สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การตรวจหาสารยับยั้งเชื้อราจากพืชชั้นสูงด้วยวิธีโครมาโตกราฟฟีแบบแผ่นบาง

นางสาววิยดา ยังให้ผล
นายสุนทร เกษมศรีวิวัฒน์

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2538

ปว.
ว676ก
2538
เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....25409
วัน, เดือน, ปี.....9 ก.ค. 2539

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
คุ้มครองสำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Direct Bioautography on Thin-layer Chromatogram as a method for Detecting Antifungal substances from Higher-Plants

Miss Wiyada Younghaipon

Mr. Sunthorn Kasemsriwiwat

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement for the Degree of Bachelor of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

1995

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	**การตรวจหาสารยับยั้งเชื้อราจากพืชชั้นสูงด้วยวิธีโครมากราฟฟีแบบแผ่นบาง**
โดย	**นางสาววิยดา ยังให้ผล**
	นายสุนทร เกษมศรีวิวัฒน์
ภาควิชา	**ชีววิทยาประยุกต์**
อาจารย์ที่ปรึกษา	**อาจารย์พนา โลหะทรัพย์ทวี**
	อาจารย์อรไท สุขเจริญ

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้นับโครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต

---------- **หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์**

(ดร. อุ่นเรือน ศิริวานิชกุล)

คณะกรรมการสอบโครงงานพิเศษ

---------- **ประธานกรรมการ**

(ผศ.ดร. พรรณี ฐิตาภิชิต)

---------- **กรรมการ**

(อาจารย์พนา โลหะทรัพย์ทวี)

---------- **กรรมการ**

(อาจารย์กนกพร สมพรไพลิน)

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การตรวจหาสารยับยั้งเชื้อราจากพืชชั้นสูงด้วยวิธีโครมาโตกราฟฟีแบบแผ่นบาง
นักศึกษา	นางสาววิยดา ยังให้ผล
	นายสุนทร เกษมศรีวิวัฒน์
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์พนา โลหะทรัพย์ทวี
	อาจารย์อรไท สุขเจริญ
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
ปีการศึกษา	2538

บทคัดย่อ

จากงานวิจัยพบว่าสารสกัดหยาบที่ได้จากส่วนใบของต้นจามจุรีมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของสปอร์รา ***Trichoderma harzianum*** ได้ดีกว่าสารสกัดหยาบจากส่วนใบของต้นนนทรี นอกจากนี้ยังพบว่าสารที่มีผลยับยั้งการงอกของสปอร์รา ***Trichoderma harzianum*** ละลายอยู่ในตัวทำละลายที่มีขั้วเท่านั้น

การแยกสารสกัดจากส่วนใบของต้นจามจุรีและต้นนนทรีโดยวิธีโครมาโตกราฟฟีแบบแผ่นบาง โดยใช้ตัวทำละลายคือ เอทธานอล 95 % ต่อ คลอโรฟอร์ม ในอัตราส่วน 2 : 8 พบว่าสารที่มีค่า R_f ใกล้เคียงกับ 0 ให้ผลการยับยั้งการงอกของสปอร์รา ***Trichoderma harzianum*** ได้ และวิธีการพ่นอาหารที่มีสารแขวนลอยของสปอร์ราบนแผ่นโครมาโตแกรมเป็นวิธีที่สามารถตรวจหาสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการงอกของสปอร์รา ***Trichoderma harzianum***

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title Direct Bioautography on Thin-layer Chromatogram as a method detecting Antifungal Substances from Higher-Plants

Name Miss. Wiyada Younghaipon
Mr. Sunthorn Kasemsriwiwat

Special Project Adviser Mr. Pana Lohasupthawee
Miss. Oratai Sukchareon

Department Applied Biology

Academic Year 1995

ABSTRACT

The crude extracts of the leaves and stem bark of five plants ;***Cassia grandis*** Linn.f. , ***Spathodea campanulata*** Beauv. , ***Samanea saman*** Merr. , ***Peltophorum pterocarpum*** Bank. ex. Heyne. , and ***Jacaranda filicifolia*** were studied for their antifungal activity using ***Trichoderma harzianum*** and ***Aspergillus niger*** . It was observed that the crude extracts of leaves of ***Samanea saman*** Merr. showed better antifungal activity than those of leaves of ***Cassia grandis*** Linn.f. , ***Spathodea campanulata*** Beauv. , ***Peltophorum pterocarpum*** Bank. ex. Heyne. , and ***Jacaranda filicifolia***. No antifungal activity was found in crude extracts of stem bark of these five plants . ***Trichoderma harzianum*** was more sensitive to the extracts than ***Aspergillus niger*** . The ethanol extracts of the leaves of ***Samanea saman*** Merr. inhibited spore germination of ***Trichoderma harzianum*** in a bioassay in vitro by the direct bioautography on thin-layer chromatogram.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีด้วยความอนุเคราะห์จากอาจารย์พนา โลหะทรัพย์ทวี และอาจารย์อรไท สุขเจริญ ผู้เป็นอาจารย์ที่ปรึกษา และเป็นผู้ชี้แนะแนวทางในการทำโครงงานพิเศษ และอาจารย์ทุกท่านที่ให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่อโครงงานพิเศษนี้ รวมทั้งประธานกรรมการสอบ และคณะกรรมการสอบโครงงานพิเศษ ซึ่งทางคณะผู้จัดทำ ขอกราบขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้ด้วย

นอกจากนี้ คณะผู้จัดทำขอขอบพระคุณ คุณพยอม เกียรติกำจร คุณวิทยา เขียวเขิน ซึ่งเป็นเจ้าหน้าที่ห้องทดลองวิทยาศาสตร์ และขอบใจเพื่อนนักศึกษา รวมทั้งผู้มีอุปการะคุณที่มิอาจกล่าวนามไว้ครบถ้วนที่ได้ช่วยเหลือกำลังกาย กำลังใจ กำลังความคิด ซึ่งส่งผลให้โครงงานพิเศษดำเนินไปอย่างราบรื่น และสำเร็จลงด้วยดี

คณะผู้จัดทำ

มีนาคม 2539

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อปัญหาพิเศษภาษาไทย	ก
บทคัดย่อปัญหาพิเศษภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 บทตรวจเอกสาร	3
บทที่ 3 ขั้นตอนการดำเนินงาน	16
บทที่ 4 ผลการทดลอง	21
บทที่ 5 บทวิจารณ์และสรุปผลการทดลอง	31
ภาคผนวก	
เอกสารอ้างอิง	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 Targets of Action of Selected Fungicides 14

ตารางที่ 2 แสดงผลการทดสอบสารสกัดหยาบจากส่วนใบและส่วนเปลือกของพืชทั้ง 5 ชนิดต่อการยับยั้งการงอกของสปอร์รา *Trichoderma harzianum* 22

ตารางที่ 3 แสดงผลการทดสอบสารสกัดหยาบจากส่วนใบและส่วนเปลือกของพืชทั้ง 5 ชนิดต่อการยับยั้งการงอกของสปอร์รา *Aspergillus niger* 22

ตารางที่ 4 แสดงผลการยับยั้งการงอกของสปอร์รา *Trichoderma harzianum* จากสารสกัดหยาบจากส่วนใบของต้นจามจุรีที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ 23

ตารางที่ 5 แสดงผลการยับยั้งการงอกของสปอร์รา *Trichoderma harzianum* จากสารสกัดหยาบจากส่วนใบของต้นนนทรีที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ 25

ตารางที่ 6 แสดงผลการทดสอบสารสกัดในชั้นของเอทธานอล 95 % และสารสกัดในชั้นเฮกเซนที่สกัดจากส่วนใบของต้นจามจุรีและต้นนนทรีต่อการงอกของสปอร์รา *Trichoderma harzianum* 27

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1 ตัวอย่างสารฆ่าเชื้อราสังเคราะห์กลุ่ม dithiocarbamate thiodicarboximide , carboximide , quinone , และ aromatic hydrocarbon 5

รูปที่ 2 ตัวอย่างยาปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์เป็นสารยับยั้งเชื้อรา 6

รูปที่ 3 สารกลุ่มอินฮิบิตินที่พบในพืช 12

รูปที่ 4 ตัวอย่างสารยับยั้งเชื้อราในกลุ่มไฟโตอเลกซิน 12

รูปที่ 5 ชีวสังเคราะห์ของสเตอรอล 13

รูปที่ 6 แสดงผลการยับยั้งการงอกของสปอร์รา *Trichoderma harzianum* จากสารสกัดหยาบจากส่วนใบของต้นจามจุรีที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ 24

รูปที่ 7 แสดงผลการยับยั้งการงอกของสปอร์รา *Trichoderma harzianum* จากสารสกัดหยาบจากส่วนใบของต้นนนทรีที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ 26

รูปที่ 8 การแยกสารสกัดที่ได้จากการใช้ตัวทำละลายเอทธานอล 95 % ต่อ คลอโรฟอร์ม ในอัตราส่วนต่าง ๆ 28

รูปที่ 9 แสดงผลการยับยั้งการงอกของสปอร์ราเมื่อทดสอบด้วยวิธีการสเปรย์อาหารเหลวที่ผสมสารแขวนลอยของสปอร์ราทั่วแผ่นโครมาโตแกรม 30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

โรคที่เกิดจากเชื้อโรคและปาราสิตต่าง ๆ เป็นโรคที่มีมาแต่ดึกดำบรรพ์ มนุษย์รู้จักใช้สมุนไพรและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติอื่น ๆ ในการบำบัดโรคติดเชื้อ (Infectious disease) เหล่านี้มาเป็นเวลานับพันปี แม้ว่าในปัจจุบันจะมียาปฏิชีวนะจำนวนมากที่มีประสิทธิภาพดีในการรักษาโรคอันเนื่องมาจากการติดเชื้อจากแบคทีเรียแล้วก็ตาม แต่ก็ยังไม่มียาที่ใช้ได้ผลดีกับโรคที่เกิดจากเชื้อราและเชื้อไวรัสบางชนิด ดังนั้นจึงมีความพยายามที่จะค้นหายาใหม่ ๆ ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อราและไวรัสจากธรรมชาติทั้งจากพืชชั้นต่ำ พืชชั้นสูง ตลอดจนสัตว์ทะเล จากการสำรวจสารสกัดจากพืชชั้นสูงจำนวน 1248 ชนิด (Mitscher A., 1987) เพื่อหาพืชที่มีฤทธิ์ต่อต้านจุลชีพ พบว่า ประมาณ 26 % ของตัวอย่างโดยเฉพาะสารสกัดจากพืชในวงศ์ **Leguminosae , Rutaceae** และ **Compositae** นอกจากนี้ยังพบว่าพืชมักจะมีสารต้านจุลชีพสูงสุดหลังระยะการออกดอก และสารต้านจุลชีพจากพืชชั้นสูงจะมีโครงสร้างแตกต่างไปจากยาปฏิชีวนะที่ใช้อยู่ในปัจจุบันเป็นอย่างมาก

ปัจจุบันยาที่ใช้สำหรับรักษาโรคที่มีสาเหตุมาจากเชื้อรานั้นมีอยู่เพียงไม่กี่ชนิด เช่น Griseofulvin เป็นยาต้านเชื้อราที่เก่าแก่ที่สุด ถูกค้นพบเมื่อปี ค.ศ. 1939 จากรา ***Penicillium griseofulvum*** และได้มีการนำมาใช้เป็นยารักษาโรคในปี ค.ศ. 1958 นอกจากนี้ยังมี nystatinจาก ***Streptomyces noursei*** , ***Stapphylococcus aureus*** , และ candicidin จาก ***Streptomyces griseus*** ซึ่งสารเหล่านี้มีโครงสร้างที่สำคัญ คือ เป็นสารจำพวกโพลีอีน (polyene) ที่มีโครงสร้างซับซ้อน โครงสร้างดังกล่าวมีความสำคัญในการออกฤทธิ์ต้านเชื้อราโดยการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ (Cellular membrane) (ถนอมศรี ,2534)

เนื่องจากยาต้านเชื้อรามีจำนวนจำกัดดังกล่าวแล้ว จึงมีความพยายามที่จะค้นหาสารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อราจากพืชชั้นสูง จากการศึกษาสมุนไพรที่มีประวัติการใช้ยาพื้นบ้านเป็นยารักษาโรคผิวหนัง พบว่าพืชพื้นเมืองของประเทศไต้หวันชนิดหนึ่งคือ ***Strobilanthes cusia*** วงศ์ **Acanthoceae** (Mitscher L.A.,1984) มีสารออกฤทธิ์ คือ Tryptanthrin เป็นอัลคาลอยด์จำพวก quinazolene สารนี้มีฤทธิ์ต้านเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคผิวหนังหลายชนิด โดยมีประสิทธิภาพดีกว่า nystatin

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวอย่างของสารอีกกลุ่มหนึ่งซึ่งมีฤทธิ์ต้านเชื้อราได้แก่อัลคาลอยด์(Matsuo A.1985) จำพวก Phenanthroquinolizidine เช่น cryptopleurine และ julandine ซึ่งสกัดได้จากต้น ***Boehmeria cylindrica*** วงศ์ **Urticaceae** เป็นไม้พื้นเมืองของประเทศออสเตรเลียเป็นพืชพวกเดียวกับป่านรา โดยที่สารทั้งสองมีฤทธิ์ต้านเชื้อราที่แรงมาก ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาโดยทำการสกัดสารจากพืชชั้นสูง 5 ชนิดคือ ต้นกาฬพฤกษ์ ต้นแคแสด ต้นจามจุรี ต้นนนทรี และต้นศรีตรัง เพื่อที่จะนำมาพัฒนาเป็นยารักษาโรคที่เกิดจากเชื้อราต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาสารยับยั้งการงอกของสปอร์ราจากพืชชั้นสูง
2. เพื่อพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบสารยับยั้งการงอกของสปอร์ราโดยวิธีทางชีวภาพ

ขอบเขตของปัญหาพิเศษ

เพื่อให้ได้ต้นพืชชั้นสูงที่มีคุณสมบัติในการผลิตสารยับยั้งการงอกของสปอร์รา โดยทดสอบจากส่วนใบและเปลือกของต้นพืชที่สนใจ 5 ชนิด คือ กาฬพฤกษ์ , แคแสด , จามจุรี , นนทรี และ ศรีตรัง และทำการเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งการงอกของสปอร์รา ระหว่างต้นพืชชั้นสูงทั้ง 5 ชนิด

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เพื่อให้ได้สารยับยั้งการงอกของสปอร์ราจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากพืชชั้นสูง
2. เพื่อให้ได้เทคนิคใหม่ ๆ ในการตรวจสอบสารยับยั้งการงอกของสปอร์ราที่สกัดจากพืชชั้นสูงในการยับยั้งการงอกของสปอร์ราที่ง่าย สะดวก ประหยัดเวลาและค่าใช้จ่าย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

สารฆ่าเชื้อราได้ถูกนำมาใช้ป้องกันการบุกรุกจากเชื้อรามาหลายศตวรรษแล้ว (Mc Callan,1967) ชาวกรีกและโรมันโบราณได้ใช้ซัลเฟอร์ในการทำลายเชื้อรา ต่อมาสารฆ่าเชื้อราที่เป็นสารอนินทรีย์ได้ถูกพัฒนามากขึ้น เช่นส่วนผสมระหว่างคอปเปอร์ซัลเฟต (Copper sulfate) และ แคลเซียมไฮดรอกไซด์ (Calcium hydroxide) ถูกนำมาใช้เป็นสารฆ่าเชื้อรา จากการค้นพบยาเพนนิซิลลินในปี ค.ศ.1929 นับเป็นจุดเริ่มต้นในการพยายามค้นหาสารต่อต้านจุลินทรีย์ระหว่างจุลินทรีย์ด้วยกัน และนำไปสู่การค้นพบยาต่อต้านเชื้อราอย่างมากมาย ดังนั้นสารฆ่าเชื้อราที่เป็นสารอินทรีย์จึงเริ่มพัฒนาขึ้นเรื่อย ๆ นอกจากนี้การศึกษาการต้านทานของพืชต่อโรคต่างๆ นำไปสู่การค้นพบสารประกอบที่มีคุณสมบัติต่อต้านเชื้อราในพืช เช่นสารประกอบฟีนอลลิคจากพืชมีคุณสมบัติต่อต้านเชื้อรา (Scheffer และคณะ,1966) แต่สารประกอบดังกล่าวจากพืชยังไม่ได้ถูกนำมาพัฒนาใช้เป็นยาฆ่าเชื้อรา

สารฆ่าเชื้อรา (Fungicide) หมายถึง สารที่สามารถทำลายเชื้อราโดยตรงและรวมถึงสารที่ไม่ทำลายเชื้อราโดยตรงแต่ยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้หากความเข้มข้นของสารเคมีนั้นสูงพอเหมาะ แต่การยับยั้งนี้ไม่มีผลได้อีกถ้ามีการนำสารเคมีเหล่านั้นออกไป หรือ ทำให้สารเคมีหมดไป นอกจากนี้สารบางตัวมีผลป้องกันการบุกรุกของเชื้อราต่อพืชได้เป็นอย่างดี โดยไม่มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา เช่น tricyclazol , fthalide จะยับยั้งการสังเคราะห์เมลานิน (Yamaguchi และ Kubo,1992) ส่วนสารบางตัวเช่น probendazole มีผลทางอ้อม คือมีผลไปกระตุ้นกลไกการสร้างสารต้านเชื้อราในพืช ดังนั้นสารฆ่าเชื้อราจึงมีความหมายรวมถึงสารเคมีที่ใช้เพื่อต่อต้านการทำงานของเชื้อรา(Antifungal activity)

สารฆ่าเชื้อราสังเคราะห์ (Synthesis fungicides)

สารฆ่าเชื้อราที่สังเคราะห์ขึ้นถูกใช้เป็นสารป้องกันพืชจากเชื้อราโดยการนำไป โรยหรือฉีดเพื่อยับยั้งการงอกของสปอร์และการเจริญของเส้นใยบนผิวหน้าพืช สารฆ่าเชื้อราจะถูกดูดซึม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และส่งผ่านไปยังส่วนต่างๆของพืชแล้วแสดงปฏิกิริยาป้องกันนอกจากนี้สารฆ่าเชื้อราถูกนำไปใช้รักษาโรคในสัตว์ที่ติดเชื้อจากรา สารฆ่าเชื้อราที่เป็นสารอนินทรีย์ยังคงใช้กันแพร่หลายในการเกษตรและอุตสาหกรรมเช่น ซัลเฟอร์เป็นธาตุชนิดแรกที่ใช้เป็นสารฆ่าเชื้อราในสมัยก่อน สารประกอบของคอปเปอร์ซัลเฟตและปูนขาวยังคงใช้กันอย่างแพร่หลาย สารหนูและสารประกอบของสารหนูไม่เป็นที่นิยมใช้ (ยกเว้นใช้เป็นสารป้องกันไม้ร่วมกับคอปเปอร์และโครเมต) (Zabel และ Morrell,1992) เนื่องจากราและจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถทำให้สารหนูอยู่ในรูปที่ระเหยได้ ซึ่งเป็นพิษอย่างมากต่อมนุษย์

สารประกอบอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนหลายชนิดมีคุณสมบัติเป็นสารฆ่าเชื้อราได้ เช่น สาร chloroneb และ dicloran (รูปที่ 1) ซึ่งหมู่ฟังก์ชั่นแนลเป็นหมู่ chloro , nitro , amino และ methoxyl ทำให้สารฆ่าเชื้อรามีประสิทธิภาพในการทำลายอยู่ในช่วงกว้างแต่ถูกนำไปใช้ควบคุมจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคพืชบางชนิดเท่านั้น(Lyr,1987)

<u>ยาปฏิชีวนะ (Antibiotic)</u>

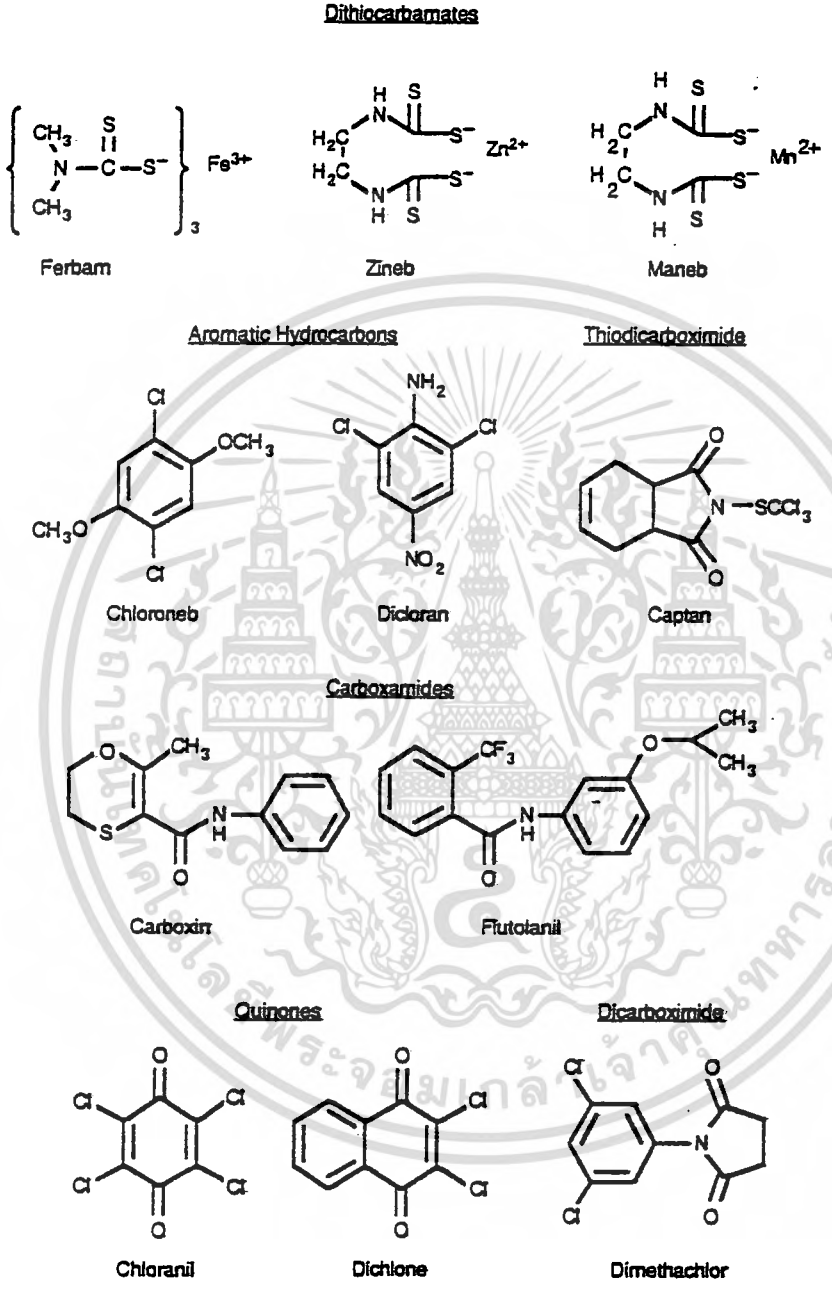
ยาปฏิชีวนะเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากจุลินทรีย์ที่สามารถฆ่าหรือยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นโดยใช้ความเข้มข้นเพียงเล็กน้อย ยาปฏิชีวนะที่มีคุณสมบัติเป็นสารฆ่าเชื้อรามีมากกว่า 100 ชนิดซึ่งผลิตได้จากพวก ***Actinomycetes*** สกุล ***Streptomyces*** และราในสกุล***Penicillium*** , ***Aspergillus*** และสายพันธุ์อื่นที่มีความสัมพันธ์กัน

อย่างไรก็ตามในอดีตมีการบันทึกว่ายาปฏิชีวนะที่เป็นสารต้านเชื้อราที่ได้จากเชื้อรา ***Penicillium*** เรียกว่า Mycophenolic acid ได้ถูกค้นพบตั้งแต่ปี ค.ศ. 1896 (Koller,1992A) แต่มีเพียงสารต้านเชื้อราบางชนิดเท่านั้นได้นำไปใช้ในทางการแพทย์และการเกษตรกรรมเพราะมีข้อจำกัดเนื่องจากสารฆ่าเชื้อรานั้นมีพิษต่อสิ่งมีชีวิตที่ถูกเชื้อราบุกรุกด้วย

ยาปฏิชีวนะกลุ่ม polyene macrolide เช่น amphotericin B (รูปที่ 2) และ nystatin ผลิตโดย ***Streptomyces.*** สารต้านเชื้อรากลุ่มนี้ใช้ต่อต้านเชื้อราที่ก่อโรคต่อสัตว์แต่มีข้อจำกัดคือไม่สามารถละลายน้ำได้ nystatin เป็นที่นิยมใช้เนื่องจากมีผลข้างเคียงน้อยกว่า Amphotericin B

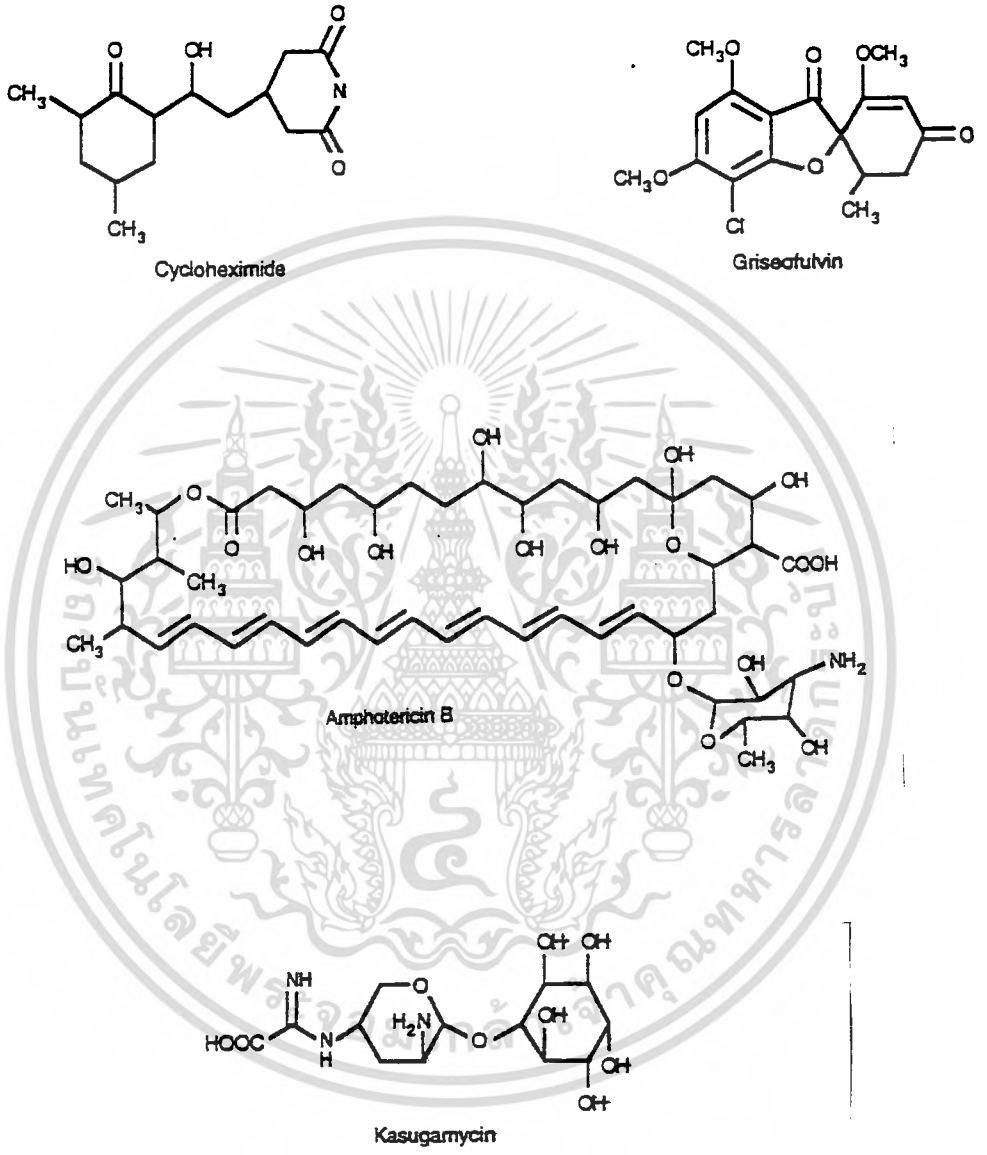
Griseofulvin (รูปที่ 2) ผลิตโดย ***Penicillium griseofulvum*** และ ***Penicillium*** สปีชีส์อื่นๆ มีผลต่อเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคกับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม อนุพันธุ์ของ Griseofulvin มากกว่า 300 ชนิดถูกสังเคราะห์ขึ้นและทดสอบปฏิกิริยา หนึ่งในนั้นก็คืออนุพันธุ์ที่เป็น n-propyl ให้ผลการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 1 ตัวอย่างสารฆ่าเชื้อราสังเคราะห์ในกลุ่ม dithiocarbamate , thiodicarboximide , carboximide , quinone , และ aromatic hydrocarbon

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2 ตัวอย่างยาปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์เป็นสารยับยั้งเชื้อรา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยับยั้งดีมากในการป้องกันพืชแต่เนื่องจากเป็นสารที่มีราคาแพงมากจึงไม่เหมาะในการควบคุมโรคพืชในทางปฏิบัติจริง

สารยับยั้งเชื้อราในพืช (antifungal compounds in plants)

สารทุติยภูมิในพืชที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อราสามารถแบ่งได้ 2 กลุ่ม คือ 1 กลุ่ม Inhibitin และlectin สารในกลุ่มนี้คล้ายกับสารพิษในเชื้อราทั่วไป คือ เกี่ยวข้องกับวิถีการสังเคราะห์ 3 วิถี คือ1)วิถีกรดเมวาโลนิค (mevalonic acid pathway) เพื่อสังเคราะห์เทอร์พีนอยด์ (terpenoid) 2)วิถี shikimic acid และ 3)วิถี acetate-malonate เพื่อสังเคราะห์สารประกอบฟีนอลลิค (phenolic)ตัวอย่างของสารเหล่านี้ได้แก่ Pinosylvin , thujaplicin และ mansonone (รูปที่ 3) ซึ่งสารเหล่านี้แยกได้จากใจกลางของต้นพืชที่ไม่เน่าเปื่อย (decay-resistant heartwood) สาร Protocatechuic acid และ cinnamic acid (เกี่ยวข้องเป็นตัวยับยั้งการงอกของเอนโดจีเนียส สปอร์) และกรด chlorogenic (อนุพันธ์จากกรด cinnamic) ถูกพบในพืชหลายชนิด อนุพันธ์ของ benzoxazolinone พบในพืชประเภทหญ้าที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจมากมาย ซึ่งปรากฏอยู่ในรูปของไกลโคไซด์ (glycoside) ที่ไม่เป็นพิษแต่จะเปลี่ยนรูปไปอยู่ในรูปที่เป็นพิษโดยการกระทำของเอนไซม์ glucosidase จากเชื้อราซึ่งสารประกอบเหล่านี้พืชจะไม่ผลิตเพิ่มขึ้นหลังจากที่พืชได้รับการติดเชื้อหรือการบุกรุกจากเชื้อรา ดังนั้นจึงจัดสารกลุ่มนี้อยู่ในกลุ่มสารต้านเชื้อราที่เรียกว่าอินฮิบิติน(Inhibitins)

เลคติน (lectin) จากพืชเป็นสารอีกกลุ่มหนึ่งที่ได้รับความสนใจเพราะมีความสัมพันธ์ระหว่างผู้ถูกอาศัยและผู้อาศัย (host-parasite interaction) (Callow,1977 ; Brambl และ Gade, 1985) เลคติน (lectin) เป็นโปรตีนหรือไกลโคโปรตีนที่จับอยู่กับคาร์โบไฮเดรตอย่างจำเพาะ บ่อยครั้งเลคตินถูกใช้ในการทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงรวมตัวกันและเกิดการตกตะกอน (agglutination of red blood cell) และมีผลต่อเซลล์สัตว์อย่างน่าสนใจ มักมีการอ้างถึงว่าเป็น phytohemaglutinins แต่ Callow (Callow.1977) ได้ชี้ให้ทราบว่าการทำให้เม็ดเลือดแดงรวมตัวกันไม่ใช่หน้าที่หลักของ lectin ในพืช

เชื้อรามีองค์ประกอบของเลคติน จึงทำให้มันมีกระบวนการจดจำเซลล์อย่างเฉพาะเจาะจง ดังนั้น lectin จึงมีความสัมพันธ์กับผู้อาศัยและผู้ถูกอาศัยอย่างเฉพาะเจาะจง โดยจะไปยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราที่เข้ากันกับพืชไม่ได้ เช่น เลคตินจากเมล็ดพืชชนิดต่าง ๆ พบว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีผลต่อการเจริญของ germ - tube และการพัฒนาการของเชื้อราหลายชนิด (Brambl และGade,1985; Mirelman และคณะ,1975)

จากการศึกษาแหล่งของเลคตินทั้งหมด 11 แหล่ง พบว่าแหล่งเลคตินที่ได้จาก pokeweed มีความสามารถในการยับยั้ง ***Neurospora crassa*** เท่านั้น , แหล่งของเลคตินอีก 5 แหล่งมีความสามารถในการยับยั้ง ***Botryodiplodia theobromae*** ได้เท่านั้น และแหล่งของเลคตินอีก 1 แหล่งมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราที่ใช้ทดสอบได้มากกว่า 1 ชนิด (Brambl และ Gade,1985) การจับกันอย่างจำเพาะของเลคตินและสปอร์ของเชื้อราได้ถูกพิสูจน์โดยการรวมตัวของ ***Fusarium roseum*** และสปอร์ของ ***F. soloni*** โดย concanavalin A ซึ่งเป็น Wheat germ agglutinin และ ricin ภายใต้สภาวะต่าง ๆ (Ritter และคณะ,1973) จากการทดลองนี้ทำให้ทราบว่าเลคตินอาจมีบทบาทในการต้านทานของพืชต่อการบุกรุกของเชื้อรา

2. กลุ่มไฟโตอเลกซิน (phytoalexin) เป็นสารทุติยภูมิจากพืชที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์และจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นถ้าพืชถูกบุกรุกโดยจุลินทรีย์ ไฟโตอเลกซินถูกค้นพบครั้งแรกโดย Muller ในปี ค.ศ 1940 จากการศึกษาการติดเชื้อของหัวมันฝรั่งโดยเชื้อ ***Phytophthora infestans*** เช่นสาร Rishitin (รูปที่ 4) และสารพวกเทอร์พีนอยด์ (terpenoid) อื่นๆที่ได้จากมันฝรั่งและในพืชวงศ์ Solanaceae ที่ติดเชื้อ ***Phytophthora infestans*** การเพาะเชื้อราที่เข้ากันไม่ได้กับพืชหมายถึงเชื้อราที่เป็น incompatible strain กับพืชจะไม่ทำให้พืชนั้นเป็นโรคซึ่งตรงกันข้ามกับ compatible strain ไฟโตอเลกซิน (phytoalexin) แตกต่างจากอินฮิบิติน (inhibitin) โดยไฟโตเลกซินจะสร้างขึ้นเมื่อพืชถูกบุกรุกโดยจุลินทรีย์ แต่อินฮิบิติน (inhibitin) เป็นสารประกอบที่ปรากฏในเนื้อเยื่อพืชตลอดโดยมีความเข้มข้นที่ยับยั้งการงอกหรือการเจริญของสปอร์ได้ ไฟโตอเลกซินจะถูกชักนำให้สร้างโดยตัวชักนำเช่นการบุกรุกจากเชื้อรา ไอออนของโลหะหนัก , สารต่อต้านการเมตาบอไลส์ (antimetabolites) และตัวอินฮิบิเตอร์ (inhibitor) อื่น ๆ การทำให้พืชมีบาดแผลและการแช่แข็ง อาจจะชักนำให้พืชสร้างไฟโตอเลกซินได้ เราเรียกสารที่ชักนำให้เกิดการสร้างไฟโตอเลกซินว่า elicitor

สารไฟโตอเลคซินกลุ่มใหญ่กลุ่มหนึ่งคือ pterocarpan isoflavonoids ได้แก่สาร phaseollin (รูปที่ 4) เป็นสารที่พบในพืชวงศ์ **Leguminosae** ได้จากวิถี acetate-malonate และจากวิถี shikimic acid เท่านั้นสาร Pisatin , kievetone และ coumesterol เป็น isoflavonoids ที่แยกได้จากไม้จำพวกมีฝัก (legumes)(รูปที่ 4) อย่างไรก็ตามมีสารยับยั้งเชื้อราจากพืชเพียงไม่กี่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชนิดที่ได้ศึกษาอย่างละเอียดว่ามีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อราอย่างแท้จริง สารเหล่านี้ได้แก่สารประกอบพวกฟีนอลลิคและควิโนน

กลไกการทำลายเชื้อรา

การเลือกทำลายของสารยับยั้งเชื้อราขึ้นอยู่กับตำแหน่งที่สารเข้าทำปฏิกิริยากลไกการต่อต้านของเชื้อรา (ตารางที่ 1)

ความจำเพาะเจาะจงของสารยับยั้งเชื้อราขึ้นกับกลไกของปฏิกิริยาการออกฤทธิ์ สารยับยั้งเชื้อราแบบไม่จำเพาะจะเป็นพิษต่อเอนไซม์เมื่อรวมตัวกับ thiol , amino , carboxyl , imidozol และหมู่ฟังก์ชันอื่น ๆ ที่มีความสำคัญต่อโครงสร้างระดับทุติยภูมิของโปรตีน(Lyr,1977) เนื่องจากหมู่ฟังก์ชั่นเหล่านี้พบทั่วไปในเอนไซม์จำนวนมากสารยับยังเชื้อรากลุ่มนี้จึงเป็นสารยับยั้งหลายตำแหน่งเช่น สารต้านเชื้อราในกลุ่ม dithiocarbamate ได้แก่สาร ziram เมื่อถูกย่อยสลายโดยเชื้อราจะได้ผลิตภัณฑ์คือ methyl isothiocyanate และ ethylenethiuram disulfide ซึ่งมีพิษมากกว่าสารตั้งต้นของมัน (Lyr,1977)

แต่สารควิโนนไม่ถูกย่อยสลายให้อยู่ในรูปที่เป็นพิษแต่จะเกิดปฏิกิริยาการเติม หรือ การ oxidation ร่วมกับ thiols และกลุ่มอะมิโนทำให้โปรตีนเสียการทำงานไป (Lyr,1977) กลไกการทำลายเชื้อราของซัลเฟอร์ยังไม่เป็นที่เข้าใจดีโดยความเป็นพิษของมันอาจเกี่ยวข้องกับกลไกการขนส่งอิเลคตรอนจากไซโตโครม บี และจากผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นคือ H_2S ซึ่งเป็นพิษมากและมีผลต่อเมตาบอลิซึมของ thiol ดังนั้นซัลเฟอร์จึงเป็นสารยับยั้งเชื้อราหลายตำแหน่ง

สารยับยั้งเชื้อราแบบจำเพาะเจาะจง

สารยับยั้งเชื้อราแบบจำเพาะเจาะจงส่วนใหญ่เป็นสารพวกยาปฏิชีวนะเพราะตำแหน่งของปฏิกิริยามีเพียงตำแหน่งเดียวดังตัวอย่าง

เยื่อหุ้มเซลล์

สารยับยั้งเชื้อราที่มีผลต่อการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์(Koller,1992A) ได้แก่ polyene ซึ่งอยู่ในรูปสารเชิงซ้อนกับ sterol จะไปทำลายหน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์ เชื้อรากลุ่ม **Oomycetes** และแบคทีเรียไม่มีความไวต่อยาปฏิชีวนะชนิดนี้เพราะเยื่อหุ้มเซลล์ไม่มี sterol เป็นองค์ประกอบ ที่ความเข้มข้นต่ำ ๆของสารยับยั้งเชื้อรากลุ่มนี้จะไปทำให้คุณสมบัติในการผ่านเข้าออกเยื่อหุ้ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์เปลี่ยนไป โดยทำให้โพแทสเซียมไอออนเกิดการรั่วและที่ความเข้มข้นสูงๆของสารยับยั้งเชื้อรากลุ่มนี้จะทำให้เกิดการรั่วของกรดอะมิโนและสารเมตาบอไลส์อื่น ๆ

มีสารประกอบมากมายที่ไปมีผลต่อการสังเคราะห์ sterol (Koller,1992A) ซึ่งอาจมีผลกระทบกับการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ การสังเคราะห์ทางชีวภาพของสเตอรอลดำเนินจาก acetyl CoA โดยวิถี mevalonic acid (รูปที่ 5) คาร์บอนตำแหน่งที่ 5 ของ isoprenoid เป็นอนุพันธ์ที่ได้จาก mevalonate ซึ่งจะรวมตัวเพื่อให้อยู่ในรูป squalene หลังจากนั้นเกิดปฏิกิริยา cyclization ได้ผลิตภัณฑ์คือ lanosterol

การผลิต ergosterol ในเชื้อรามีการสังเคราะห์ในหลายขั้นตอนจาก lanosterol โดยต้องมีการย้ายหมู่ methyl 2 หมู่ ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 4 และตำแหน่งที่ 14 (Koller,1992A) (รูปที่ 5) และมีการเติมหมู่ methyl ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 24 ตรงแขนง การเกิด Demethylation ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 4 เกิดโดยเอนไซม์ cytochrome P-450 แต่ Demethylation ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 4 ถูกกำจัดออกโดย NADPH-dependent oxidation ได้คาร์บอนไดออกไซด์ หมู่ methyl ที่เติมที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 24 ซึ่งเป็นลักษณะพิเศษของสเตอรอลจากเชื้อราได้มาจากการย้ายหมู่ methyl ของS-adenolmethionine

<u>ผนังเซลล์</u>

การควบคุมเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคโดยการยับยั้งการสร้างผนังเซลล์เป็นกลไกที่ดีที่สุด เพื่อให้ได้มาซึ่งสารยับยั้งเชื้อราแบบจำเพาะเจาะจงทั้งนี้เนื่องจากสารยับยั้งเชื้อราดังกล่าวจะไม่เกิดผลร้ายข้างเคียงต่อสิ่งมีชีวิตที่ราอาศัยอยู่เพราะผนังเซลล์ของเชื้อราประกอบด้วยโพลีแซคคา-ไรด์ไม่พบในสิ่งมีชีวิตที่มันอาศัยอยู่ อย่างไรก็ตามพบว่ามีสารฆ่าเชื้อราที่กลไกการยับยั้งดังกล่าวน้อยมาก (Koller,1992B ; Tkacz,1992) เช่น polyoxin และ nikkomycin เป็นกลุ่มสารประกอบของสารฆ่าเชื้อราที่มีกลไกแบบนี้เพราะมันไม่เป็นพิษต่อมนุษย์และพืช ทั้ง polyoxin และ nikkomycin จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ chitin synthetase โดยจะจับแบบแข่งขันกับ UDP-N-acetylglucosamine ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของเอนไซม์นี้ อย่างไรก็ตาม ทั้ง polyoxin และ nikkomycin สามารถยับยั้งเชื้อราได้น้อยชนิด

<u>การสังเคราะห์กรดนิวคลีอิกและโปรตีน</u>

ได้แก่ ยาปฏิชีวนะพวก cycloheximide , blasticidin S , griseofulvin , kasugamycin และสารสังเคราะห์ของ 5-fluorocytosine

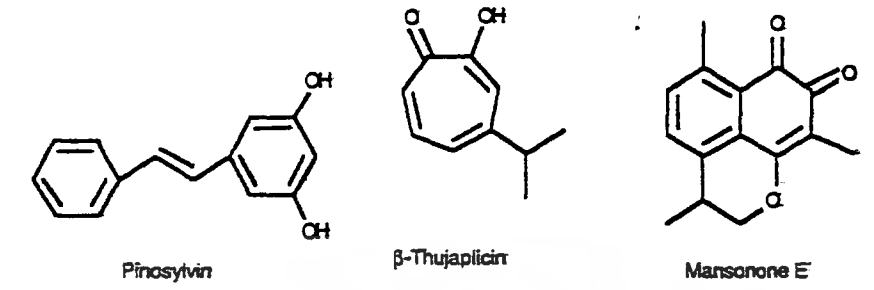
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

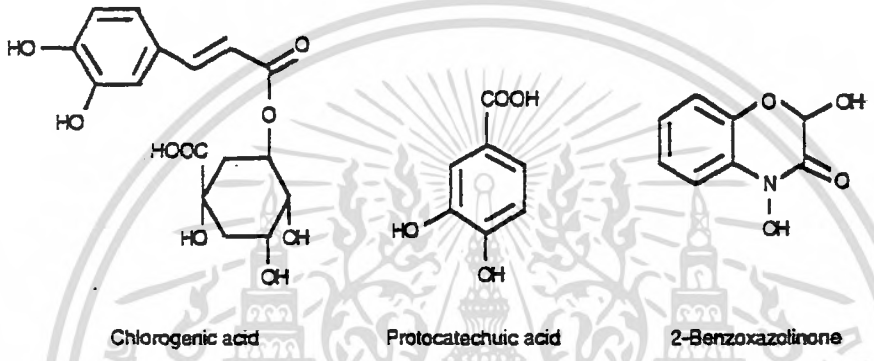
Cycloheximide และ blasticidin S จะมีผลไปยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนโดยรวมตัวกับไรโบโซม แต่ 5-fluorocytosine โดยตัวของมันเองแล้วจะไม่เป็นพิษกับเชื้อรา ถ้าเมื่อใดเชื้อรา Deaminate 5- fluorocytosine ให้เป็น 5-fluorouracil และมีการเติมไรโบสและเกิด phosphorylation ของนิวคลีโอไซด์ได้เป็น 5-FUTP (Koller,1992B) เมื่อ 5-FUMP ถูกเปลี่ยนให้เป็น deoxy 5-FUMP ซึ่งเป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ thimidylate synthase โดยจะไปยับยั้งการสังเคราะห์ DNA นอกจากนี้สารพวก Metalaxyl มีผลยับยั้งการสังเคราะห์ ribosomol RNA แต่มีผลเล็กน้อยต่อการสังเคราะห์ messenger RNA (Davidse และคณะ,1983) Benomyl และสารฆ่าเชื้อราพวก benzimidazole อื่น ๆ ยับยั้งการสังเคราะห์ DNA แต่เป็นไปโดยทางอ้อมและพบว่า ***Oomycetes*** และ ***Zygomycetes*** ไม่มีความไวต่อ benzimidazoles แต่ ***Myxomycetes*** มีความไวต่อสารนี้มาก

<u>การสร้างพลังงานจากกระบวนการเมตาบอลิซึม</u>

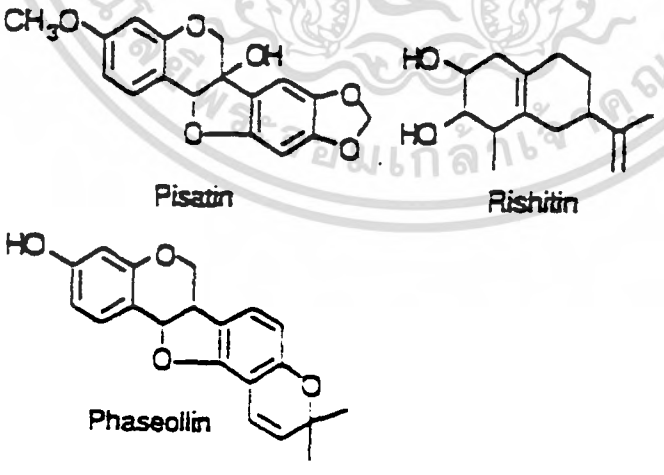
การยับยั้งวิถีต่อไกลโคไลซิส Hexose monophosphate และ Tricarboxylic acid cycle ในเชื้อราจะทำให้เชื้อราไม่สามารถสังเคราะห์สารตัวกลางที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตได้เช่น ATP ยาปฏิชีวนะและสารฆ่าเชื้อราหลายชนิดมีผลต่อการสร้างพลังงานในไมโตคอนเดรีย ที่ขั้นตอนของการขนส่งอิเลคตรอนและขั้นตอนการควบคู่ของ phosphorylation ที่มาสัมพันธ์กัน กลไกการสร้างพลังงานในไมโตคอนเดรียถูกยับยั้งโดยการหยุดการขนส่งอิเลคตรอนในลูกโซ่ไซโตโครม หรือทำให้เกิดขาดการควบคู่ของ phosphorylation จะทำให้กระบวนการใช้ออกซิเจนและ Tricarboxylic acid cycle หยุดลง สาร Thujaplicin (รูปที่ 3) เป็นสารเมตาบอไลส์จากพืชที่ทำให้เกิดการขาดการควบคู่ของ phosphorylation พบว่าที่ความเข้มข้นต่ำมากคือ 10^{-6}-10^{-7} โมล สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ขึ้นบนไม้เน่าเปื่อยได้ (Lyr,1977)นอกจากนี้ยังมีสาร 2,4-dinitrophenol ซึ่งเป็นสารที่ทำให้เกิดการขาดการควบคู่ของ phosphorylation ในกระบวนการขนส่งอิเลคตรอนในไมโตคอนเดรียได้ถูกนำมาใช้เป็นสารป้องกันเนื้อไม้มานานแล้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



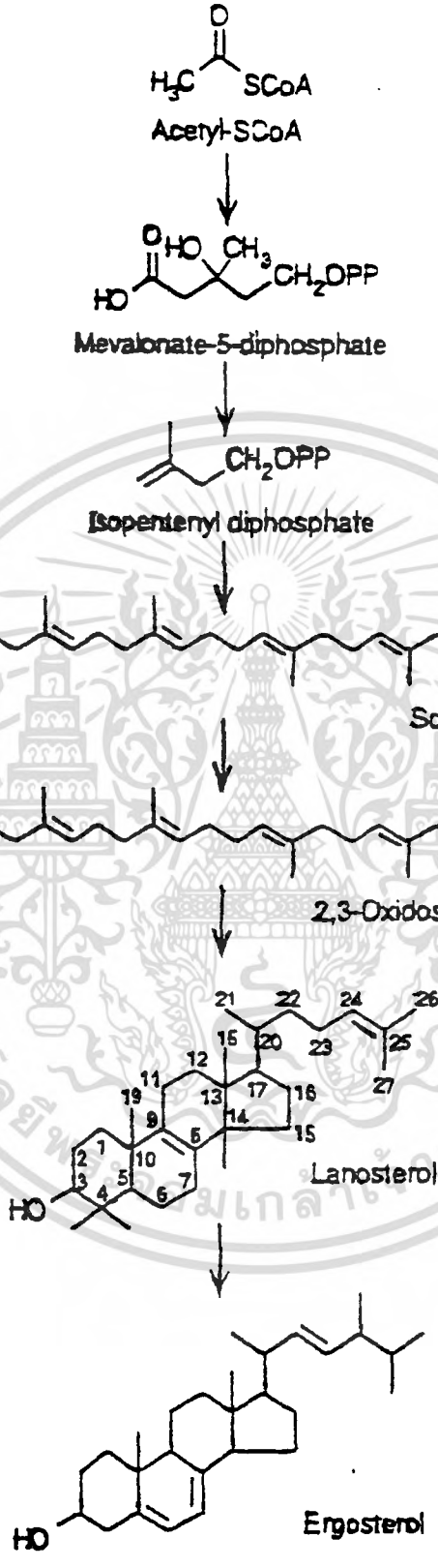


รูปที่ 3 สารกลุ่มอินฮิบิตินที่พบในพืช



รูปที่ 4 ตัวอย่างสารยับยั้งเชื้อราในกลุ่มไฟโตอเลกซิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 5 ชีวสังเคราะห์ของสเตอรอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 Targets of Action of Selected Fungicides

Thiols and other functional groups of enzymes

Copper : Cu^{+} , Cu^{2+}

Mercury : Hg^{+} , Hg^{2+} and organic mercurials

Dithiocarbamates (ziram , ferbam , maneb)

Captan

Benzoquinones and naphthaquinones (chloranil , dichlone)

Cell membranes and lipid metabolism

Polyene macrolides (amphotericin B , nystatin)

Pyridines and pyrimidines (triarimol , fenarimol)

Imidazoles (imazalil , miconazole , ketoconazole)

Triazoles (triadimefon , triadimenol , furconazole)

Energy production

Carboxamides (carboxin , oxycarboxin , flutolanil)

Thujaplicin

Tridemorph

Piercidin A

Antimycin A

Nuclei acid and protein metabolism

Glutarimibes (cycloheximide)

Hydroxypyrimidines (diazinon , ethirimol)

5-Fluorocytosine

Blasticidin S

Acylanilides (metalaxyl , furalaxyl , ofurace)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Cell wall biosynthesis

Polyoxins and nikkomycins

Papulacandins and chaetiacandins

Echinocandins

Melanin biosynthesis

Tricyclazole

Pyroquilon

Fthalide

Nuclear division

Benzimidazoles (benomyl , carbendazim , thiobendazole)

Rhizoxin

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
ขั้นตอนการดำเนินงาน

1. เชื้อจุลินทรีย์

: ***Aspergillus niger***

: ***Trichoderma harzianum***

2. ส่วนใบและส่วนเปลือกของ

: ต้นกาฬพฤกษ์ (***Cassia grandis*** Linn.f.)

: ต้นแคแสด (***Spathodea campanulata*** Beauv.)

: ต้นจามจุรี (***Samanea saman*** Merr.)

: ต้นนนทรี (***Peltophorum pterocarpum*** Bank. ex. Heyne)

: ต้นศรีตรัง (***Jacaranda filicifolia*** (Anders))

3.อุปกรณ์และสารเคมี

<u>อุปกรณ์</u>

1. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)
2. เครื่องชั่ง
3. หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave)
4. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)
5. ชุดสกัดแบบต่อเนื่อง (Soxhlet extractor)
6. เครื่องระเหยภายใต้ความดันสูญญากาศ (Rotary evaporator)
7. แผ่น TLC aluminium silica gel 60 F_{254} สำเร็จรูป
8. Microcapillary pipettes ขนาด 50 ไมโครลิตร
9. โกร่งบดยา
10. เครื่องแก้วต่าง ๆ เช่น หลอดทดลอง จานเพาะเชื้อ ปิเปตต์ บีกเกอร์ ฟลาสก์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

สารเคมี

1. เอทธานอลเข้มข้นร้อยละ 95
2. เฮกเซน
3. คลอโรฟอร์ม
4. อาหารเลี้ยงเชื้อราชนิดแข็ง (Potato Dextrose Agar ; PDA)
5. อาหารเลี้ยงเชื้อราชนิดเหลว (Potato Dextrose Broth ; PDB)

4. วิธีดำเนินการทดลอง

4.1 การสกัดสารสกัดอย่างหยาบจากส่วนใบและเปลือกของต้นพืชชั้นสูงทั้ง 5 ชนิด

วิธีการ

1. นำส่วนใบและเปลือกของต้นพืชที่สนใจ อบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสในตู้อบลมร้อน (Hot air oven)
2. เมื่อใบและเปลือกแห้งพอประมาณ นำมาบดให้ละเอียดด้วยโกร่งบดยา
3. นำส่วนใบ / เปลือกที่บดละเอียดแล้วทำการสกัดด้วยเอทธานอลเข้มข้นร้อยละ 95 ในอัตราส่วน 4 กรัมใบ/เปลือกต่อ 150 มิลลิกรัม เอธานอลเข้มข้นร้อยละ 95 แล้วสกัดด้วยชุดสกัดแบบต่อเนื่อง (Soxhlet extractor) เป็นเวลา 5 ชั่วโมง
4. นำสารสกัดที่ได้ ทำให้เข้มข้นโดยระเหยตัวทำละลายออกด้วยวิธีการระเหยภายใต้สภาวะสูญญากาศ ด้วยเครื่องมือ Rotary evaporator
5. ละลายสารสกัดอย่างหยาบกลับคืนด้วยเอทธานอลเข้มข้นร้อยละ 95 ในปริมาณเพียงเล็กน้อยเพื่อทำให้สารสกัดอย่างหยาบที่ได้มีความเข้มข้นขึ้น

4.2 การศึกษาอิทธิพลของสารสกัดหยาบต่องอกของสปอร์ราตัวทดสอบ

วิธีการ

1. ตัดกระดาษกรองWhatman เบอร์1ให้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.8 เซนติเมตร นำไปอบด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส
2. เตรียมสารแขวนลอยของสปอร์ (spore suspension)เชื้อราตัวทดสอบ ในน้ำกลั่นที่มี tween 80 0.01% ให้มีความเข้มข้นของสปอร์เป็น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

25409

3. ปิเปตสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อรา 1 มิลลิลิตรใส่ในจานเพาะเชื้อ เทอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) 14 มิลลิลิตร ตามลงไป ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ในอาหารแข็ง

4. นำแผ่นกระดาษกรองที่อบแล้วจากข้อ 1 ชุบสารสกัดอย่างหยาบจากพืชแต่ละชนิดที่สกัดได้จากขั้นตอนที่ 4.1แล้วทิ้งไว้ให้แห้ง

5.นำแผ่นกระดาษกรองที่ชุบสารสกัดหยาบแล้ววางลงบนอาหารที่มีสารแขวนลอยของสปอร์ บ่มเชื้อในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

6. หลังจากบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3-4 วัน ตรวจผลโดยดูจากเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใส (Inhibition zone) รอบ ๆ แผ่นกระดาษกรอง ที่เกิดขึ้น

4.3 การศึกษาความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่มีผลต่อการยับยั้งการงอกของสปอร์รา

<u>วิธีการ</u>

1. เตรียมสารแขวนลอยของสปอร์ (spore suspension) เชื้อราในน้ำกลั่นที่มี tween 80 0.01 % ให้มีความเข้มข้นของสปอร์เป็น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

2. ปิเปตต์สารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อรา 1 มิลลิลิตร ใส่ในจาะเพาะเชื้อ เทอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA)14 มิลลิลิตรตามลงไป ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ให้อาหารแข็ง

3. นำสารสกัดหยาบที่สกัดได้จากขั้นตอน 4.1 มาทำให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ กันด้วยตัวทำละลายชนิดเดียวกันกับตัวทำละลายเดิม

4. นำแผ่นกระดาษกรองที่ทำการอบฆ่าเชื้อแล้ว ชุบสารสกัดอย่างหยาบที่ความเข้มข้นต่าง ๆ แล้วทิ้งไว้สักครู่ให้แห้ง

5. นำแผ่นกระดาษกรองที่ชุบสารสกัดหยาบแล้ววางลงบนอาหารที่มีสารแขวนลอยของสปอร์ราแล้วนำไป บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

6. หลังจากบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3-4 วัน ตรวจผลโดยดูจากขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใส (Inhibition zone)ที่เกิดขึ้น

4.4 การเตรียมสารสกัดอย่างหยาบให้แยกเป็น 2 ส่วนในรูปสารที่มีขั้ว (polar) และสารที่ไม่มีขั้ว (non- polar)

<u>วิธีการ</u>

1.นำสารที่สกัดได้อย่างหยาบจากขั้นตอนที่ 4.1 มาแยกส่วนที่ไม่มีขั้วออกด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ด้วยปริมาณเพียงเล็กน้อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ใช้ปิเปตปลายแหลม (plasture pipette) ดูดสารที่ไม่มีขั้ว (ชั้นของเฮกเซน) ซึ่งอยู่ส่วนบน แยกออกจากส่วนสารที่มีขั้ว (ชั้นของเอทธานอล) ซึ่งอยู่ส่วนล่าง

3. ทำตั้งแต่ 1-2 ใหม่จนกว่าส่วนของเฮกเซนจะใส

4.นำทั้งสองส่วนที่ได้ไประเหยเอาตัวทำละลายออกโดยนำไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

5. นำสารสกัดที่ได้มาละลายกลับอีกครั้งด้วยตัวทำละลายเดิมในปริมาตรเพียงเล็กน้อยเพื่อทำให้สารสกัดมีความเข้มข้นขึ้น

4.5 การศึกษาอิทธิพลของส่วนมีขั้ว (polar) และไม่มีขั้ว (non- polar) ของสารสกัดต่อการงอกของสปอร์ราตัวทดสอบ

<u>วิธีการ</u>

1. เตรียมสารแขวนลอยของสปอร์ (spore suspension) เชื้อราในน้ำกลั่นที่มี tween 80 0.01 % ให้มีความเข้มข้นของสปอร์เป็น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

2. ปิเปตสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อรา 1 มิลลิลิตรใส่ในจานเพาะเชื้อ เทอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) 14 มิลลิลิตรตามลงไป ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ให้อาหารแข็ง

3. นำแผ่นกระดาษกรองที่อบแล้วชุบสารสกัดในแต่ละส่วน (ส่วนที่มีขั้วและส่วนที่ไม่มีขั้ว) ของแต่ละต้นพืชแล้ว ทิ้งไว้ให้แห้ง

4.นำแผ่นกระดาษกรองที่ชุบสารสกัดแล้วมาวางลงบนอาหารที่มีสารแขวนลอยของสปอร์บ่มเชื้อในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

5. หลังจากบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 วัน ตรวจผลโดยดูจากเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใส (Inhibition zone) รอบ ๆ แผ่นกระดาษกรองที่เกิดขึ้น

4.6 การศึกษาเบื้องต้นในการแยกสารสกัดชีวภาพที่ได้จากพืชโดยวิธีโครมาโตกราฟฟีแบบแผ่นบาง (Thin-layer Chromatography)

<u>วิธีการ</u>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. ศึกษาตัวทำละลายผสมระหว่างเอธานอล 95% กับคลอโรฟอร์มอัตราส่วนต่างๆที่เหมาะสมในการแยกสารสกัดชีวภาพที่ได้จากพืชโดยวิธีโครมาโตกราฟฟีแบบแผ่นบาง โดยหยดสารสกัดลงบนแผ่นซิลิกาเจลสำเร็จรูป โดยตำแหน่งที่หยดอยู่ห่างจากขอบล่างของแผ่นซิลิกาเจลประมาณ 1 เซนติเมตร นำแต่ละแผ่นไปดีเวลลอป (develop) ในภาชนะที่อิ่มตัวด้วยตัวทำละลายผสมโดยให้ส่วนปลายล่างของแผ่นแช่อยู่ในตัวทำละลายสูงประมาณ 0.5 เซนติเมตร อัตราส่วนระหว่างเอธานอล 95% ต่อคลอโรฟอร์ม ที่ใช้ศึกษามีดังนี้ 1:9 , 2:8 , 3:7 , 4:6 , 5:5 , 6:4 , 7:3 , 8:2 , 9:1

2. เลือกตัวทำละลายที่ให้ผลการแยกสารที่ดีที่สุด

4.7 ศึกษาวิธีการตรวจสอบหาสารที่ยับยั้งการงอกสปอร์ราบนแผ่นทินน์เลเยอร์โครมาโตแกรม 3 วิธี

<u>วิธีการตรวจสอบที่ 1</u>

นำแผ่นทินน์เลเยอร์โครมาโตแกรมวางบนผิวหน้าอาหารวุ้นที่ผสมสารแขวนลอยของสปอร์ราแล้วคืงแผ่นทินน์เลเยอร์โครมาโตแกรมออกจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 วัน สังเกตุบริเวณใสที่เกิดขึ้นเทียบกับชุดควบคุม

<u>วิธีการตรวจสอบที่ 2</u>

เทอาหารวุ้นที่ผสมสารแขวนลอยของสปอร์ราทับบนแผ่นทินน์เลเยอร์โครมาโตแกรมจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 วัน สังเกตุบริเวณใสที่เกิดขึ้นเทียบกับชุดควบคุม

<u>วิธีการตรวจสอบที่ 3</u>

สเปรย์อาหารเหลวที่ผสมสารแขวนของสปอร์ราบนแผ่นทินน์เลเยอร์โครมาโตแกรมจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 วัน สังเกตุบริเวณใสที่เกิดขึ้นเทียบกับชุดควบคุม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การศึกษาอิทธิพลของสารสกัดหยาบของต้นพืชทั้ง 5 ชนิด ต่อการงอกของสปอร์รา 2 ชนิด

ส่วนเปลือกและส่วนใบของต้นพืชทั้ง 5 ชนิด คือ ต้นกาฬพฤกษ์ ต้นแคแสด ต้นจามจุรี ต้นนนทรี และต้นศรีตรัง ได้ถูกนำมาสกัดสารด้วยวิธี Soxhlet extraction จนได้สารสกัดหยาบแล้วนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการงอกของสปอร์รา 2 ชนิด คือ ***Aspergillus niger*** และ ***Trichoderma harzianum*** ผลการทดลองที่ได้ดังแสดงในตารางที่ 2 และ 3

4.2การศึกษาความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่มีผลต่อการยับยั้งการงอกของสปอร์รา *Trichoderma harzianum*

จากผลการศึกษาในข้อ 4.1 พบว่าสารสกัดหยาบจากส่วนใบของต้นจามจุรีและนนทรี มีผลต่อการงอกของสปอร์รา ***Trichoderma harzianum*** และเมื่อนำมาศึกษาความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากส่วนใบของต้นจามจุรีและนนทรีต่อการยับยั้งการงอกของสปอร์รา ***Trichoderma harzianum*** พบว่า

- ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบจากส่วนใบของต้นจามจุรี ที่สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์รา ***Trichoderma harzianum*** เท่ากับ 0.473 กรัมต่อลิตร ดังตารางที่ 4 และรูปที่ 6
- ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบจากส่วนใบของต้นนนทรี ที่สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์รา ***Trichoderma harzianum*** เท่ากับ 4.398 กรัมต่อลิตร ดังตารางที่ 5 และรูปที่ 7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 แสดงผลการทดสอบสารสกัดหยาบจากส่วนใบและเปลือกของพืชทั้ง 5 ชนิดต่อการยับยั้งการงอกของสปอร์รา ***Trichoderma harzianum***

ชื่อพืช	สารสกัดที่ได้จากส่วนใบ	สารสกัดที่ได้จากส่วนเปลือก
กาฬพฤกษ์	ไม่ยับยั้ง	ไม่ยับยั้ง
แคแสด	ไม่ยับยั้ง	ไม่ยับยั้ง
จามจุรี	ยับยั้ง	ไม่ยับยั้ง
นนทรี	ยับยั้ง	ไม่ยับยั้ง
ศรีตรัง	ไม่ยับยั้ง	ไม่ยับยั้ง

ตารางที่ 3 แสดงผลการทดสอบสารสกัดหยาบจากส่วนใบและเปลือกของพืชทั้ง 5 ชนิดต่อการยับยั้งการงอกของสปอร์รา ***Aspergillus niger***

ชื่อพืช	สารสกัดที่ได้จากส่วนใบ	สารสกัดที่ได้จากส่วนเปลือก
กาฬพฤกษ์	ไม่ยับยั้ง	ไม่ยับยั้ง
แคแสด	ไม่ยับยั้ง	ไม่ยับยั้ง
จามจุรี	ไม่ยับยั้ง	ไม่ยับยั้ง
นนทรี	ไม่ยับยั้ง	ไม่ยับยั้ง
ศรีตรัง	ไม่ยับยั้ง	ไม่ยับยั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 แสดงผลการยับยั้งการงอกของสปอร์รา ***Trichoderma harzianum*** จากสารสกัดหยาบจากส่วนใบของต้นจามจุรีที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นของสารสกัด กรัมต่อลิตร	เส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณที่เกิดการยับยั้ง (ซม.)	ขนาดของบริเวณที่เกิดการยับยั้ง (ซม.)
0	0.8	0
0.1	0.8	0
0.19	0.8	0
0.23	0.8	0
0.38	0.8	0
0.47	0.9	0.1
0.95	1.0	0.2
1.89	1.3	0.5
2.34	1.6	0.8
3.79	1.8	1.0
4.73	2.0	1.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 6 แสดงผลการยับยั้งการงอกของสปอร์รา ***Trichoderma harzianum*** จากสารสกัดหยาบจากส่วนใบของต้นจามจุรีที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

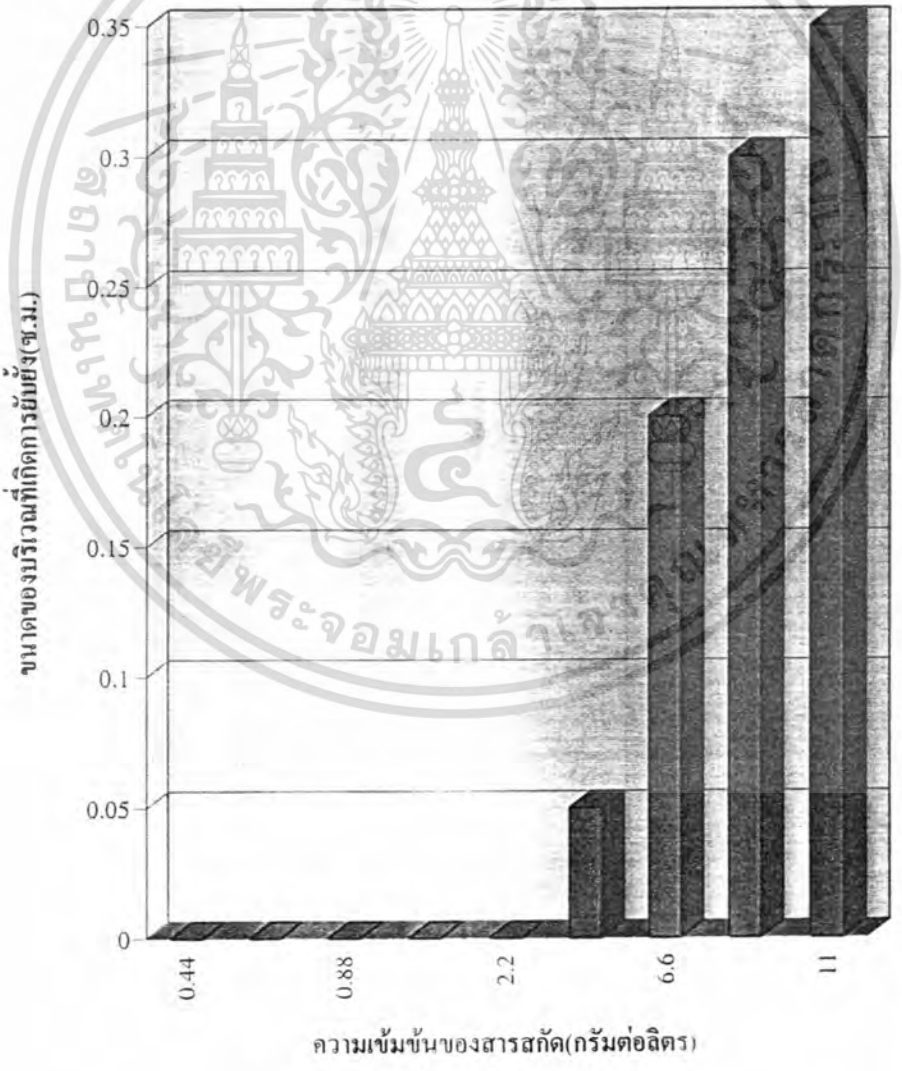
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 แสดงผลการยับยั้งการงอกของสปอร์รา ***Trichoderma harzianum*** จากสารสกัดหยาบจากส่วนใบของต้นนนทรีที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นของสารสกัด กรัมต่อลิตร	เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่เกิดการยับยั้ง (ซม.)	ขนาดของบริเวณที่เกิดการยับยั้ง (ซม.)
0	0.8	0
0.22	0.8	0
0.44	0.8	0
0.66	0.8	0
0.88	0.8	0
1.10	0.8	0
2.20	0.8	0
4.40	0.85	0.05
6.60	1.00	0.20
8.80	1.10	0.30
11.00	1.25	0.35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 7 แสดงผลการยับยั้งการงอกของสปอร์รา *Trichoderma harzianum* จากสารสกัดหยาบจากส่วนใบของต้นนนทรีที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 การศึกษาการยับยั้งการงอกของสปอร์ราในสารที่สกัดจาก เอทธานอล 95% และเฮกเซน

จากผลการศึกษา ในข้อ 4.1 จะเห็นว่า สารสกัดหยาบจากส่วนใบของต้นจามจุรี และต้นนนทรี มีสารยับยั้งการงอกของสปอร์รา ***Trichoderma harzianum*** เมื่อนำสารสกัดหยาบมาแยกสารที่มีขั้วออกจากสารที่ไม่มีขั้วด้วยเฮกเซนและเอทธานอล 95 % โดยสารมีขั้วจะละลายในชั้นของเอทธานอล 95 % และสารไม่มีขั้วจะอยู่ในชั้นของเฮกเซนแล้วนำทั้งสองส่วนมาทดสอบการยับยั้งการงอกของสปอร์รา มีผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แสดงผลการทดสอบสารสกัดในชั้นของเอทธานอล 95 % และสารสกัดในชั้นเฮกเซนที่สกัดจากส่วนใบของต้นจามจุรีและต้นนนทรีต่อการงอกของสปอร์รา ***Trichoderma harzianum***

ชื่อพืช	สารสกัดที่อยู่ในเอทธานอล 95 %	สารสกัดที่อยู่ในเฮกเซน
จามจุรี	ยับยั้ง	ไม่ยับยั้ง
นนทรี	ยับยั้ง	ไม่ยับยั้ง

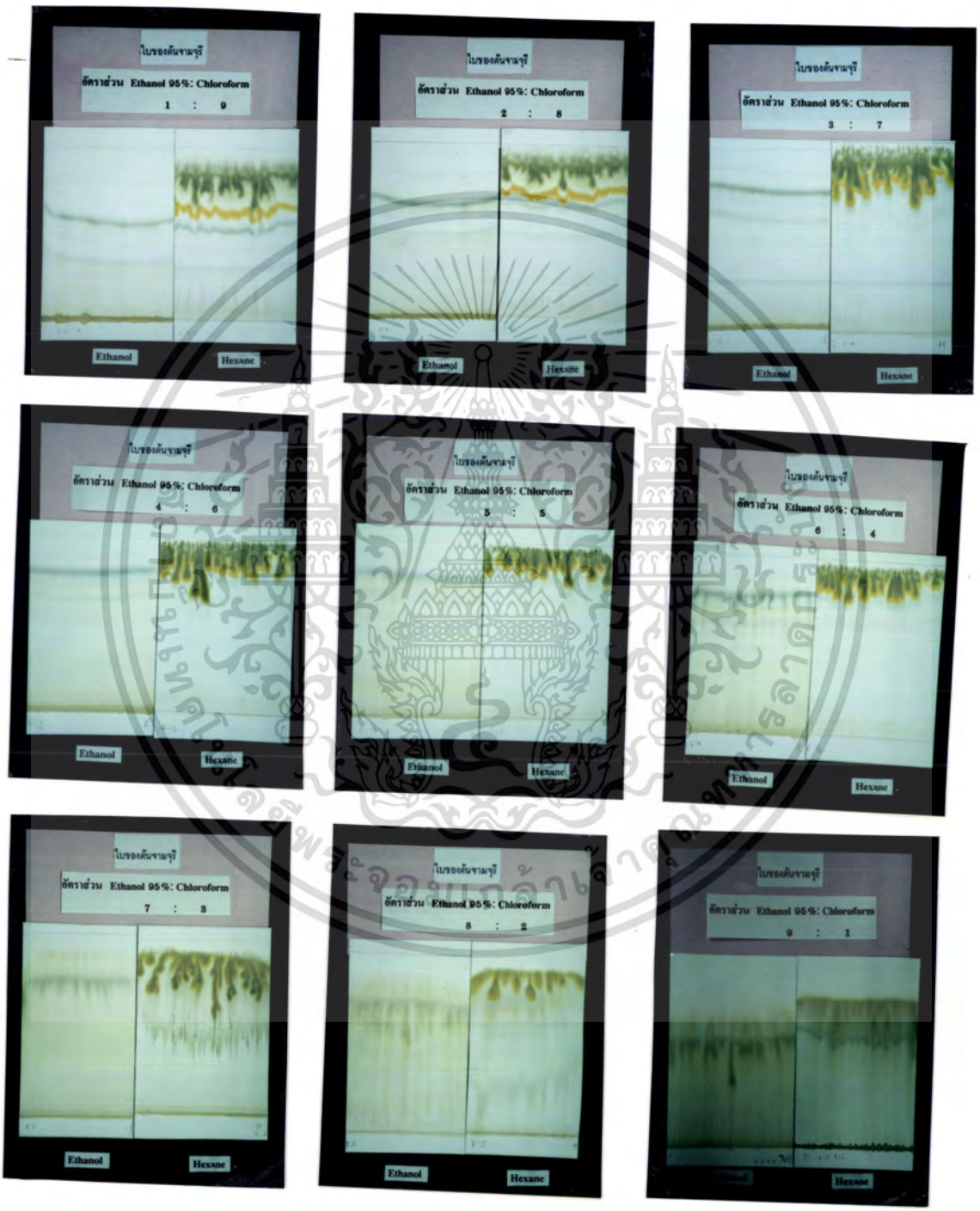
จากการทดลองพบว่า สารยับยั้งการงอกของสปอร์ราของต้นจามจุรีและต้นนนทรี อยู่ในส่วนของตัวทำละลายที่มีขั้วคือเอทธานอล 95 % แต่สารสกัดจากต้นจามจุรีให้ผลชัดเจนกว่าต้นนนทรี

4.4 การศึกษาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสารชีวภาพที่ได้จากสารสกัดจากพืชโดยวิธีโครมาโตกราฟฟีแบบแผ่นบาง

ในการศึกษาใช้สารสกัดจากส่วนใบของต้นจามจุรีที่ได้จากการทดลองข้อ 4.3 หาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสารชีวภาพโดยวิธีโครมาโตกราฟฟีแบบแผ่นบาง

ตัวทำละลายที่ใช้ศึกา คือ เอทธานอล 95 % ต่อคลอโรฟอร์ม ในอัตราส่วน 1:9 , 2:8 , 3:7 , 4:6 , 5:5 , 6:4 , 7:3 , 8:2 , 9:1 ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 8 การแยกสารสกัดที่ได้จากการใช้ตัวทำละลายเอทธานอล 95 % ต่อ คลอโรฟอร์ม ในอัตราส่วนต่าง ๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการศึกษาจึงเลือกใช้ตัวทำละลายคือ เอทธานอล 95 % ต่อ คลอโรฟอร์ม ในอัตราส่วน 2:8 เป็นตัวทำละลายในการแยกสารชีวภาพที่ได้จากสารสกัดจากพืชโดยวิธีโครมาโตกราฟฟีแบบแผ่นบาง ซึ่งสามารถแยกสารออกมาเป็นแถบได้ชัดเจนกว่าตัวทำละลายอื่น ๆ

4.5 การศึกษาวิธีตรวจหาสารยับยั้งการงอกของสปอร์ราบนแผ่นโครมาโตแกรม

นำสารสกัดจากการทดลองในข้อ 4.3 ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการงอกของสปอร์รามาทำการแยกด้วยวิธีโครมาโตกราฟฟีแบบแผ่นบางในตัวทำละลายที่ได้จากการทดลองที่ 4.4 แล้วนำแผ่นโครมาโตแกรมมาศึกษาหาแถบของสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการงอกของสปอร์รา ***Trichoderma harzianum*** วิธีการศึกษาแบ่งเป็น 3 วิธี คือ

1.นำแผ่นทินน์เลเยอร์โครมาโตแกรมวางบนผิวหน้าอาหารวุ้นที่ผสมสารแขวนลอยของสปอร์รา

2. เทอาหารวุ้นที่ผสมสารแขวนลอยของสปอร์ราทับบนแผ่นทินน์เลเยอร์โครมาโตแกรม

3.สเปรย์อาหารเหลวที่ผสมสารแขวนลอยของสปอร์ราบนแผ่นทินน์เลเยอร์โครมาโตแกรม

ผลการทดลองพบว่า วิธีที่ 1 และ 2 ไม่สามารถตรวจหาแถบสารบนแผ่นโครมาโตแกรมที่มีฤทธิ์ยับยั้งการงอกของสปอร์ราได้ แต่วิธีที่ 3 สามารถใช้ตรวจหาสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการงอกสปอร์ราที่อยู่บนแผ่นโครมาโตแกรมได้ โดยพบว่าสารที่มีฤทธิ์ดังกล่าวมีค่า Rf ใกล้เคียง 0 ดังแสดงในรูปที่ 9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 9 แสดงผลการยับยั้งการงอกของสปอร์ราเมื่อทดสอบด้วยวิธีการสเปรย์อาหารเหลวที่ผสมสารแขวนลอยของสปอร์ราทั่วแผ่นโครมาโตแกรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

บทวิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

งานวิจัยเพื่อหาสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้มีการศึกษาค้นคว้ากันอย่างมากมาย ดังเช่น

Roberts W.K.และ Selitrennikoff C.P. (1986) ได้สกัดโปรตีนจากข้าวบาร์เล่ย์และนำมาทดสอบกับเชื้อรา ***Trichoderma reesei*** พบว่าโปรตีนชนิดนี้มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรานี้ได้

Caceres A. และ คณะ (1993) ได้ศึกษาสารต่อต้านเชื้อราจากพืช 52 ชนิดพบว่า 26 ชนิด (50 %) ของพืชที่ศึกษามีผลต่อต้านเชื้อราพวก dermatophytes และมีการรายงานว่าพืชจากอเมริกา 7 ชนิดต้านทานเชื้อราที่ก่อโรคได้ 4 ชนิด คือ ***Aspergillus flavus Epidermophyton floccusum , Microsporium gypseum*** และ ***Trichophyton rubrum*** และพบว่าตัวทำละลายที่ดีที่สุดคือ เอทธานอล ส่วนที่ให้ผลยับยั้งที่ดีที่สุดได้มาจากส่วนเปลือกและส่วนใบของต้นพืช นอกจากนั้นยังพบว่าพืชที่ให้ผลยับยั้งที่ดีที่สุด คือ ***Byrsonima crassifolia , Cassia grandis , Gliricidia sepium*** , และ ***Malpighia glabra*** ส่วนพืชที่ให้ผลในการยับยั้งเพียงเล็กน้อย คือ ***Diphysa robinioides , Rhizophora unangle*** และ ***Cassia occidentalis***

Damodaran S. และ Venkata ramann S. (1994) ได้ศึกษาผลทางเภสัชวิทยาของสารสกัดจากส่วนใบของ ***Cassia alata*** พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ***Pityriasis versicolor*** ที่เกิดโรคในมนุษย์ ซึ่งสารสกัดดังกล่าวไม่ก่อให้เกิดผลข้างเคียงใด ๆ ต่อมนุษย์ จึงสามารถนำมาทำเป็นยาสมุนไพรรักษาโรคที่เกิดจากเชื้อราตัวนี้ได้

Binutu และ Lajubutu (1994) ได้ศึกษาสารสกัดจากส่วนใบและเปลือกของพืชสกุล Bignoniaceae 4 ชนิด คือ ***Jacaranda minosifolia*** D.Dol , ***Tecoma stans*** Linn. , ***Tabebuia rosea*** (Bertol) D.C. และ ***Crescentia cujete*** Linn. ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมบวก , แบคทีเรียแกรมลบและเชื้อรา พบว่าสารสกัดจากใบของ ***Tecoma stans*** มีผลยับยั้งเชื้อรา ***Candida albicans*** และจากการศึกษาทางเคมีเบื้องต้นของสารในพืชเหล่านี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พบว่าเป็นสารพวก แทนนิน (tannins) ,ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ,อัลคาลอยด์ (alkaloids) และ ซาโปนิน (saponins)

Ibrahim D. และ Osman H.(1995) ได้สกัดสารจากใบของต้น ***Cassia alata*** ด้วยเอทธานอลแล้วนำมาทดสอบความสามารถในการต้านทานเชื้อจุลินทรีย์พวกแบคทีเรีย , ยีสต์ , รา ที่ทำให้เกิดโรคผิวหนังและราที่ไม่ทำให้เกิดโรคผิวหนัง พบว่าสารสกัดนี้ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและยีสต์ได้ แต่สามารถยับยั้งการเจริญของราที่ก่อให้เกิดโรคผิวหนังได้ เชื้อราเหล่านี้ได้แก่ ***Trichophyton mentagorphytes*** var. ***interdigitale*** , ***Trichophyton mentagorphytes*** var. ***mentagorophytes*** , ***Trichophyton rubrum*** และ ***Microsporum gypseum***

การตรวจดูประสิทธิภาพของสารยับยั้งเชื้อราในขั้นแรกสามารถวิเคราะห์ได้จากการทดลองทางชีววิทยาในหลอดทดลอง และตามด้วยการทดสอบปฏิบัติจริงกับ host หรือวัสดุที่เราต้องการปกป้อง/ป้องกันการบุกรุกจากเชื้อรา The American Phytopathological Society ได้พัฒนาวิธีการทดสอบที่เรียกว่า slide germination test โดยสารแขวนลอยของสปอร์ถูกผสมเข้ากับอาหารที่เหมาะสมต่อการงอกของสปอร์รวมกับสารยับยั้งเชื้อราที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ต้องการทดสอบ ซึ่งแต่ละหยดของสารผสมนี้จะถูกวางลงบน microscope slides และนำไปบ่ม แล้วสังเกตเปอร์เซ็นต์การงอกของงสปอร์รา นอกจากวิธีการดังกล่าวแล้วการวัดการเจริญของเส้นใยราโดยสังเกตจากเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อรา เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ใช้ในการศึกษาสารที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อรา การวัดโดยวิธีนี้จะให้ผลแตกต่างจากการวัดโดยวิธีแรก ตัวอย่างเช่น สาร dicarboximides สามารถยับยั้งการงอกของโคนิเดียของเชื้อ ***Botrytis cinerea*** ได้น้อยกว่าการยับยั้งเจริญของเส้นใยรา (Pommer,1978) ดังนั้นการเลือกใช้วิธีใดจะขึ้นอยู่กับจุดประสงค์ที่จะนำไปใช้ เช่น สารประกอบที่ใช้ในการป้องกันการติดเชื้อเริ่มต้นโดยสปอร์วิธีการทดสอบแบบ Spore germination assay จะเป็นวิธีที่เหมาะสม แต่วิธีที่วัดการเจริญของเส้นใยราจะเป็นวิธีที่เหมาะสมต่อการหาสารเพื่อใช้รักษาโรคที่เกิดจากเชื้อรา

ระดับความไวของเชื้อราแต่ละชนิด ต่อสารยับยั้งเชื้อราแต่ละตัวไม่เหมือนกัน เช่นเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคต่อสัตว์จะต้านทานต่อ cycloheximide ในขณะที่เชื้อราที่ไม่ก่อให้เกิดโรคและเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคต่อพืชจะมีความไวต่อยาตัวนี้ ด้วยเหตุผลนี้จึงใช้ประโยชน์จากข้อมูลดังกล่าวในการทำ selective medium เพื่อใช้บ่งชี้ว่าเชื้อราที่ทดสอบมีความว่องไวหรือต้านทานต่อสารยับยั้งตัวใด เช่นเชื้อ ***Saccharomyces pastorianus*** สามารถต้านทานcycloheximideได้ที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระดับความเข้มข้น 0.2 ไมโครโมล ในขณะที่ Histoplasma และ Trichophyton การต้านทานcycloheximide ได้ที่ระดับความเข้มข้นสูงถึง 3.6 มิลลิโมล (Gundersen K. และ Wadstein T. 1962 , Salkin I.F. และ Hurd N. 1972) ซึ่งช่วงความเข้มข้นที่ได้นี้ทำให้สามารถแบ่งชนิดของเชื้อราตามความต้านทานหรือความว่องไวต่อ cycloheximide ได้ 3 รูปแบบ คือ

1. พวกที่มีความไวมาก คือ พวกที่ถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์ด้วยความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมล หรือน้อยกว่า

2. พวกที่มีความไวปานกลาง คือ พวกที่ถูกยับยั้งที่ความเข้มข้นของ cycloheximide 0.18-1.8 มิลลิโมล

3. พวกที่ต้านทานได้ คือ พวกที่ไม่ถูกยับยั้งหรือถูกยับยั้งน้อยมากที่ความเข้มข้น 0.18 มิลลิโมล และมักจะเป็นการยับยั้งแบบไม่สมบูรณ์ที่ความเข้มข้นสูง ๆ (ประมาณ 18 มิลลิโมล)

ในเชื้อรา 2 กลุ่มแรกจะเป็นพวกที่ก่อโรคและไม่ก่อโรคแก่พืช ในขณะที่กลุ่มที่ 3 จะเป็นพวก zoopathogenic fungi แต่ยกเว้น zoopathogenic yeast เช่น ***Cryptococcus neoformans*** มีความไวต่อ cycloheximide 18 ไมโครโมล หรือน้อยกว่า ซึ่งชี้ให้เห็นว่าที่ระยะ yeast phase ของ zoopathogen ที่ 37 องศาเซลเซียส มีความไวต่อ cycloheximide มากกว่า mycelial phaseที่ 25 องศาเซลเซียส (McDonough E.S. และคณะ 1960)

ความหลากหลายในความไวต่อสารยับยั้งเชื้อราแต่ละชนิดอาจมีผลจากความสามารถในการย่อยสลายสารยับยั้งเชื้อราให้มีความเป็นพิษลดลงของเชื้อราแต่ละชนิด การลดความเป็นพิษของสารยับยั้งเชื้อราอาจเกิดโดยปฏิกิริยา Demethylation , Reduction , Hydration หรือ Dehydrogenation (VanEtten H.D.,1982) เช่น เชื้อ ***Nectria haematococca*** สามารถลดความเป็นพิษของ pisatin ได้โดยใช้เอนไซม์ pisatin demethylase และตัวอย่างที่แสดงดังตารางข้างล่างนี้

เชื้อรา	ไฟโตเลกซิน	เอนไซม์
Nectria haematococca	Pisatin	pisatin demethylase
	Maackiain	Maackiain monooxygenase
Fusarium solani	Kievitone	Kievitone hydratase
Ascochyta rabei	Medicarpia and Maackiain	NADPH-dependent reductase
Gibberella pulicaris	Lubimin and Rishitin	Not identified

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อย่างไรก็ตามการต้านทานที่ได้จากการทดลองเชิงปฏิบัติจริงกับความต้านทานที่ได้จากการทดลองในห้องทดลอง อาจให้ผลไม่เหมือนกัน เชื้อราที่ต่อต้าน-ต้านทาน ต่อสารยับยั้งเชื้อราได้อาจจะเกิดจากการปรับตัวให้อยู่รอดได้ในสภาพนั้น ๆ ซึ่งอาจเป็นการปรับสภาพทางสรีรวิทยาให้ทนต่อการได้รับหรือการเจริญในที่ ๆ มีสารยับยั้งเชื้อราหรืออาจจะเป็นการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพันธุกรรมโดยการกลายพันธุ์ให้ต้านทานสารยับยั้งดังกล่าว

การที่เชื้อราอยู่ในสารฆ่าเชื้อรานาน ๆ ความไวต่อสารฆ่าเชื้อราก็จะลดลง เมื่อนำมาทดสอบในครั้งต่อ ๆ ไป สารฆ่าเชื้อราก็จะไม่มีผลในการยับยั้งเชื้อราได้อีกถ้าการต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อราเกิดจากการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพันธุกรรม แต่ถ้าเป็นการปรับตัวทางกายภาพการถูกยับยั้งโดยสารฆ่าเชื้อราก็ยังปรากฏอยู่ได้อีกเมื่อนำมาทดสอบในครั้งต่อ ๆ ไป

จากการทดลองสามารถสรุปได้ว่า

1.วิธีการสกัดสารจากใบและเปลือกของพืชทั้ง 5 ชนิดใช้วิธี Soxhlet Extraction ด้วยตัวทำละลายเอทธานอล 95 % นาน 5 ชั่วโมง

2.สารสกัดหยาบที่ได้จากส่วนใบของต้นจามจุรีและต้นนนทรีสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์รา ***Trichoderma harzianum*** ได้

3.สารสกัดหยาบที่ได้จากส่วนใบและเปลือกของพืชทั้ง 5 ชนิดไม่สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์รา ***Aspergillus niger*** ได้

4.ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบจากส่วนใบของต้นจามจุรีที่ให้ผลการยับยั้งการงอกของสปอร์รา ***Trichoderma harzianum*** ได้มีค่าเท่ากับ 0.47 กรัมต่อลิตร

5.ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบจากส่วนใบของต้นนนทรีที่ให้ผลการยับยั้งการงอกของสปอร์รา ***Trichoderma harzianum*** ได้มีค่าเท่ากับ 4.40 กรัมต่อลิตร

6.สารสกัดที่ละลายอยู่ในส่วนที่มีขั้ว (ส่วนที่อยู่ในเอทธานอล 95 %) จากส่วนใบของต้นจามจุรีและต้นนนทรีมีฤทธิ์ในการยับยั้งการงอกของสปอร์รา ***Trichoderma harzianum*** ได้

7.ตัวทำละลายที่เหมาะสมในการทำทินน์เลเยอร์โครมาโตกราฟฟีของสารสกัดจากส่วนใบและเปลือกของพืชทั้ง 5 ชนิด คือ เอทธานอล 95 % ต่อ คลอโรฟอร์ม ในอัตราส่วน 2 : 8

8.วิธีการพ่นอาหารที่มีสารแขวนลอยของสปอร์ราทั่วแผ่นทินน์เลเยอร์โครมาโตแกรมสามารถตรวจหาสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการงอกของสปอร์ราบนแผ่นทินน์เลเยอร์โครมาโตแกรมได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

9.สารที่ตรวจพบบนแผ่นทินน์เลเยอร์โครมาโตแกรม่ที่มีคุณสมบัติยับยั้งการงอกของสปอร์ รามีค่า R_f ใกล้เคียง 0

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

Soxhlet Extractor

เป็นวิธีการสกัดแบบต่อเนื่อง โดยใช้ตัวทำละลายซึ่งมีจุดเดือดต่ำ การสกัดทำได้โดยใช้ความร้อนทำให้ตัวทำละลายในฟลาสก์ระเหยขึ้นไป แล้วกลั่นตัวลงมาในทิมเบิล ซึ่งบรรจุสมุนไพรไว้ เมื่อตัวทำละลายใน extracting chamber สูงถึงระดับจะเกิดกาลักน้ำ สารสกัดจะไหลกลับลงไปในฟลาสก์ ด้วยวิธีการกาลักน้ำ ฟลาสก์นี้จะได้รับความร้อนจาก heating mantleหรือหม้ออังไอน้ำ ตัวทำละลายจึงระเหยขึ้นไปทิ้งสารสกัดไว้ในฟลาสก์ ตัวทำละลายเมื่อกระทบ condenser จะกลั่นตัวกลับลงมาสกัดสารใหม่ วนเวียนเช่นนี้จนกระทั่งการสกัดสมบูรณ์ การสกัดด้วยวิธีนี้ใช้ความร้อนด้วยจึงอาจทำให้สารเคมีบางชนิดสลายตัว

Distillation in vacuo

เป็นวิธีการระเหยแห้งโดยการกลั่นตัวทำละลายออกที่อุณหภูมิต่ำ และลดความดันลงให้เกือบเป็นสูญญากาศโดยใช้ vacuum pump เครื่องมือนี้เรียกว่า Rotary evaporator ประกอบด้วย 3 ส่วนคือ distillation flask , condenser , และ receiving flask Distillation flask จะหมุนอยู่ตลอดเวลาที่ทำงาน และ แช่อยู่ในหม้ออังไอน้ำเพื่อให้การกระจายของความร้อนทั่วถึงและสม่ำเสมอ เครื่องมือที่ดีจะต้องมีระบบการทำสูญญากาศที่ดี ระยะระหว่าง distillation flask และ condenser สั้น และมีระบบทำความเย็นของ condenser ที่ดี

Thin-layer Chromatography (TLC)

เป็นการแยกสารโดยใช้ stationary phase ซึ่งแผ่เป็นแผ่นเคลือบบน support ซึ่งอาจเป็นแก้ว aluminium หรือ polyethylene เมื่อหยดสารผสมลงบน stationary phase แล้วจึงนำแผ่น TLC ที่ได้ไปใส่แทงค์ (Tank) ซึ่งบรรจุ mobile phase ที่เหมาะสมเพื่อให้เกิดกระบวนการที่ตัวทำละลายจะเคลื่อนที่ผ่านไปบน stationary phase ซึ่งเรียกว่า development ขณะที่เกิด development สารก็จะแยกออกจากกัน กลวิธีในการแยกจะมีทั้งการดูดซับ (adsorption) และ partition แต่จะมีกลวิธีใดมากกว่า ขึ้นกับว่าแผ่น TLC ที่เตรียมขึ้นนั้นถูกนำไป activate หรือไม่ การ activate

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แผ่น TLC โดยอบที่ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลาครึ่งชั่วโมง จะทำให้น้ำระเหยออกไปจากอนุภาค (particle) ของตัวดูดซับ (adsorbent) ทำให้กลวิธีเป็นการดูดซับ (adsorption) มากกว่า partition แต่ถ้าไม่ได้นำ plate ไป activate น้ำที่จับอยู่ที่อนุภาค (particle) จะทำหน้าที่เป็น liquid stationary phase จะมี partition mechanism เกิดมากกว่าเดิม น้ำที่เคลือบอยู่นี้มาจากความชื้นในอากาศนั่นเอง

TLC มีข้อดีกว่า Paper Chromatography (PC) หลายอย่าง คือ

1. ใช้เวลาในการ develop น้อยกว่า

2. ไม่มี fiber ทำให้ band diffusion หรือ zone broading น้อยลง ทำให้การแยกสาร (separate) ดีขึ้น

3. ใช้กับน้ำยาที่มีฤทธิ์กัดรุนแรงได้

4. ใช้กับตัวอย่างน้อยกว่า จึงมีความไวในการตรวจสอบมากกว่า PC

TLC ที่ใช้มีหลายขนาด ได้แก่

1. Microscopic slide TLC เป็น TLC ขนาดเล็กใช้แผ่น microscopic slide ใช้แยกสารโดยใช้เวลาสั้น เช่น แยกสาร 4 ชนิด ในเวลา 5 นาที เตรียมง่าย ไม่ต้อง activate โดยมากใช้ทางคุณภาพ (qualitative) เช่น ตรวจ synthetic reaction หรือตรวจส่วน (fraction) ของ column chromatography ที่มีสารไม่มากชนิดนัก

2. Macro-layer TLC เป็น TLC ที่ใช้ทั่วไป และมีขายสำเร็จรูป มีขนาด 5*20 , 10*20 , 20*20 เซนติเมตร ความหนาของ adsorbent เท่ากับ 0.25 มิลลิเมตร ใช้ทั้งทางคุณภาพ (qualitative) และ ทางปริมาณ (quantitative)

3. Preparative TLC เป็น TLC ที่มีตัวดูดซับ (adsorbent) หนาขึ้นถึง 2 มิลลิเมตร ใช้เมื่อแยกสารปริมาณมากขึ้น เช่นเดียวกับ Macro-layer TLC

Adsorbent สำหรับ TLC

Adsorbent สำหรับ TLC มีขนาด 125-250 ไมครอน Adsorbent สำหรับ TLC จำเป็นต้องผสมกับสารที่ช่วยให้ ติดแน่นกับแผ่นแก้ว หรือแผ่น support ชนิดอื่น สารเหล่านี้เรียกว่า binder ที่ใช้กันมาก ได้แก่

1. plaster of paris or gypsum (hydrated calcium sulfate) 5-15 % ใช้ตัวย่อว่า G

2. starch 1-3 % ใช้ตัวย่อว่า S

3. low molecular weight silicon dioxide หรือ hydrated silicon dioxide ใช้ตัวย่อว่า H

4. organic polymer เช่น polyvinyl alcohol

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บางครั้งยังผสมสารซึ่งเรืองแสงลงไปใน adsorbent ด้วย โดยผสม phosphor (F) ซึ่งเมื่อถูกกับแสงอุลตร้าไวโอเลต (UV light) จะเรืองแสง ส่วนที่เป็นตำแหน่งของสาร สารจะบังไม่ให้ phosphor ถูกกับแสงอุลตร้าไวโอเลต (UV) จึงปรากฏเป็น dark spot ดังนั้นการเลือกซื้อ adsorbent จึงต้องเลือกชนิดที่เหมาะสมกับงาน Adsorbent ที่ใช้มากได้แก่ Silica gel ซึ่งจะมีชนิดต่าง ๆ เช่น Silica gel GF_{254} หมายถึง Silica gel ที่มี gypsum เป็น binder และเรืองแสงที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร มี 2 ชนิด คือ F_{254} และ F_{366} ตัวเลขที่กำกับ F แสดงถึงความยาวคลื่นที่สารเรืองแสง นอกจากนี้ยังมี Silica gel ที่ไม่มี binder (Silica gel N) ที่บริสุทธิ์เป็นพิเศษ (HR) Silica gel สำหรับทำ plate ที่หนาขึ้นคือ preparative TLC ใช้ P เป็นต้น สำหรับ alumina ก็เช่นเดียวกัน แต่ยังต้องเลือกอีกด้วยว่าเป็น กรด ด่าง หรือเป็นกลาง

Application of sample

เตรียมสารละลาย (solution) ที่มีความเข้มข้น 0.1-1 % ในตัวทำละลายอินทรีย์ และ spot 1-10 µl พยายามให้ spot เล็กไม่เกิน 2.5 มิลลิเมตร การ spot อาจใช้ capillaries , micro syringes , micro bulb pipette หรือ microcaps , platinum loop หรือ graduated micropipette

ในกรณีของ preparative TLC เราจะใช้วิธีลาก (streak) หรือ spot ติดกันเป็นแถบ ซึ่งสามารถ spot ได้ ตั้งแต่ 1 ไมโครลิตร - 1.0 มิลลิลิตร (0.01 มิลลิกรัม-10 มิลลิกรัม)

Development

นำ plate ที่ spot sample แล้วไป develop ใน tank ซึ่ง presaturate ด้วย ตัวทำละลาย (solvent) ที่จะใช้ในการ saturate อาจใช้กระดาษกรองชุบ solvent วางแนบไปกับผนังของ tank ที่ใช้

การวิเคราะห์ทางด้านคุณภาพ

ในการวิเคราะห์ chromatogram ที่ได้ เราใช้ค่า Retardation factor หรือ Relative Front (Rf) ซึ่งคำนวนได้จาก

Rf = ระยะที่สารเคลื่อนที่ / ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่

แต่เนื่องจากค่าที่ได้เป็นทศนิยม บางทีจึงใช้ค่า Rfs หรือ hRf

hRf = 100 Rf

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค่า Rf ไม่ค่อยจะคงที่ แตกต่างกันทุกครั้ง เนื่องจากการควบคุมสภาวะที่ทดลองให้คงที่ทุกครั้งทำได้ยาก จึงมีผู้ใช้ค่า Rr หรือ Rx หรือ Rst ซึ่งคำนวนได้จากสมการ

Rr = ระยะทางที่สารที่เราไม่ทราบ (unknown) เคลื่อนที่ / ระยะทางที่ตัวมาตรฐาน (standard) เคลื่อนที่

Tailing

เป็นปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นบน TLC plate เมื่อสารเคลือบที่ไปเป็นทาง เกิดขึ้นด้วยสาเหตุต่าง ๆ คือ

1. เนื่องจากกรด หรือ ด่างอ่อน เมื่อใช้ตัวทำละลาย ซึ่งเป็นกลางจะทำให้บางส่วนแตกตัว บางส่วนไม่แตกตัว พวกที่แตกตัวจะมีขั้วมากกว่า จึงเคลื่อนที่ช้ากว่า วิธีแก้ เติมกรดหรือด่างลงไปเพื่อไม่ให้มีการแตกตัว

2. เป็นคุณสมบัติของสาร ต้องเปลี่ยนตัวทำละลายใหม่

3. เนื่องจากใช้ตัวอย่างมากเกินไป แก้โดย spot ให้น้อยลง

การตรวจเอกลักษณ์ของสารโดยใช้ TLC เพียงอย่างเดียวไม่พอ เนื่องจากสารต่างชนิดกันอาจมี Rf value เท่ากันก็ได้ เพื่อให้แน่นอนยิ่งขึ้นควร develop โดยใช้ตัวทำละลายต่าง ๆ กันอย่างน้อย 3 ระบบ นอกจากนี้ Rf value ของสารตัวเดียวกันเมื่ออยู่เดี่ยว ๆ และในรูปสารผสมอาจไม่เท่ากัน จำเป็นต้องใช้ Co-chromatographic technique โดย spot standard ลงที่เดียวกับสารผสม ถ้ายังได้ spot เดียวที่ตำแหน่งนั้น จึงเป็นสารเดียวกัน

การประยุกต์ใช้ TLC ในการศึกษาสารเคมีจากสมุนไพร

1. ใช้วิเคราะห์หาสารเบื้องต้นว่ามีกี่ชนิด และบางครั้งอาจบอกได้ว่าเป็นสารประเภทใด

2. ใช้เป็นวิธีวิเคราะห์เบื้องต้นเพื่อหาระบบของตัวทำละลายสำหรับ column chromatography

3. ใช้ตรวจสอบส่วน (fraction) ที่ได้จาก column chromatography เพื่อรวมส่วน (fraction) ที่เหมือนกัน

4. แยกสารบางชนิดที่มีปริมาณน้อย

5. ใช้แยกสารปริมาณมาก ซึ่งแยกโดยวิธี column chromatography ไม่ได้ผล

6. ใช้หาปริมาณสารในสารผสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กองบรรณาธิการวารสารบ้านและสวน . 2525 . สารานุกรมไม้ประดับในประเทศไทย เล่มที่ 3

คณะกรรมการฝ่ายหาทุน มูลนิธิสวนหลวง ร.9 . 2530 . พรรณไม้ในสวนหลวง ร.9

วิทย์ เที่ยงบูรณธรรม . 2530 . พจนานุกรมไม้ดอกไม้ประดับในเมืองไทย เล่ม 1-2

ถนอมศรี วงศ์รัตนาสถิตย์ . 2534 . ยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ กรุงเทพฯ : คณะเภสัชศาสตร์ มหิดล

สมสุข มัจฉาชีพ . 2534 . พืชสมุนไพร (MEDICINAL PLANTS) . ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ . มหาวิทยาลัยบูรพา.

Binutu OA. Lajubutu BA. 1994 . Antimicrobial potentials of Someplant species of the Bignonisceae family . American Journal of Medicine and Medical Sciences 23 (3) : 269-273.

Brambl , R. , and Gade , W. 1985 . Plants seed lectins disrupt growth of germinating fungal spores . Physiol . Plant 64 : 402-408.

Caceres A . 1993 . Plants used in Guatemala for treatment of dermatophytic infections . 2. Evaluation of antifungal activity of seven American plants . Journal of Ethnopharmacology 40 (3) : 207-213.

Callow , J.A. 1977 . Recognition , resistance , and the role of plant lectins in host-parasite interactions . Adv. Bot. Res. 4 : 1-44.

Damodaran S. and Venkataraman S. 1994 . A Study on the therapeutic efficacy of ***Cassia alata*** , Linn. leaf extract againt ***Pityriasis versicolor*** . Journal of Ethnopharmacology 42 (1) : 19-23.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Davidse , L.C. , Hofman , A.E. , and Velthuis , G.C.M. 1983. Specific interference of metal axyl with Endogenous RNA polymerase activity in isolated nuclei from phytophyhora megasperma f. sp. medicaginis. Exp. Mycol. 7 : 344-361.

Deverall , B.J. 1976 . Current perspectives in research on phttoalexins . In Journal Friend and D.R.Threfall (eds.) : Biochemical Aspects of Plant-Parasite Relationships , pp. 207-223 . Academic Press , London

Gundersen , K. , and Wadstein , T. 1962 . Mophological changes and resistance induced in ***Saccharomyces pastorianus*** by the antibiotic cycloheximide . Journal Gen. Microbiol. 28 : 325-332.

Ibrahim D , Osman H. 1995 . Antimicrobial activity of ***Cassia alata*** from Malaysia . Journal of Ethnopharmacology 45 (3) : 151-156.

Kleinschuster , S.J. , and Baker , R. 1974 . Lectin detectable differences in carbohydrate containing surface moieties of macroconidia of ***Fusarium roseam*** "*Avenaceum* " and ***Fusarium solani*** . Phytopathology 64 : 394-399.

Koller , W. 1992. Antifungal agents with target sites in sterol fungtions and biosynthesis. In W. Koller (ed.) : Target sites of fungicide action , pp. 119-206. CRC Press , Boca Raton , FL.

Koller , W. 1992. Target research in the discovery and development of antifungal inhibitors. In W. Koller (ed.) : Target sites of fungicide action , pp. 255-310. CRC Press , Boca Raton , FL.

Lyr , H (ed.) : 1977. Mechanism of action of fungicides. In J.G.Horsfall and E.B.Cowling (eds.) : Plant disease. vol. 1 , pp. 239-261. Academic Press , New York.

Lyr , H. 1987. Aromatic hydrocarbon fungicides. In H. Lyr (ed.) : Modern Selective Fungicides , pp. 63-73. Longman Scientific and Technical , Essex , England.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Matsuo A. , Nozaki H. , Suzuki M. , Nakayama M. 1985 . J. Chem. Res., Synop.,174.

Mitscher A. , Lester , Drake Steven , Gollapudi R. , and Okwute K. Simon . 1987 . A modern look at Folkloric use of Anti-infective Agents . J. Nat Prod. vol. 5 , No. 6 , pp. 1025-1040.

Mitscher L.A. and Raghav Rao G.S.1984. Natural Products and Drug Development. pp. 193-212.

Mc Callan , S.E.A. 1967. History of Fungicides. In D.C. Torgeson (eds.) : Fungicides. vol. 1 , pp. 1-37. Academic Press, New York.

McDonough , E.S. , Georg , L.K. , Ajello , L. , and Brinkman , S. 1960 . Growth of dimorphic human pathogenic fungi on media containing cycloheximide and chloramphenical . Mycopathol . Mycol . Appl . 13 : 113-120.

Mirelman , D. , Galun , E. , Sharon , N. , and Lotan , R. 1975 . Inhibition of fungal growth by wheat germ arrlutinin . Nature 256 : 414-416.

Pommer , E.H. , and Lorenz , G. 1987 . Dicarboximide fungicides . In H. Lyr (ed.) : Modern Selective Fungicides , pp. 91-106. Longman Scientific & Technical , Essex , England .

Ritter , G. , Kluge , E. , and Lyr , H. 1973. Be Zichungen Zwischen Carboxin Resistenz und Glykolytischer Potenz bei pilzen. Z. Allg. Mikrobiol. 13 : 243-250.

Roberts WK. and Selitrennikoff CP. 1986 . Isolation and partial characterization of two antifungal protein from barley . Biochemica et Biophysica Acta 880 (2-3) : 161-170.

Salkin , I.F. , and Hurd , N. 1972 . Quantitative evaluation of antifungal properties of cycloheximide . Antimicrob. Agents Chemother . 1 : 177-184.

Scheffer , T.C. , and Cowling , E.B 1966. Natural Resistance of wood to microbial deterioration. Annu. Rev. phytopathol. 4 : 147-170.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Tkacz , J.S. 1992. Glucan biosynthesis in fungi and its inhibition. In J.A. Sutcliffe and N.H. Georgopapadakou (eds.) : Emerging targets in Antibacterial and Antifungal chemotherapy , pp. 495-523. Chopman and Hall , New York.

VanEtten , H.D. , Matthews , D.E. , and Smith , DA. 1982 . Metabolism of phytoalexins . In J.A. Bailey and J.W. Mansfield (ed.) : Phytoalexins , pp. 181-217. Blackie , Glasgow.

Yamaguchi , I. , and Kubo , Y. 1992. Target sites of melanin biosynthesis inhibitors. In W. Koller (ed.) : Target sites of Fungicide Action , pp. 101-118. CRC Press, Boca Raton , FL.

Zabel , RA. , and Morrell , J.J. 1992. Wood microbiology. Academic Press , San Diego. 476 pp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้