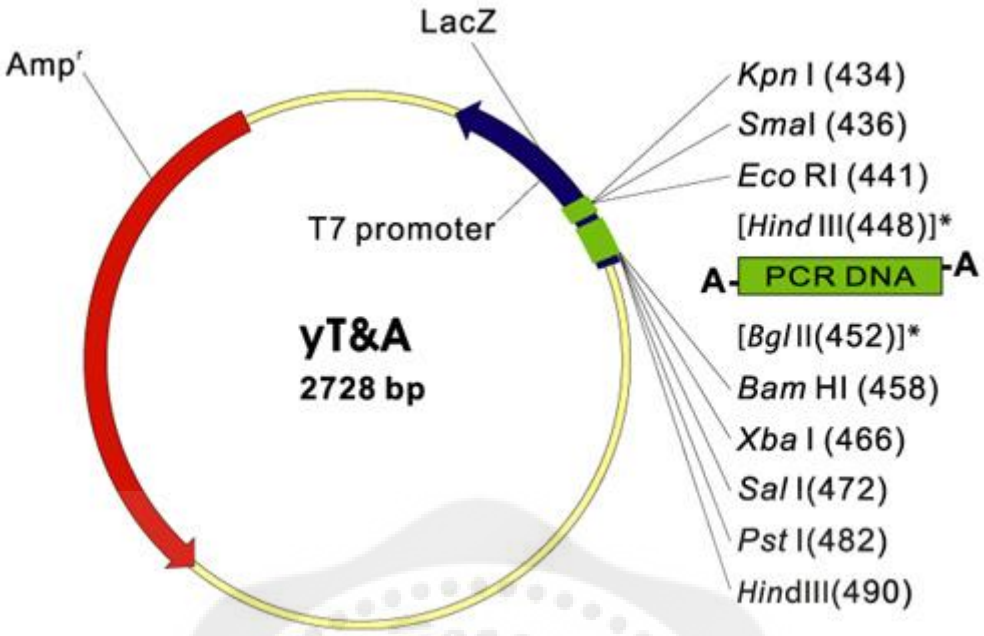
3. การเตรียมเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Top10 เจ้าบ้าน

เริ่มจากการเลี้ยงเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Top10 บนอาหารแข็ง Luria Bertani agar (LB agar) เพื่อให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 18 ชั่วโมง จากนั้น คัดเลือก 1 โคโลนีไปเลี้ยงในอาหารเหลว Luria Bertani broth (LB broth) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำมาขยายปริมาตร

โดยการถ่ายเชื้อ 200 ไมโครลิตร เลี้ยงในฟลาสก์ที่มี LB broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้น บ่มจนกว่าเชื้อมีการเจริญความขุ่นที่เหมาะสม ที่ 0.3-0.5 โดยวัดความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (0.5 Mcfarland standard) จากนั้นนำฟลาสก์ไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 1 ชั่วโมง และนำเชื้อไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เวลา 10 นาที เทส่วนอาหารทิ้ง จากนั้นเติมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 40 มิลลิลิตร เพื่อกำจัดผนังเซลล์ และทำการเขย่าเบาๆจนกว่าเซลล์จะละลายหมด แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เวลา 10 นาที อีกครั้ง เทสารละลายทิ้ง จากนั้นเติมสารละลายผสมที่ความเข้มข้นสุดท้ายต้องเป็น แคลเซียมคลอไรด์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์และกลีเซอรอล ร้อยละ 15 (v/v) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ทำการเขย่าเบาๆจนกว่าเซลล์จะละลายหมดอีกครั้ง และแบ่งใส่หลอดไมโครทูป ปริมาตร 100 ไมโครลิตร โดยในข้านตอนการเตรียมเซลล์เจ้าบ้านนั้น ทุกขั้นตอนต้องเตรียมในระบบที่เย็นเท่านั้น และจากนั้นเก็บเซลล์เจ้าบ้านไว้ในอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน

4. การเชื่อมดีเอ็นเอที่ต้องการกับเวคเตอร์ (Ligation)

ในการทดลองนี้ จะนำชิ้นดีเอนเอที่เป็นผลผลิตของการเพิ่มจำนวนบริเวณ ITS ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว จากนั้น เติมสารต่างๆที่เป็นสารประกอบในชุดทดลอง ดังนี้ Ligation buffer A ปริมาตร 1ไมโครลิตร Ligation buffer B ปริมาตร 1 ไมโครลิตร PCR product (DNA insert) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร RBC TA cloning vector ปริมาตร 4 ไมโครลิตร T_4 DNA ligase ปริมาตร 1 ไมโครลิตร RNase free water (ปราศจากเชื้อ) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร จากนั้นกวนสารให้เข้ากับโดยปลายทิป และบ่มในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศา เป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อนนำมาถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน



ภาพประกอบ 36 TA cloning vector แสดงตำแหน่งที่มีการแทรกชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการ

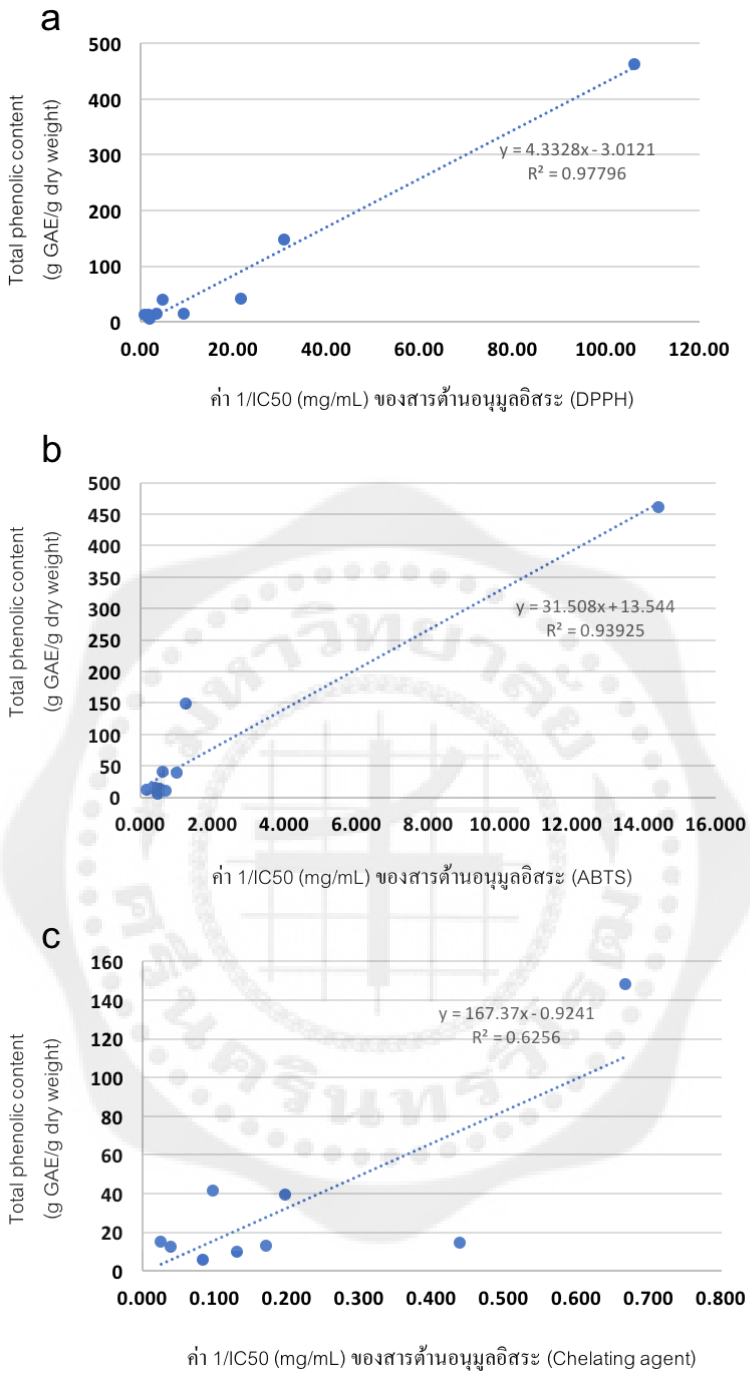
ที่ ม า : RBC bioscience (2011). November 01, 2017 from https://download.rbcbioscience.com/RBC%20Cloning%20System/TA%20Cloning%20Vector/RBC%20TA%20Cloning%20Vector%20Kit/RC001-RC013%20protocol%20V2.0.pdf[70]

5. การสกัดพลาสมิด

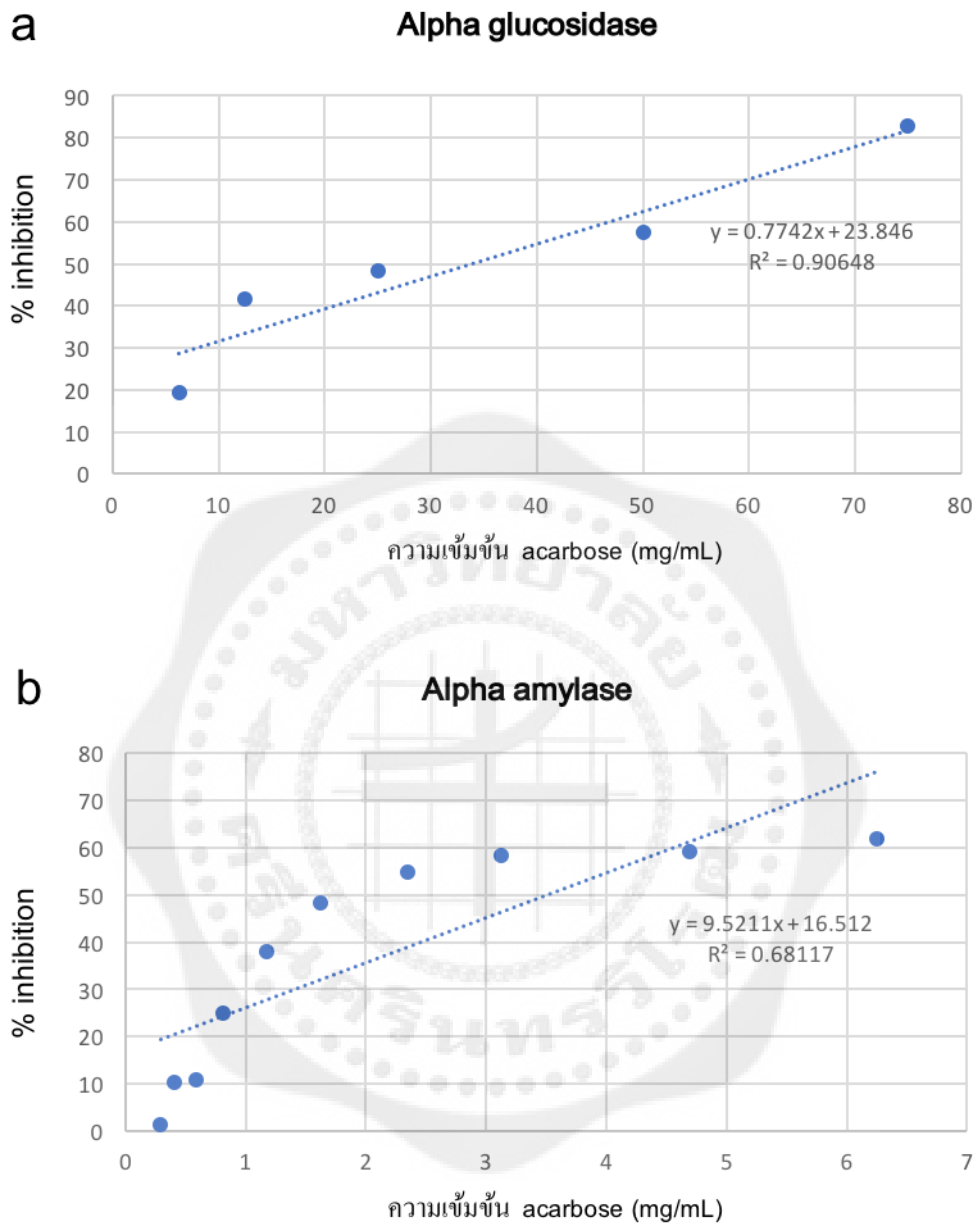
ในการสกัดพลาสมิด มีสารละลายที่มีความจำเป็น 3 ชนิด คือ solution I, solution II และ solution III (ภาคผนวก ก) เริ่มจากการนำเชื้อรีคอมบิแนนท์โคลนที่ผ่านการคัดเลือกโดย blue white screening และเลี้ยงในอาหารเหลว Miller Luria Bertani broth (LB broth) เก็บเซลล์เชื้อโดยการปั่นเหวี่ยงโดยความเร็ว 5000 รอบต่อนาที เวลา 5 นาที เทอาหารทิ้งแล้วเติม solution I ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ก่อนนำหลอดที่มีตะกอนเชื้อไปเขย่า (vortex) จนกว่าเชื้อจะกระจายตัวดี จากนั้นเติม solution II ปริมาตร 200 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเบาๆ จนกว่าสารละลายในหลอดมีลักษณะใสและเหนียวยืด ขั้นตอนนี้จะมีการแตกของเซลล์แบคทีเรีย ทำให้สารภายในเซลล์ไหลออกมาภายนอก เมื่อสารละลายใสดีแล้ว ทำการเติม solution III ปริมาตร 150 ไมโครลิตร และแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 3-5 นาที เพื่อแยตะกอนเซลล์ออก จากนั้นปั่นเหวี่ยงโดยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เวลา 15 นาที เพื่อแยกส่วนของของเหลวและตะกอนเซลล์โดยกดูดส่วนของของเหลวด้วยปิเปต จากนั้นเติม Phenol: chlorofrom: isopropanol ปริมาตร 400 ไมโครลิตร เขย่า (vortex) จนกว่าสารละลายจะเข้ากัน

จากนั้นปั่นเหวี่ยงโดยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เวลา 5 นาที แล้วดูดเก็บเฉพาะส่วนใสด้านบน พร้อมวัดปริมาตร จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมอะซิเตท เข้มข้น 3 โมลาร์ ปริมาตร 1/10 เท่าของของเหลวที่วัดปริมาตรได้ และ ไอโซโพรพานอลที่เย็น ปริมาตร 10 เท่าของปริมาตรของเหลวทั้งหมด จากนั้นกลับหลอดไปมาแล้วปั่นเหวี่ยงโดยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เวลา 15 นาที เมื่อครบเวลาเทส่วนของของเหลวทิ้ง และเติมเอทานอลที่เย็นเข้มข้นร้อยละ 70 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร จากนั้นปั่นเหวี่ยงได้ทันทีโดยไม่ต้องกลับหลอดไปมาโดยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เวลา 15 นาที จากนั้นเทของเหลวภายในหลอดทิ้งและผึ่งให้ดีเอ็นเอแห้งเป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง และเก็บดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส

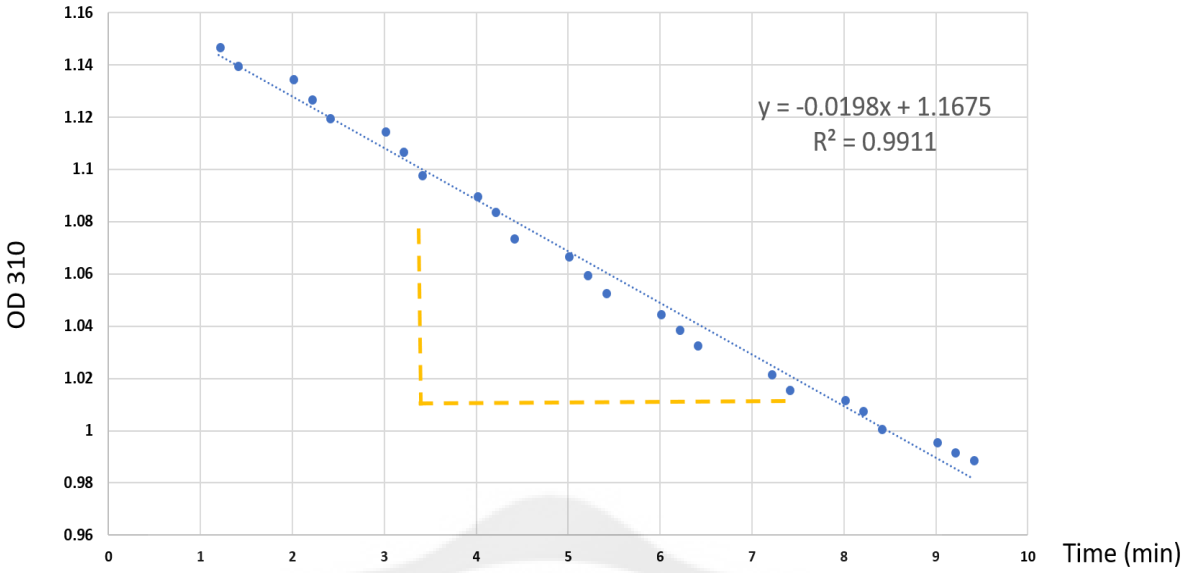
ภาคผนวก ง
กราฟมาตรฐาน



ภาพประกอบ 37 กราฟความสัมพันธ์ของสารประกอบฟีนอลทั้งหมดกับคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ a) การทดสอบด้วยวิธี DPPH, b) การทดสอบด้วยวิธี ABTS และ c) การทดสอบด้วยวิธี Ferrous ion chelating assay



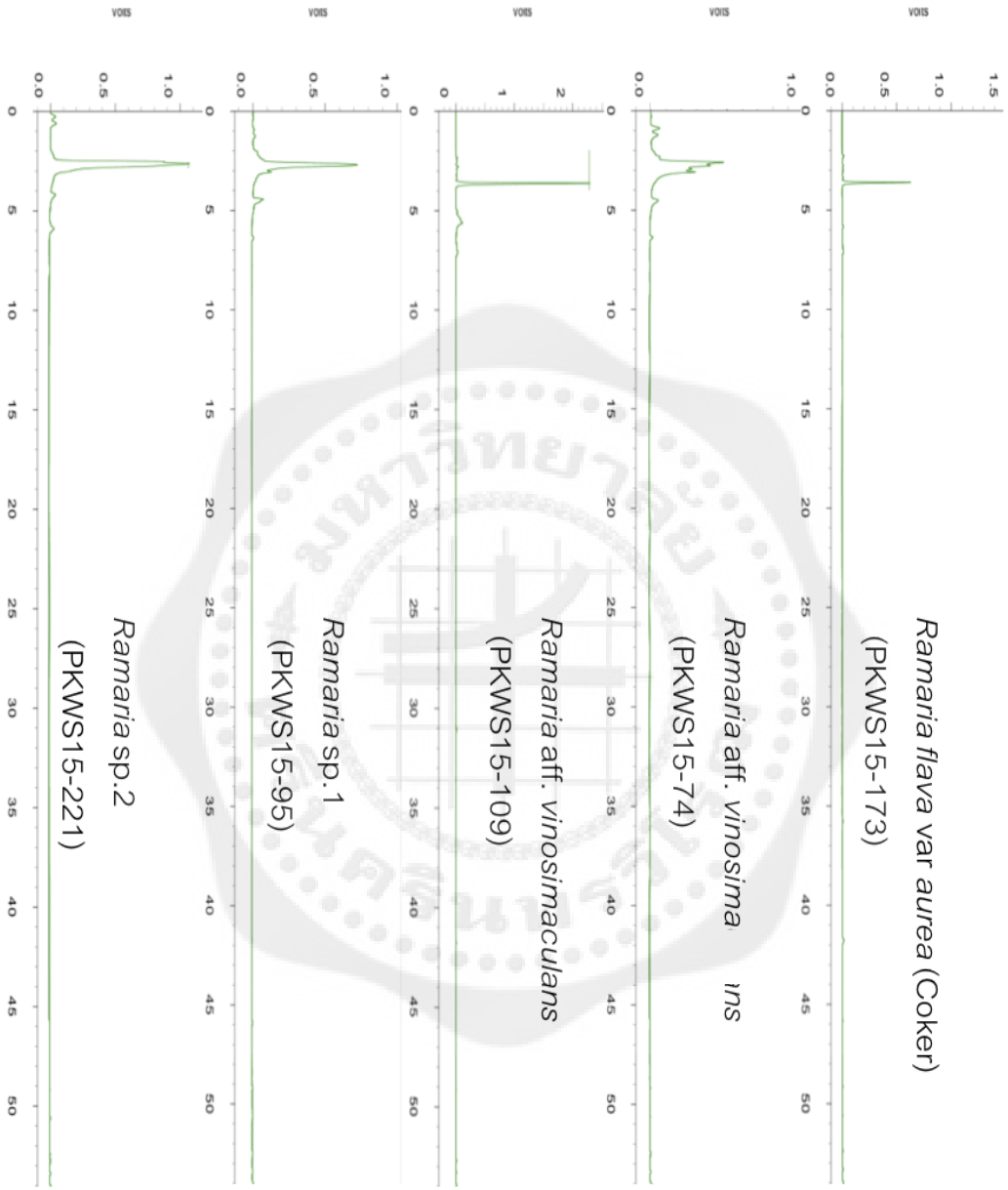
ภาพประกอบ 38 กราฟผลการวิเคราะห์ของสาร acarbose a) การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ alpha glucosidase และ b) การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ alpha amylase

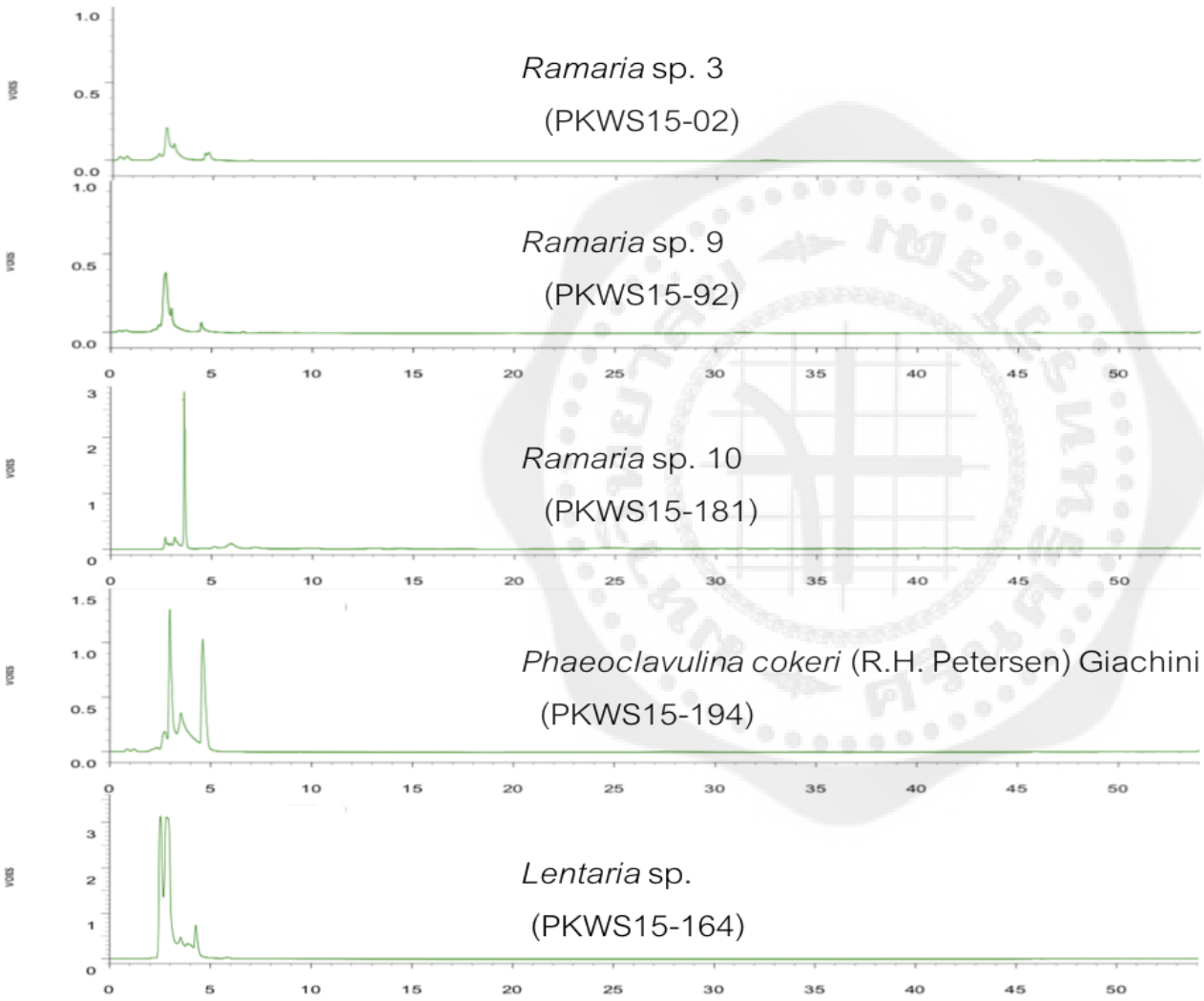


ภาพประกอบ 39 กราฟการทำงานของเอนไซม์ HMG CoA reductase

ภาคผนวก จ
ผลการวิเคราะห์สารสกัดด้วยเทคนิค HPLC และ LC-MS

ผลการวิเคราะห์สารสกัดด้วยเทคนิค HPLC

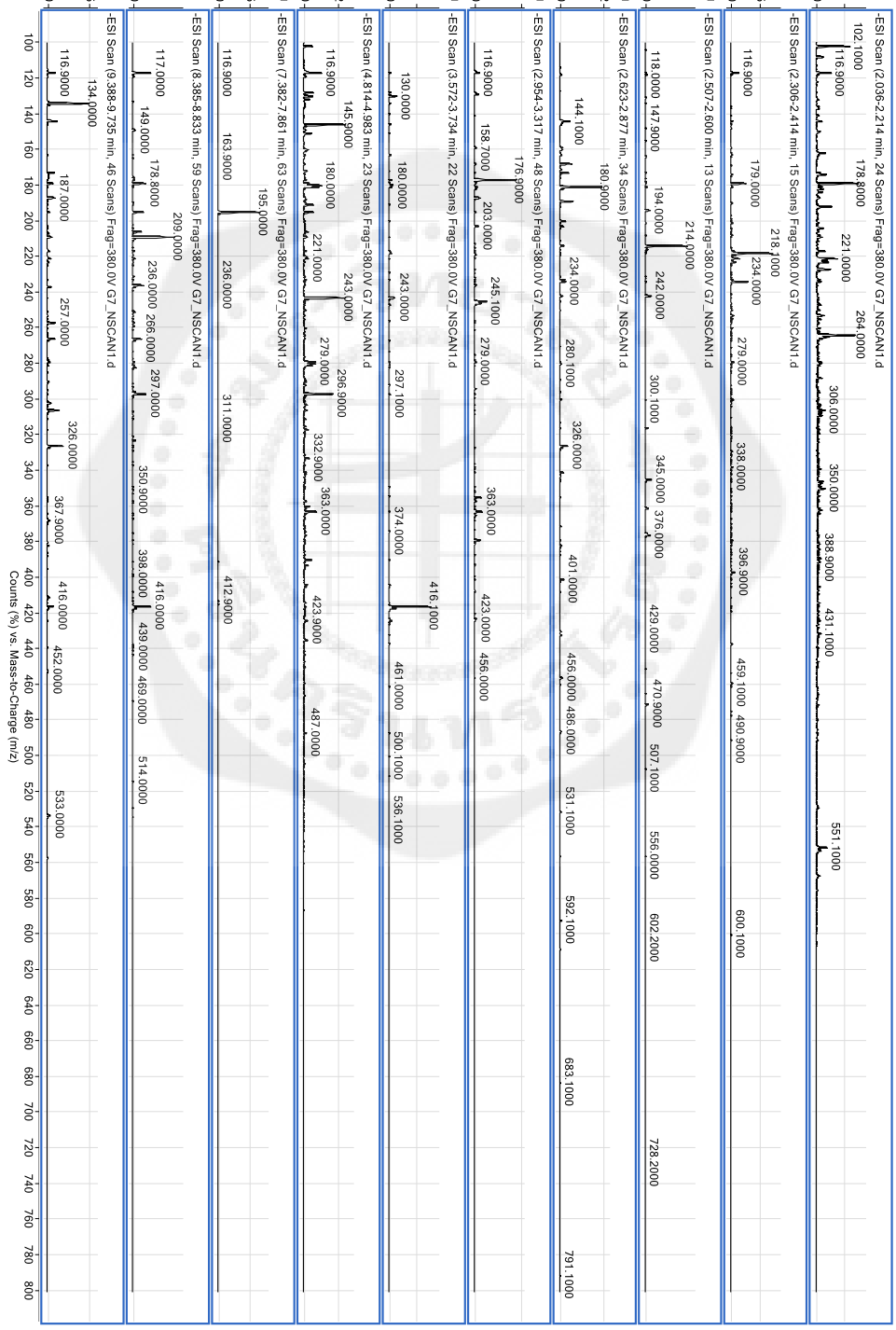



Ramaria sp. 3
(PKWS15-02)
Ramaria sp. 9
(PKWS15-92)
Ramaria sp. 10
(PKWS15-181)
Phaeoclavulina cokeri (R.H. Petersen) Giachini
(PKWS15-194)
Lentaria sp.
(PKWS15-164)

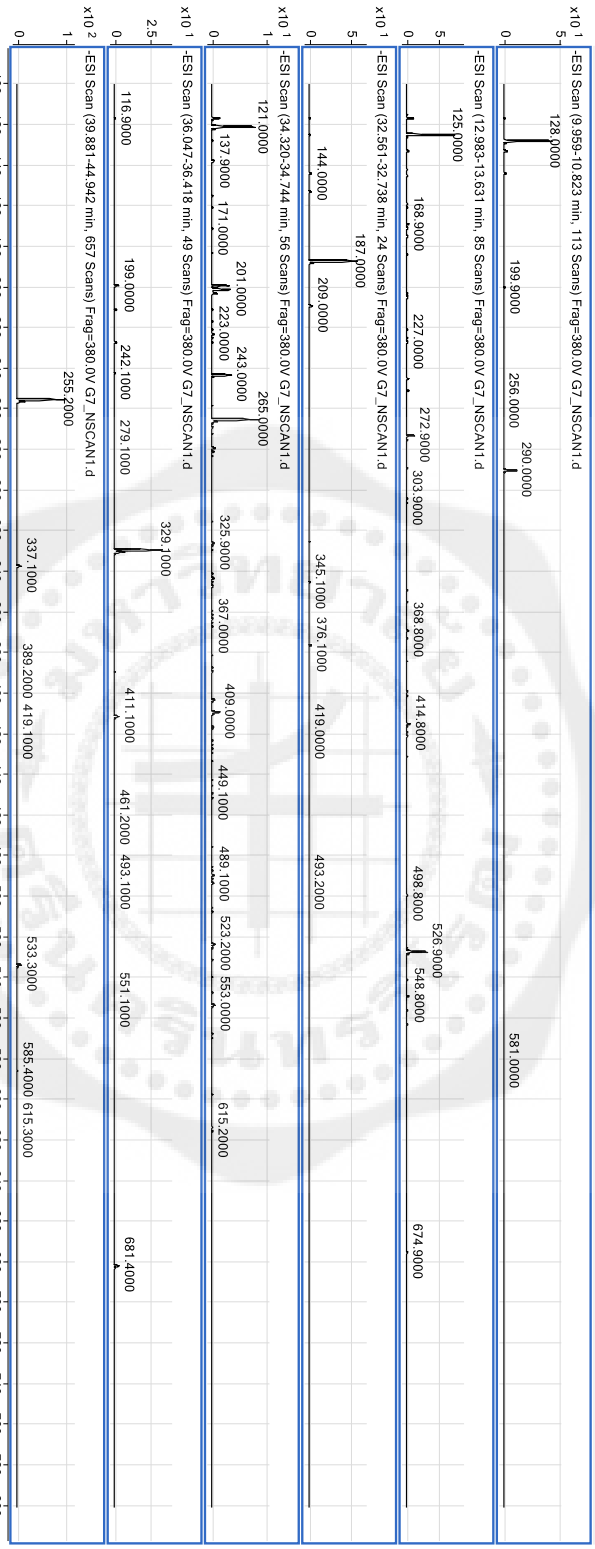
ผลการวิเคราะห์สารสกัดด้วยเทคนิค LC-ESI-MS

ในการทดลองนี้จะคัดเลือกการแสดงออกของพีคที่มีค่าสูงจำนวน 10 พีคในแต่ละตัวอย่าง เพื่อทำการเปรียบเทียบค่ามวลประจุ(*m/z*) กับฐานข้อมูล massbank

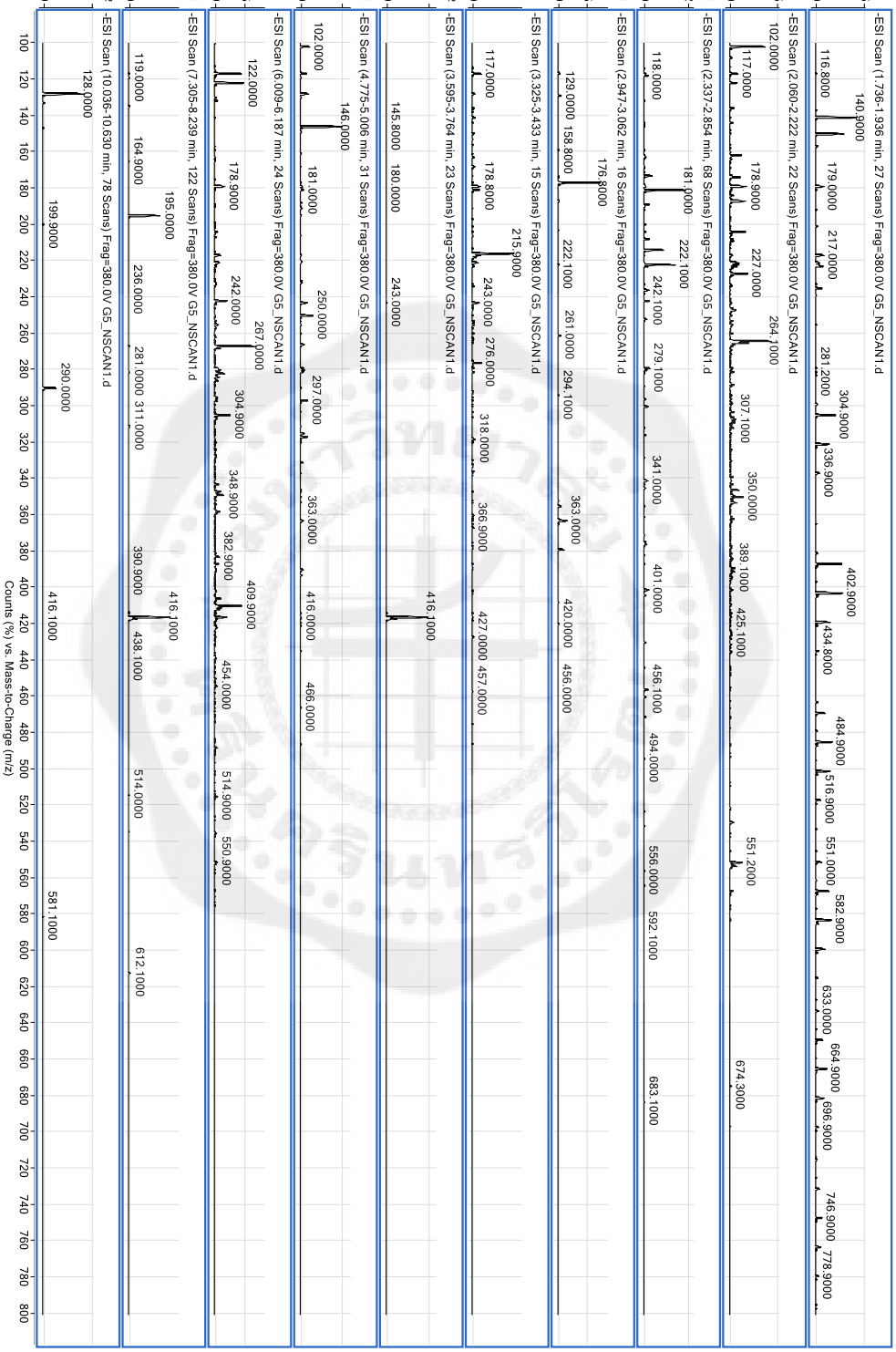
Ramaria flava var *aurea* (Coker) (PKWS15-173)



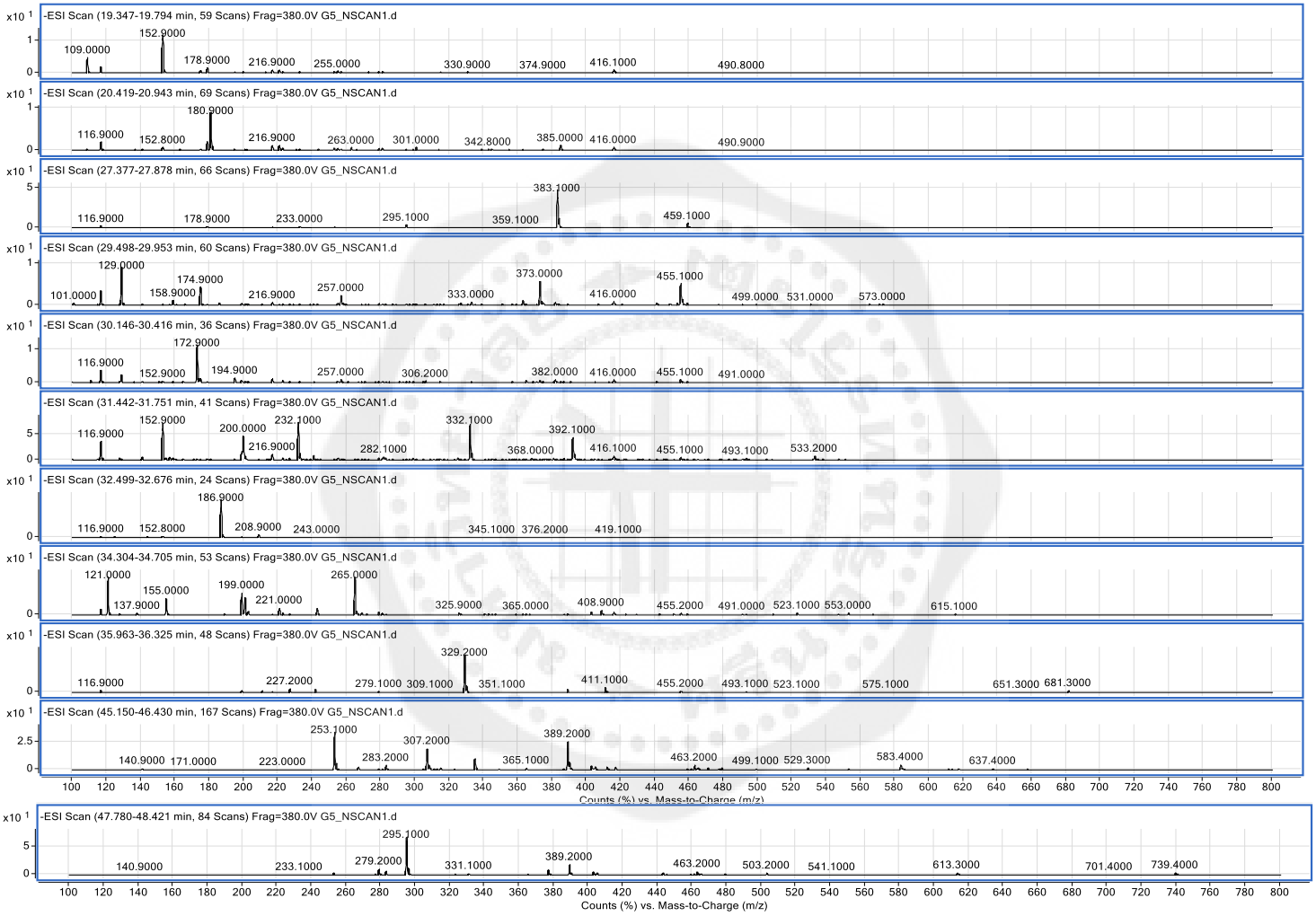
Ramaria flava var *aurea* (Coker) (PKWS15-173) (ต่อ)



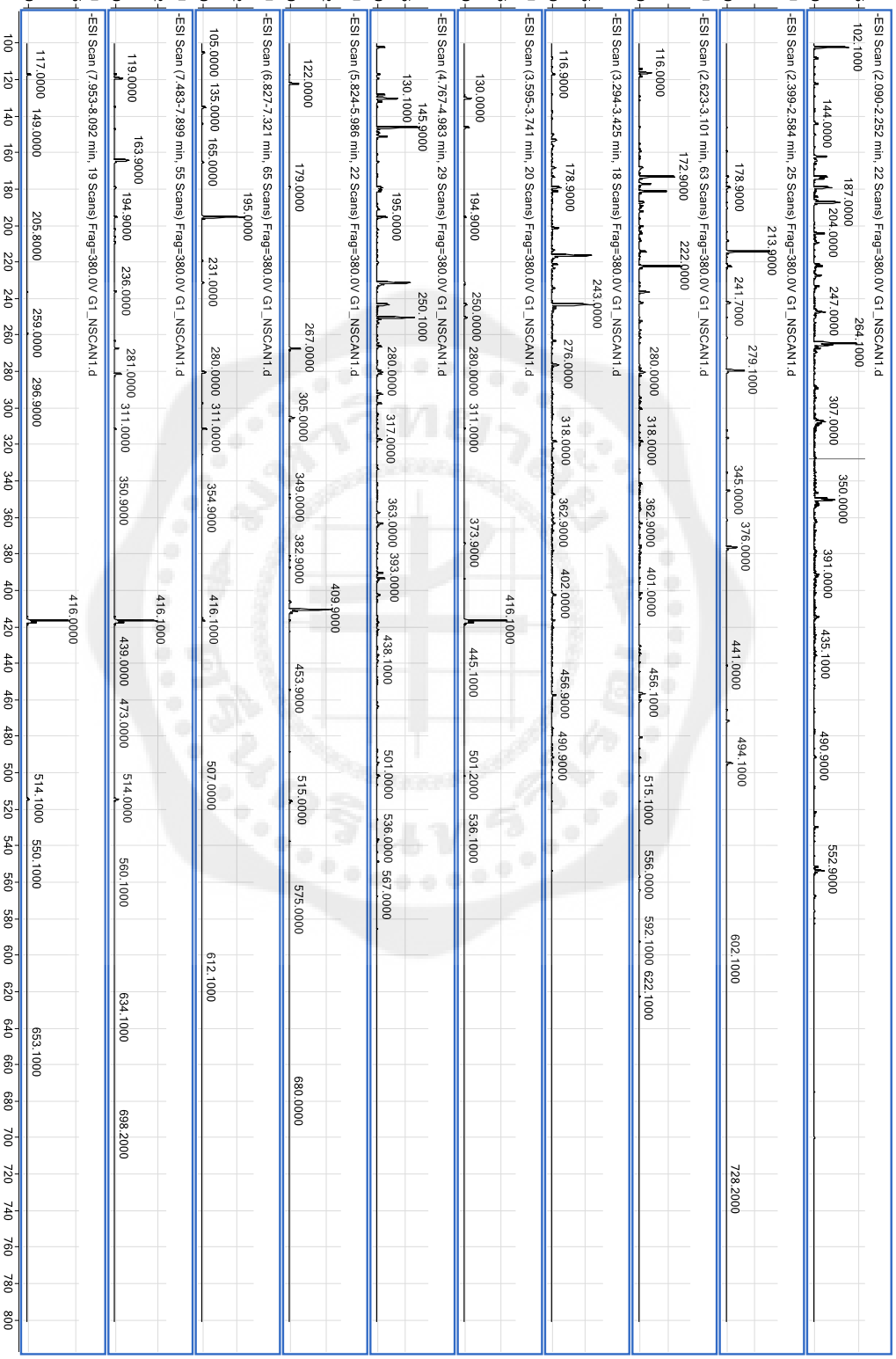
Ramaria aff. *vinosimaculans* (PKWS15-74)



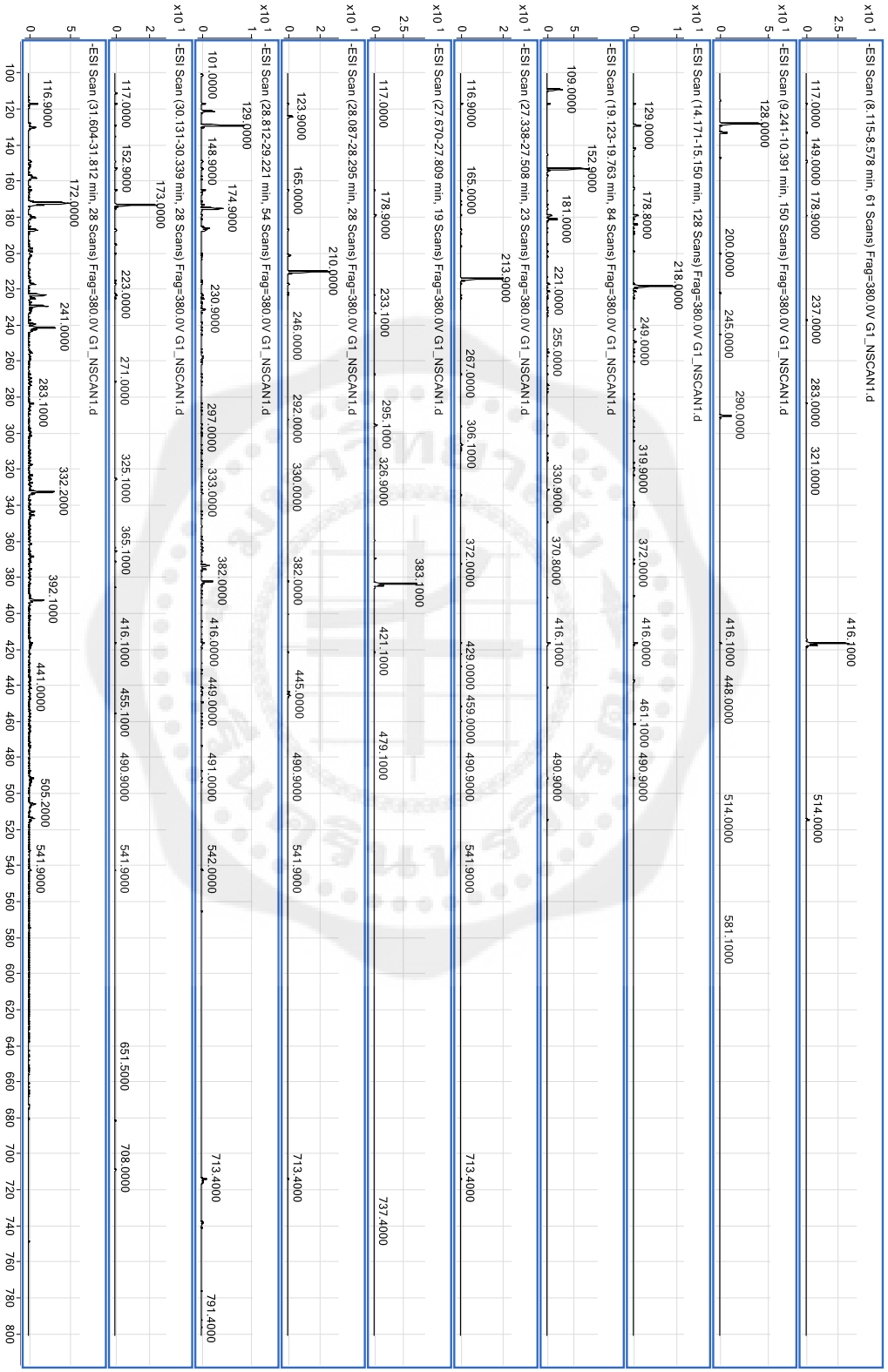
Ramaria aff. *vinosimaculans* (PKWS15-74) (ต่อ)



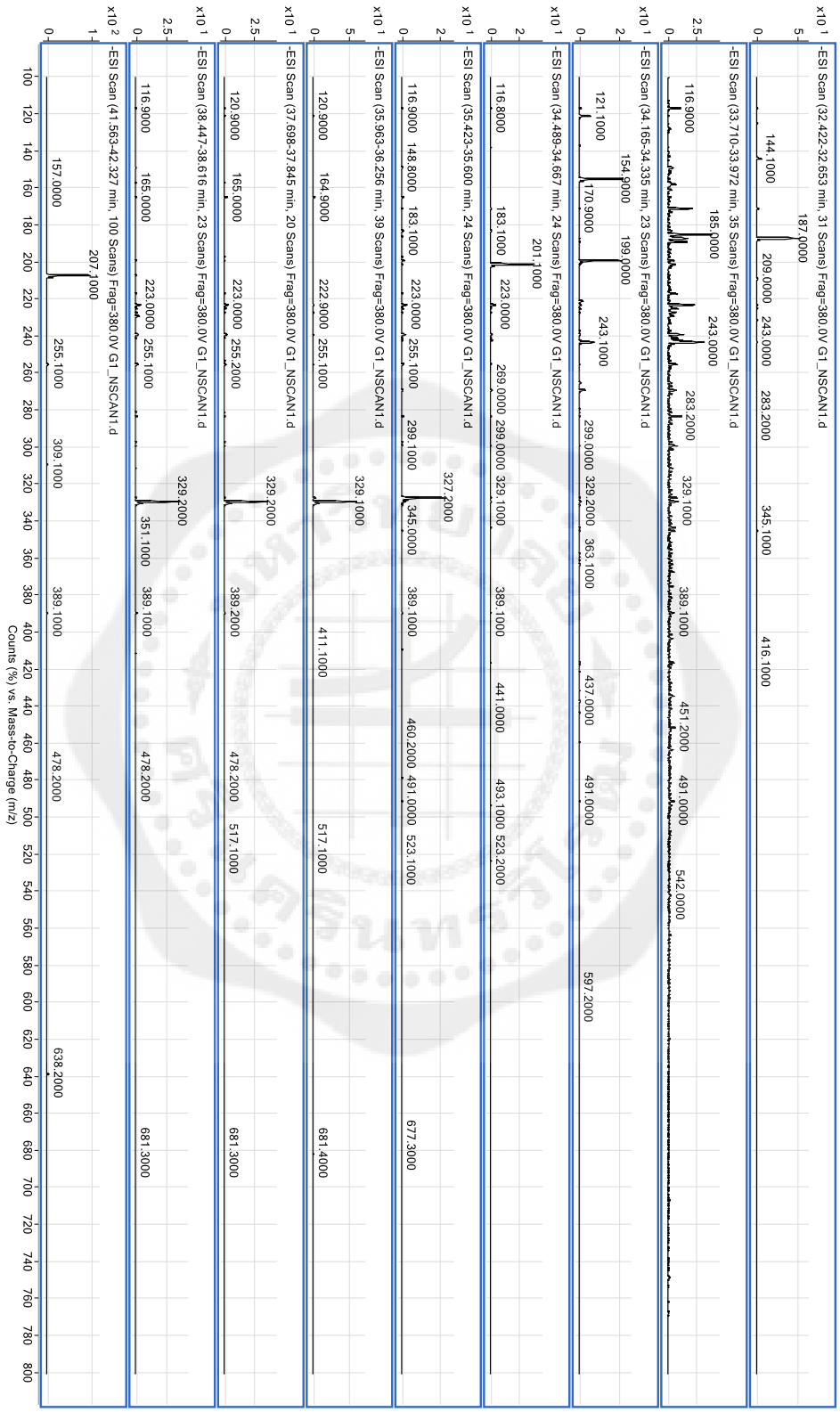
Ramaria aff. *vinosimaculans* (PKWS15-109)

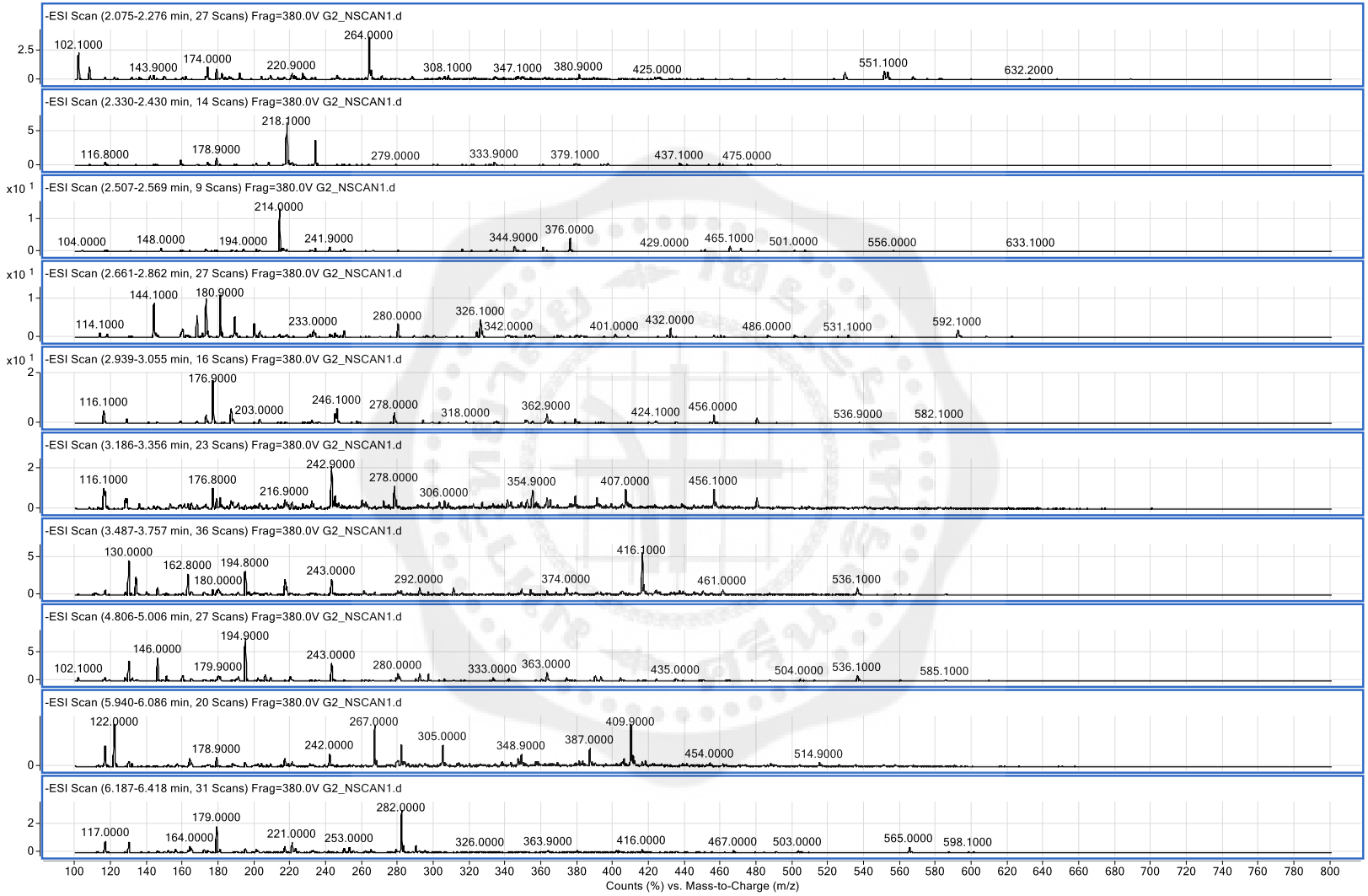


Ramaria aff. *vinosimaculans* (PKWS15-109) (ต่อ)



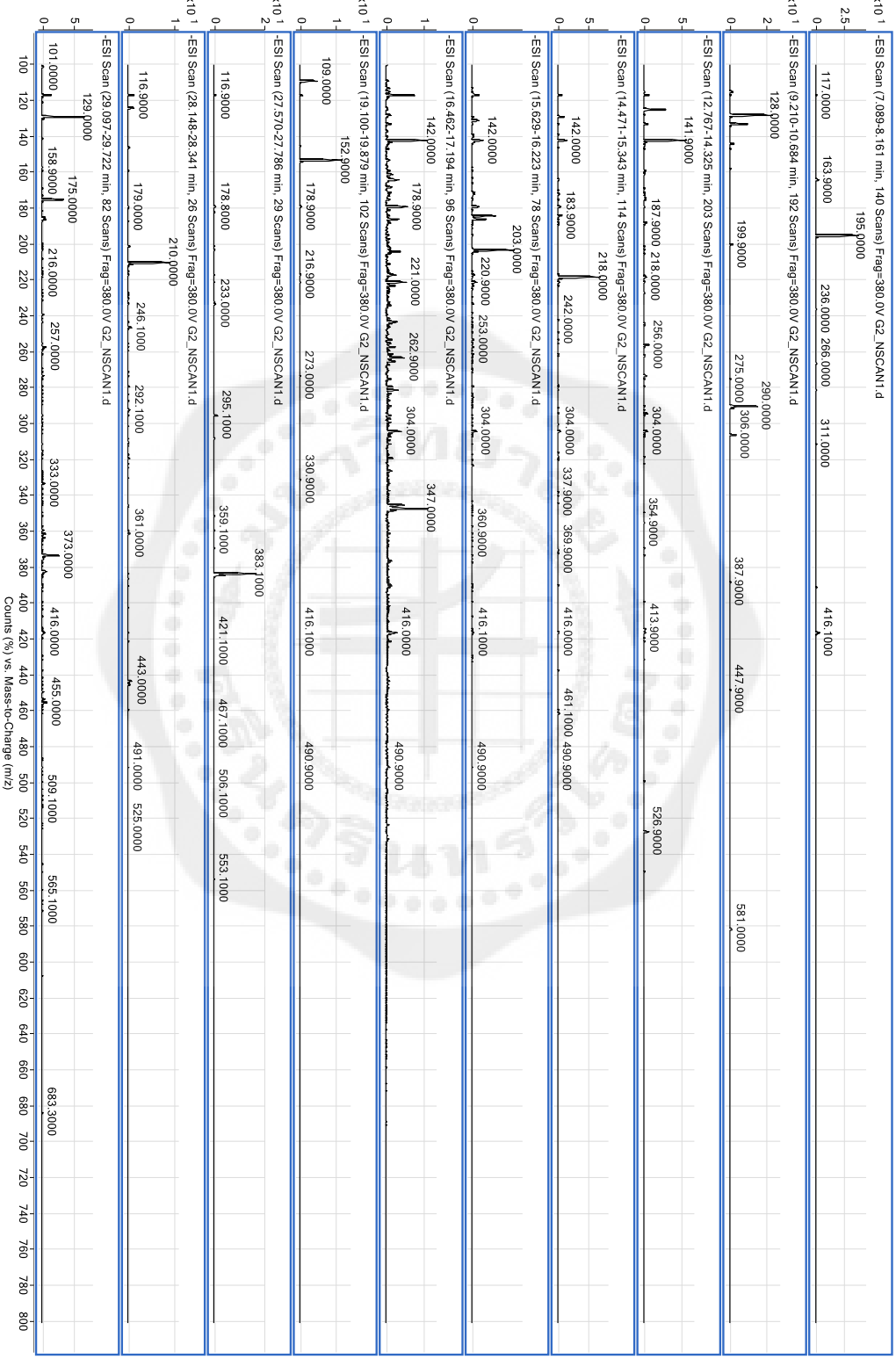
Ramaria aff. *vinosimaculans* (PKWS15-109) (ต่อ)



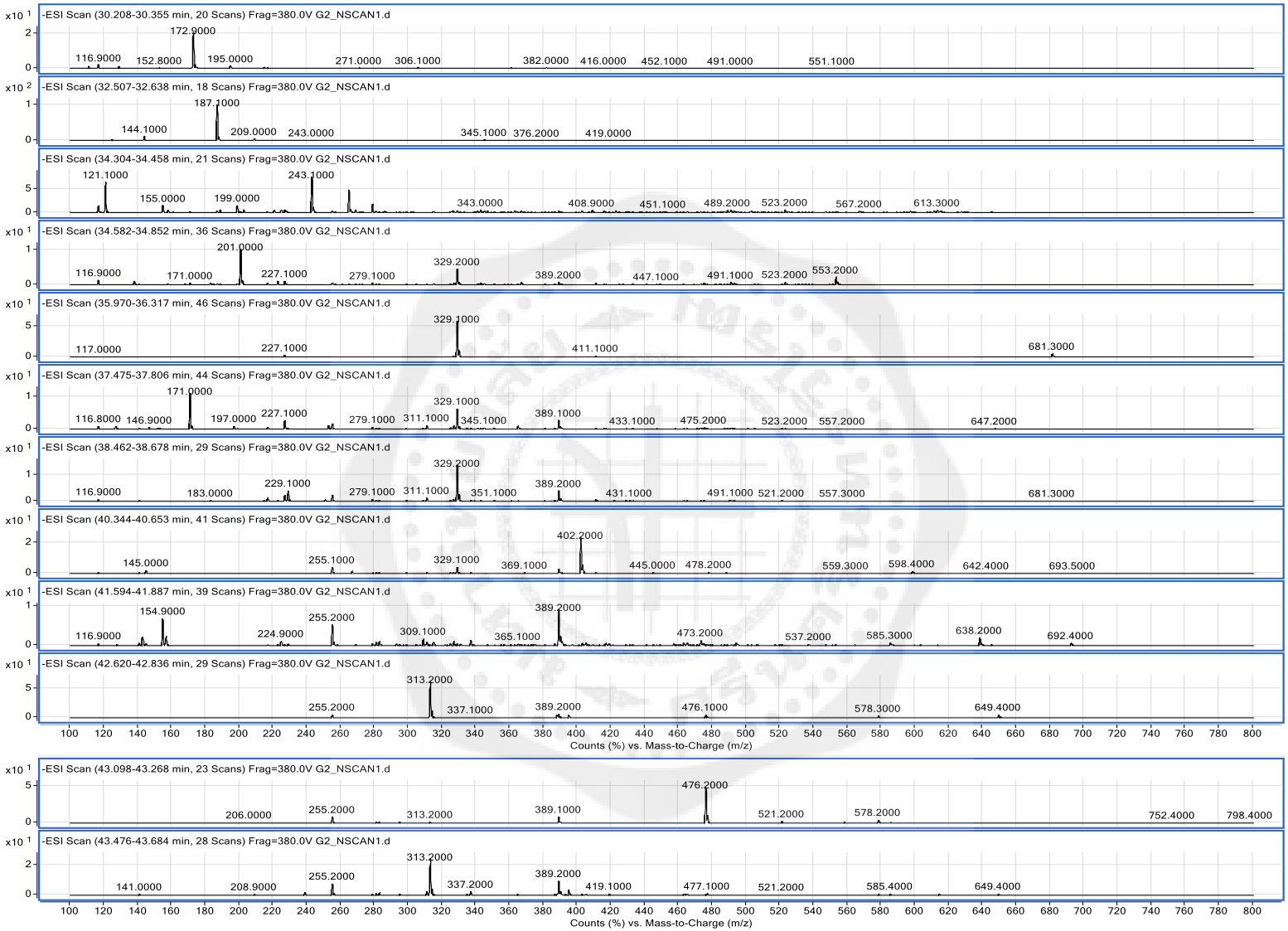


Ramaria sp.1 (PKWS15-95)

Ramaria sp.1 (PKWS15-95) (ต่อ)



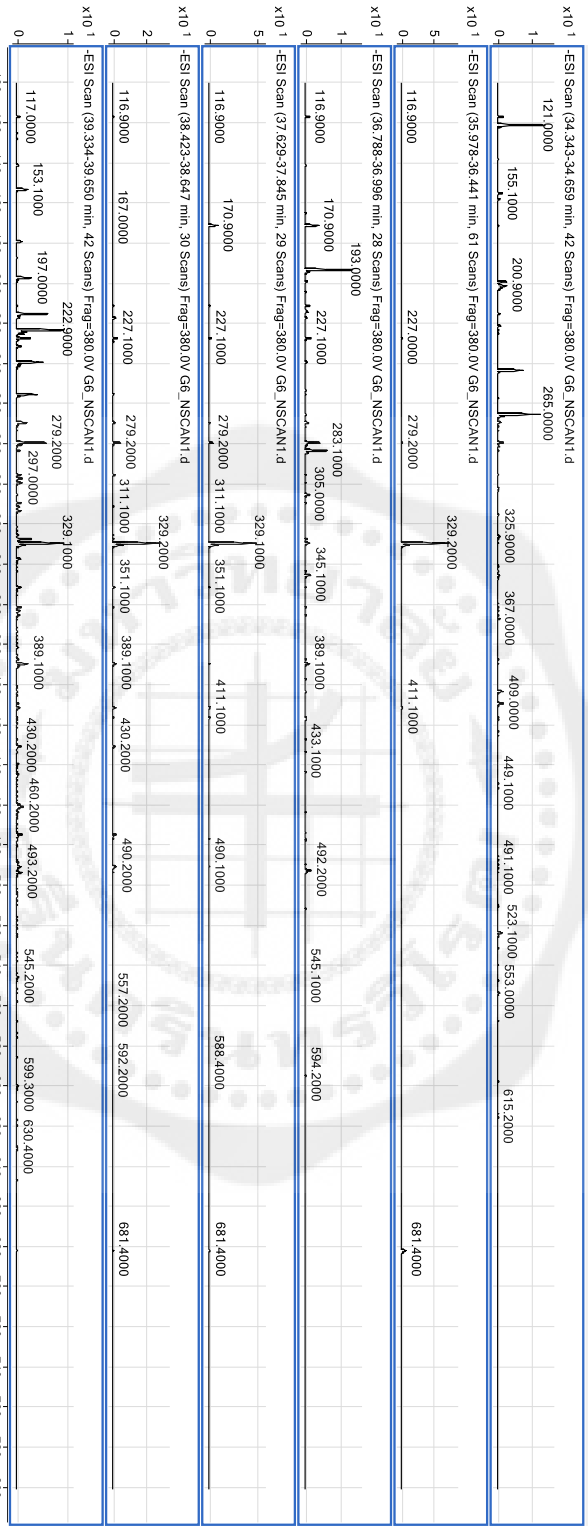
Ramaria sp.1 (PKWS15-95) (ต้นอ่อน)



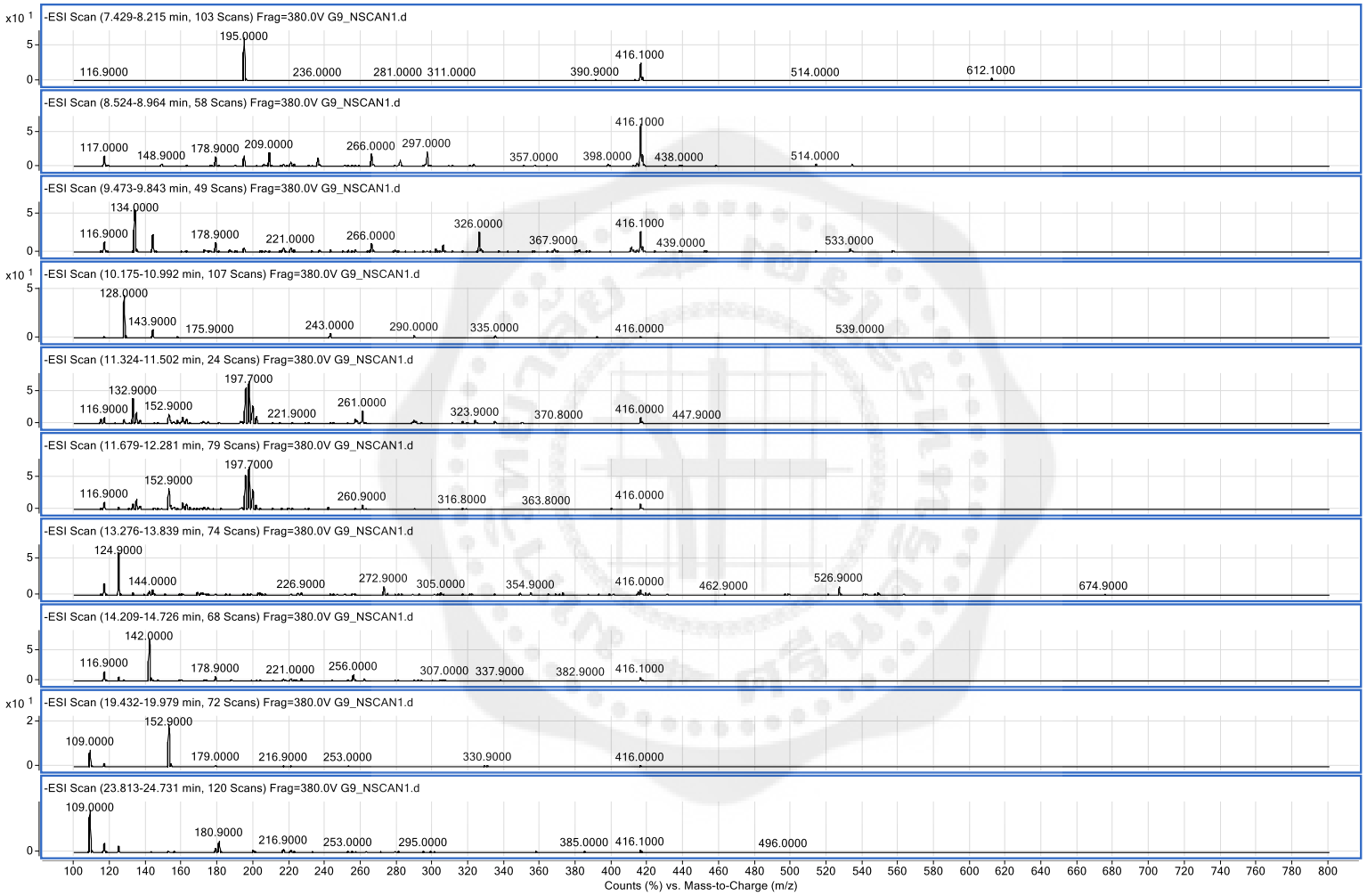
Ramaria sp.2 (PKWS15-221)

Ramaria sp.2 (PKWS15-221) (ต่อ)

Ramaria sp.2 (PKWS15-221) (ต่อ)

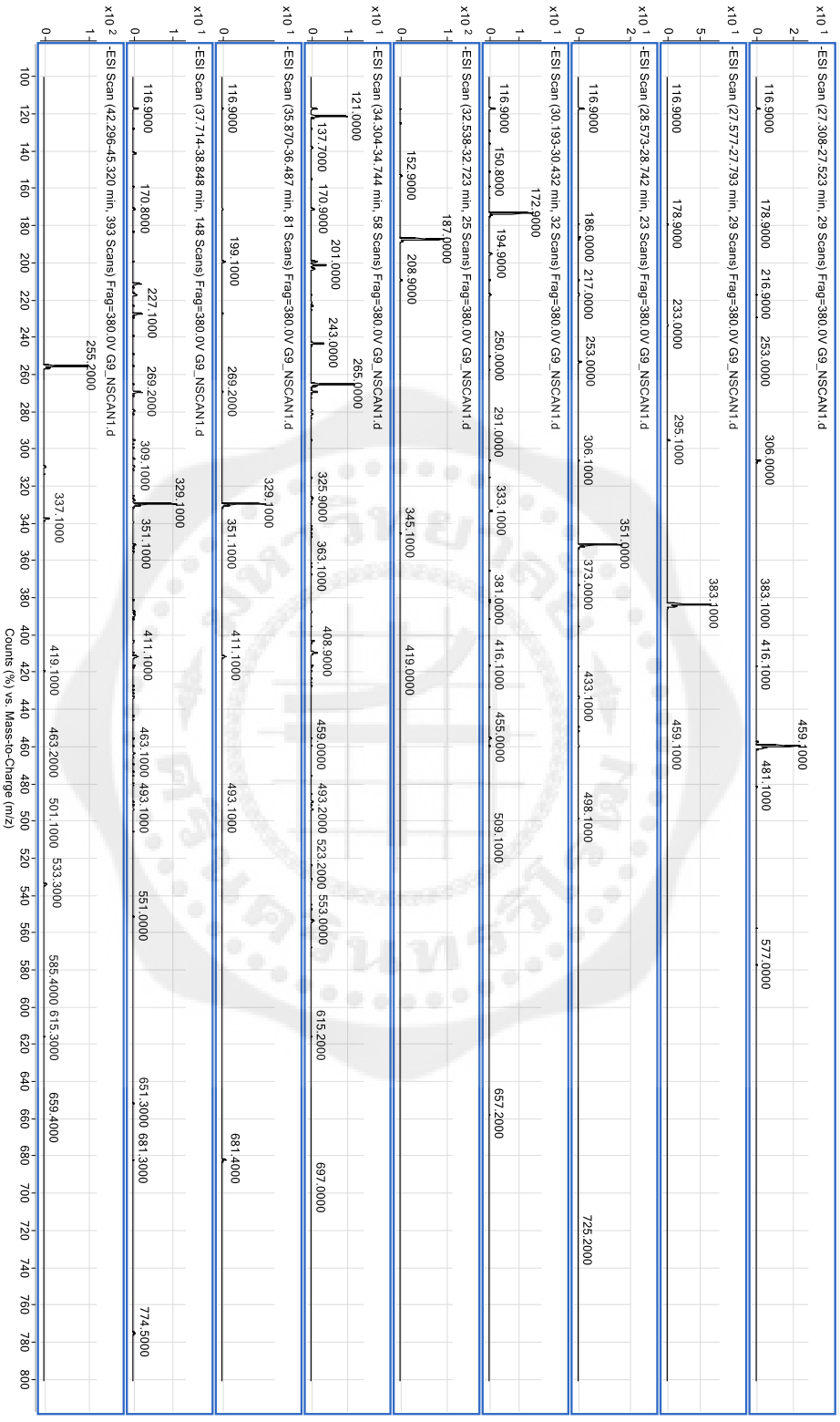


Ramaria sp.3 (PKWS14-02)



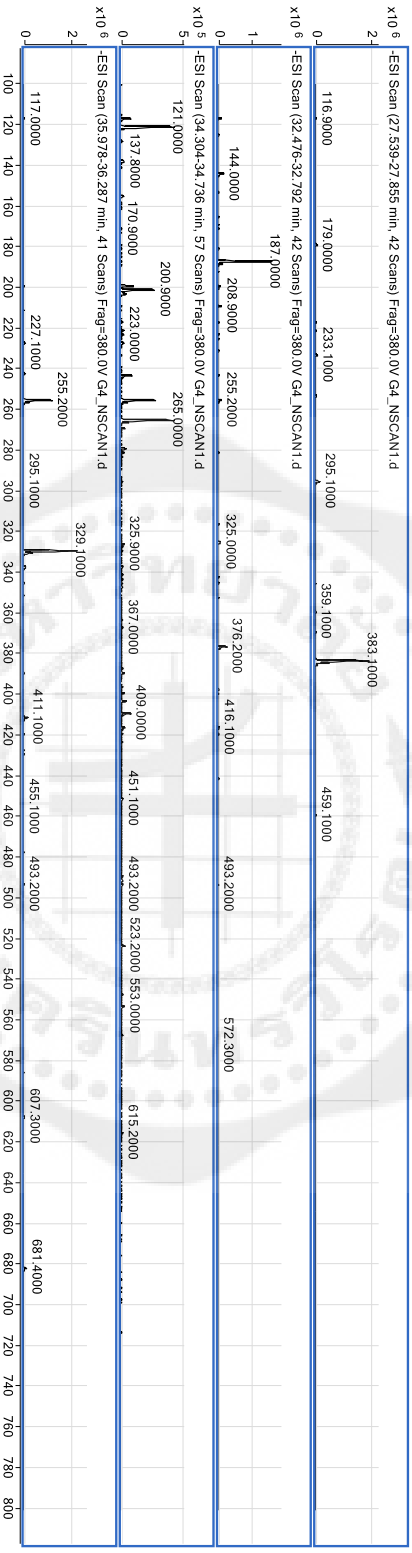
Ramaria sp.3 (PKWS14-02) (ต่อ)

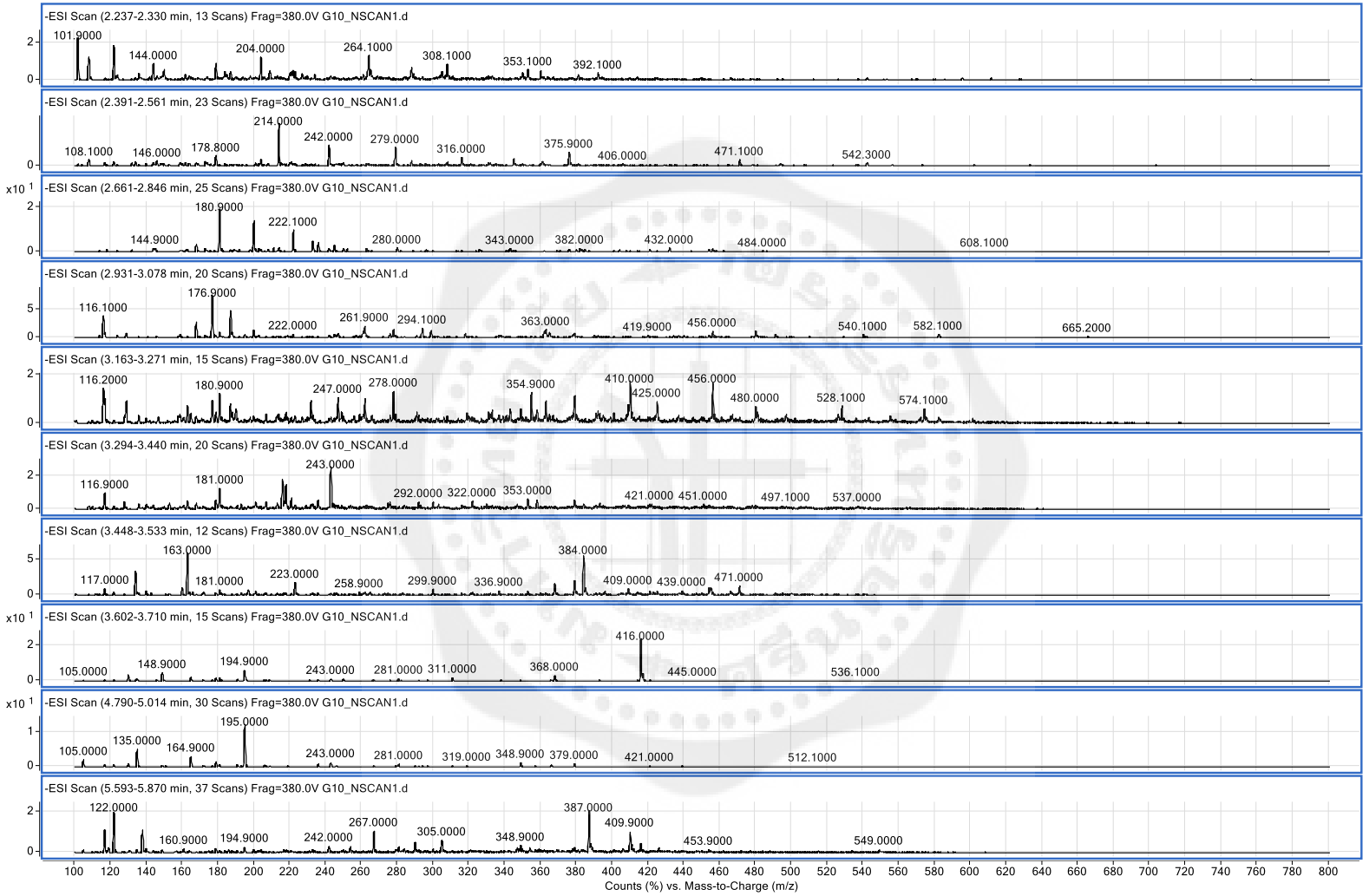
Ramaria sp.3 (PKWS14-02) (ต่อ)



Ramaria sp.9 (PKWS15-92)

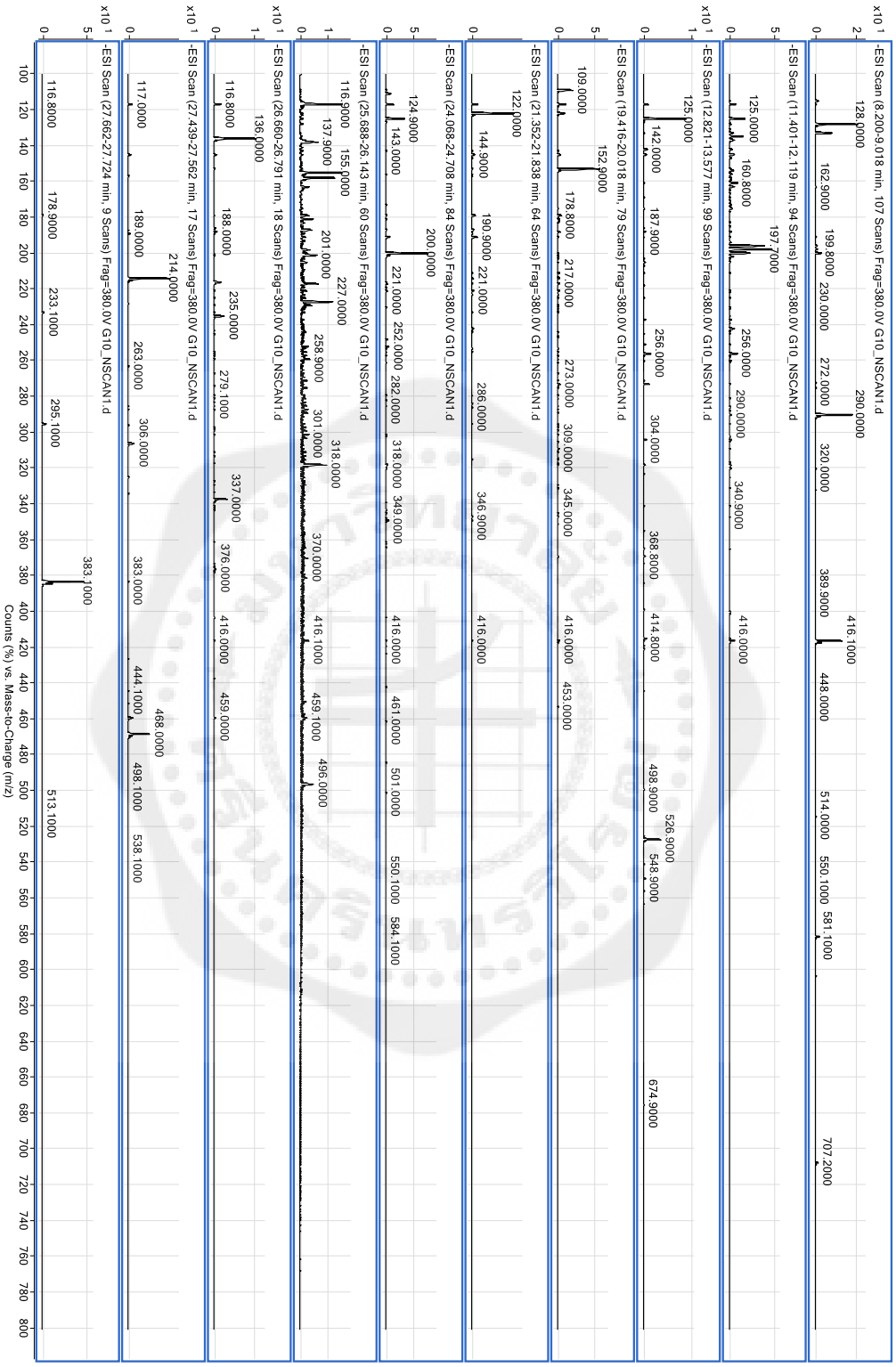
Ramaria sp.9 (PKWS15-92) (ต่อ)



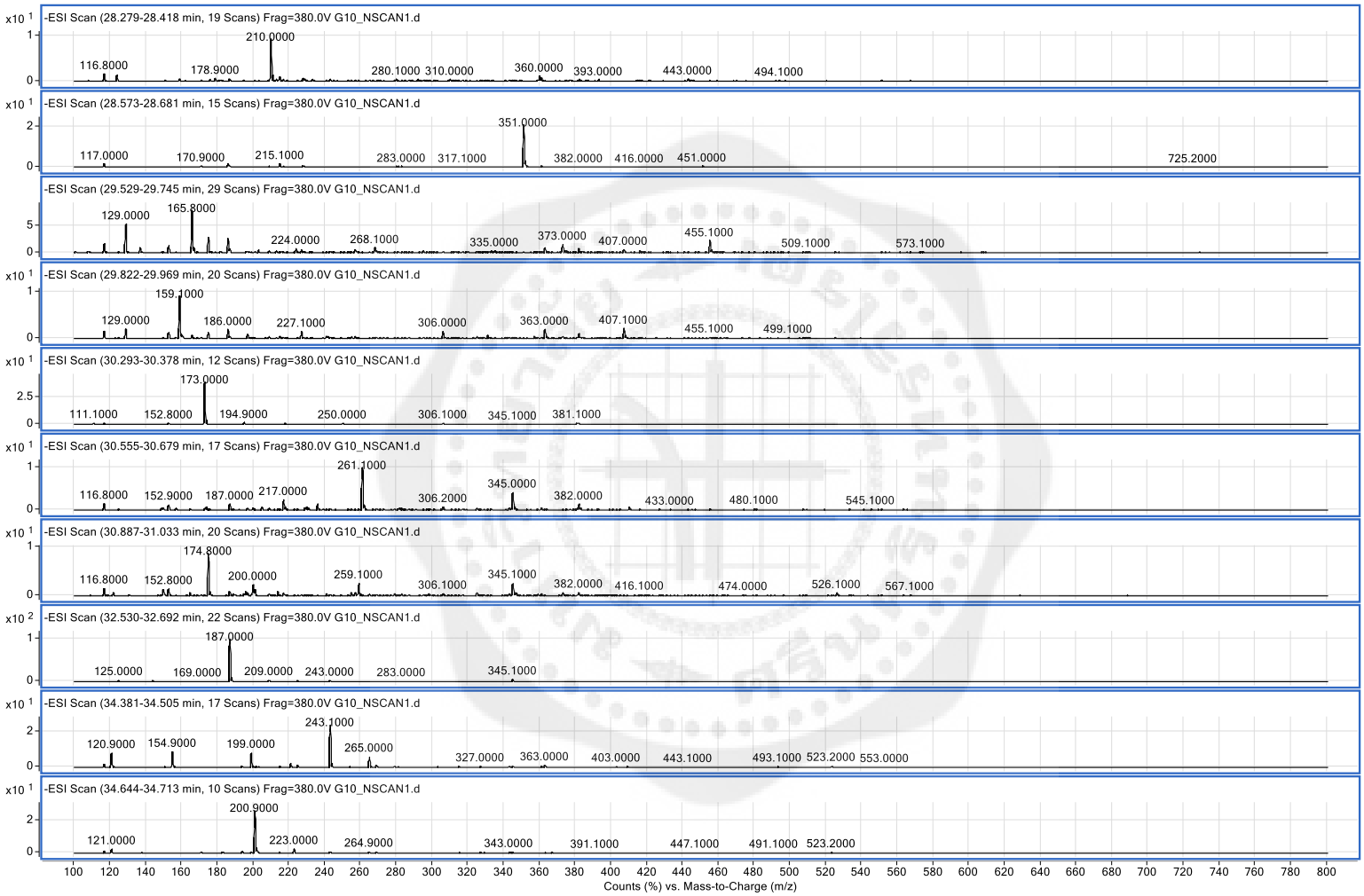


Ramaria sp.10 (PKWS15-181)

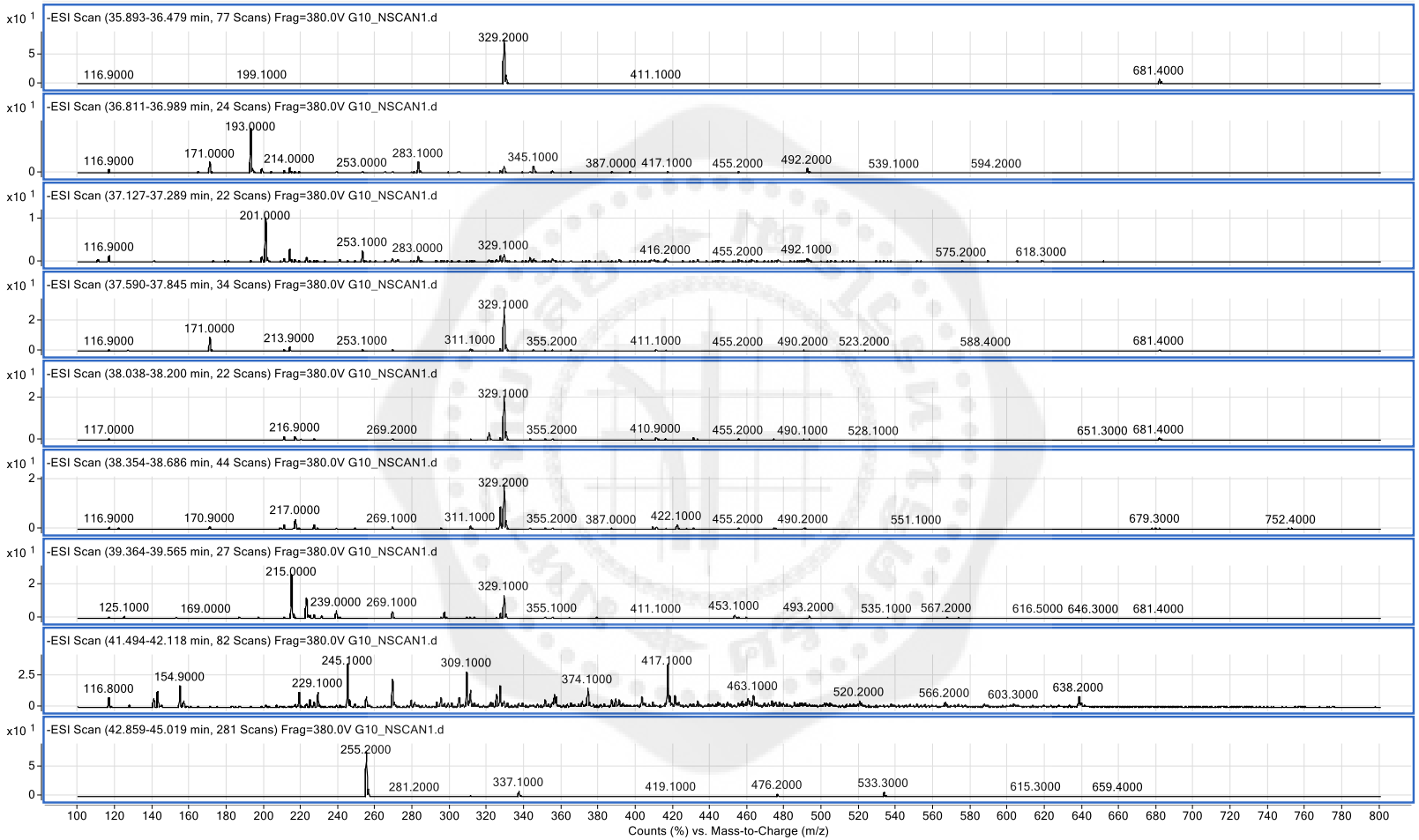
Ramaria sp.10 (PKWS15-181) (ต่อ)

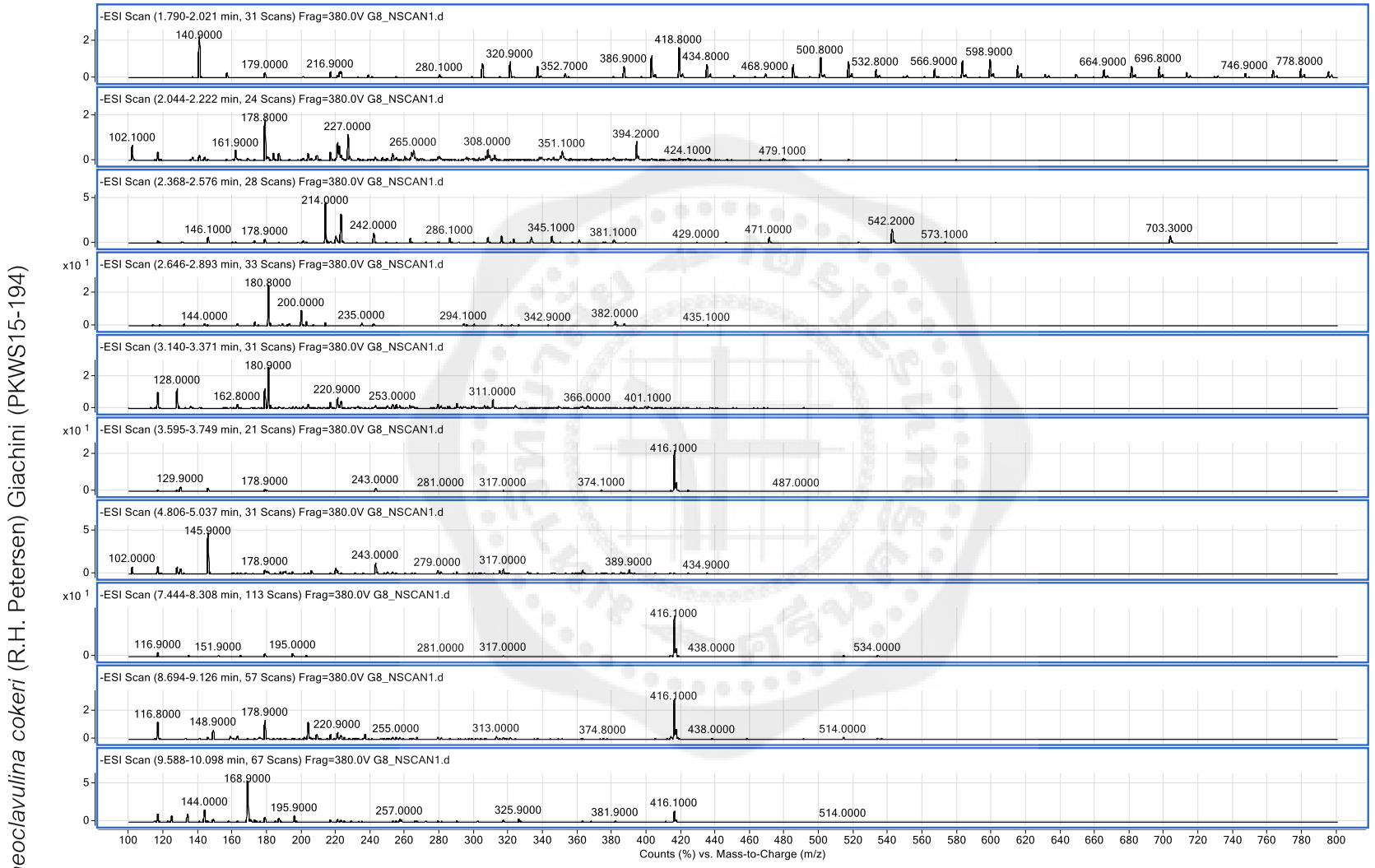


Ramaria sp.10 (PKWS15-181) (ชนิด)



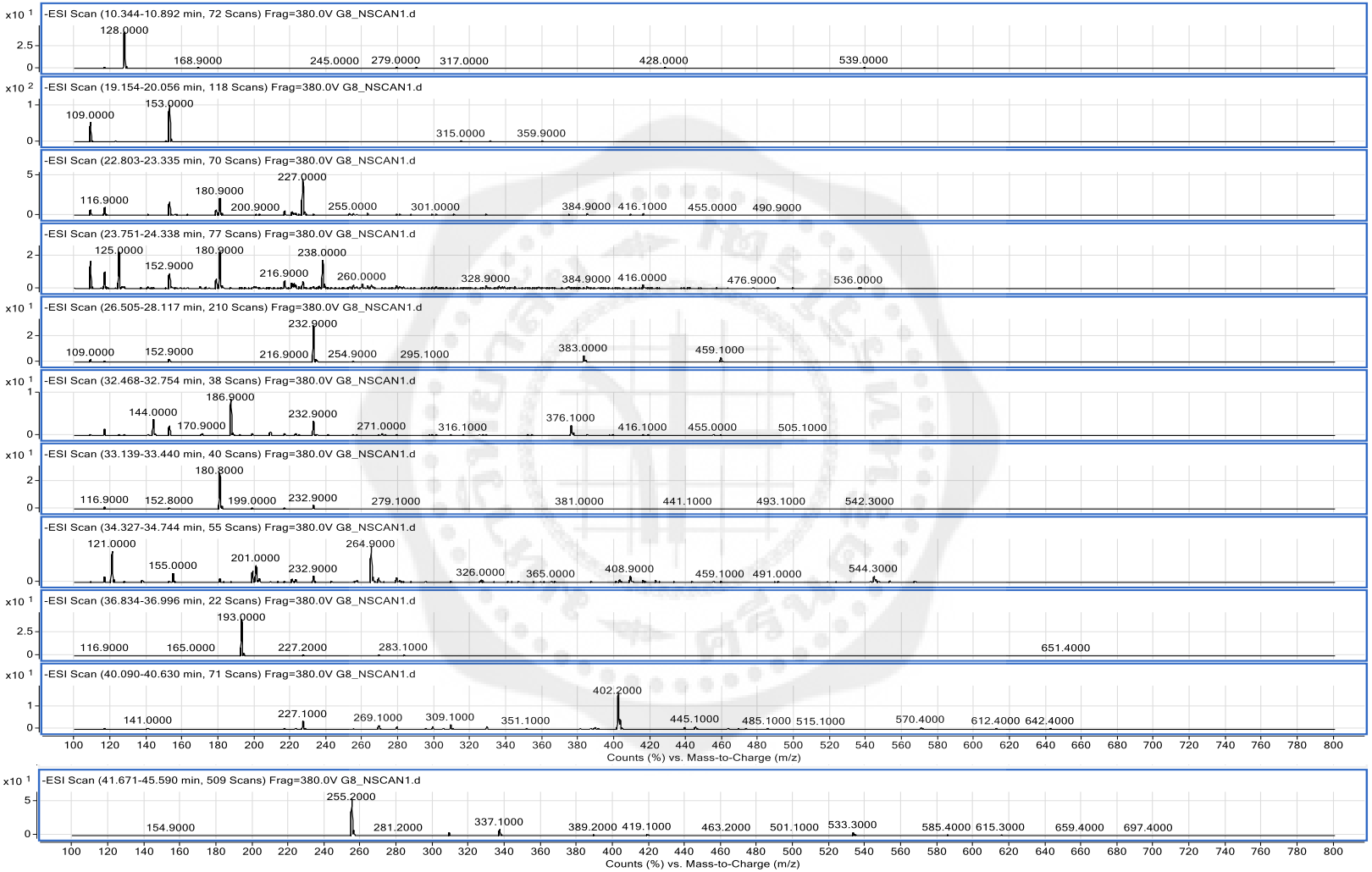
Ramaria sp.10 (PKWS15-181) (ต้นน้ำ)



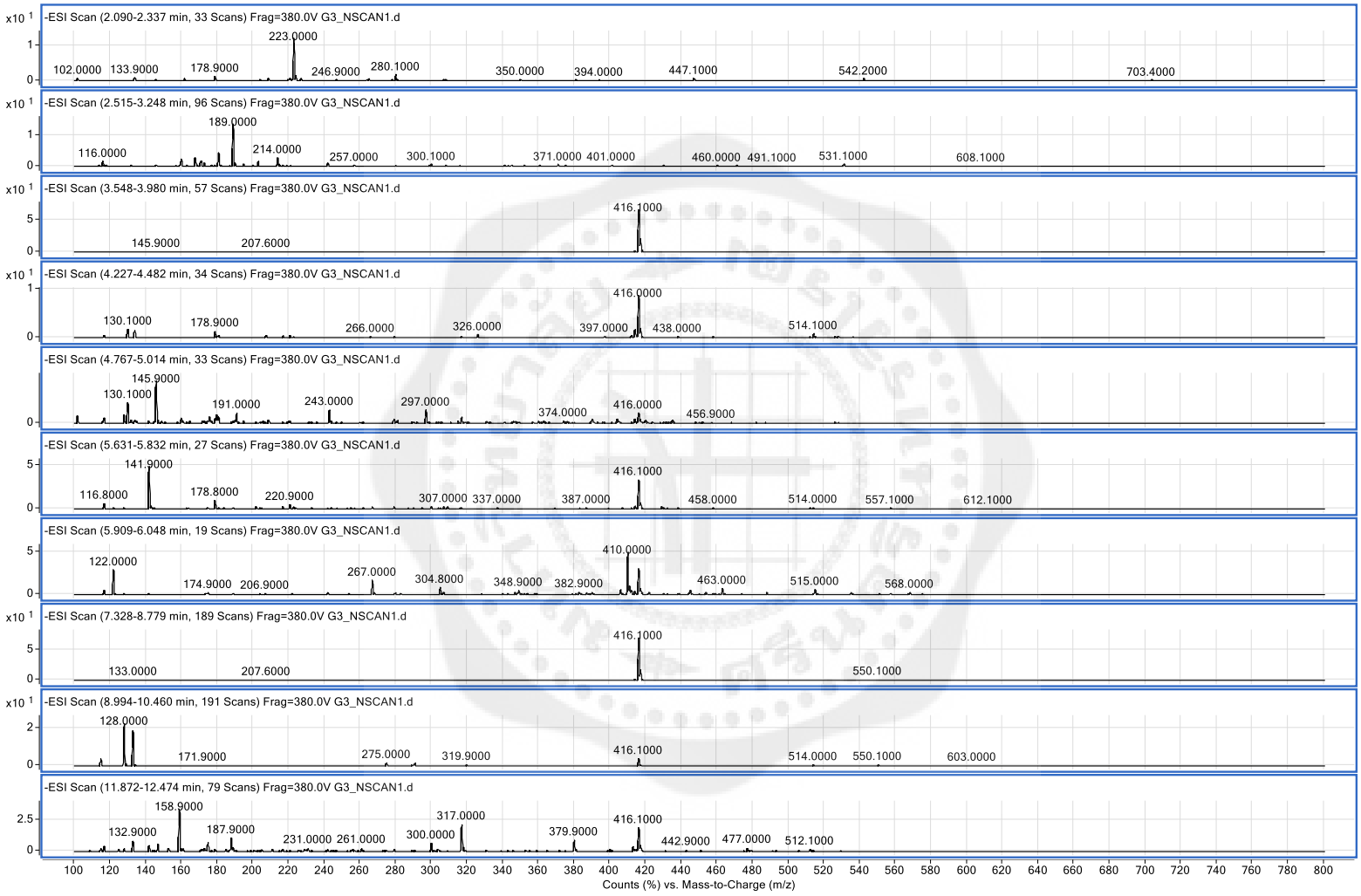


Phaeoclavulina cokeri (R.H. Petersen) Giachini (PKWS15-194)

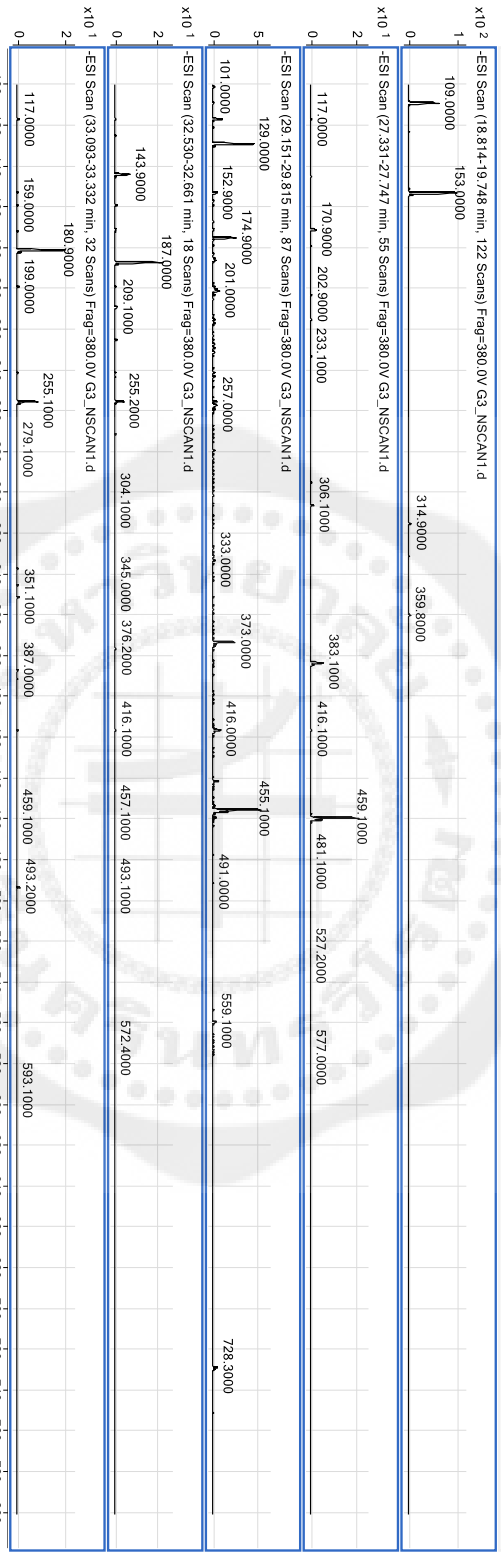
Phaeoclavulina cokeri (R.H. Petersen) Giachini (PKWS15-194)



Lentaria sp. (PKWS15-164)



Lentaria sp. (PKWS15-164) (ต่อ)



ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ-ชื่อสกุล	นางสาวณัชชา พรหมเพศ
วันเดือนปี เกิด	10 เมษายน 2535
สถานที่เกิด	นครศรีธรรมราช
สถานที่อยู่	239/5 ซอย CAT ถนนทุ่งสง-สุราษฎร์ธานี ตำบลปากแพรก อำเภอทุ่งสง จังหวัดนครศรีธรรมราช 80110
ตำแหน่งหน้าที่ การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-

ประวัติการศึกษา

พ.ศ.2553	ระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย จากโรงเรียนสตรีทุ่งสง จังหวัดนครศรีธรรมราช
พ.ศ.2557	วิทยาศาสตรบัณฑิต (สาขาวิชาจุลชีววิทยา) จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพมหานคร
พ.ศ.2561	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ) จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพมหานคร