

ในปัจจุบันโลกของเรากำลังประสบกับปัญหาสิ่งแวดล้อมอย่างมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งปัญหามลพิษที่เกิดจากขยะพลาสติกที่ย่อยสลายยาก รวมถึงปัญหาการขาดแคลนแหล่งทรัพยากรธรรมชาติที่สำคัญ ได้แก่ ฟอสซิล ที่เป็นแหล่งของน้ำมัน และสารประกอบปิโตรเคมีชนิดต่าง ๆ ซึ่งกำลังจะหมดไปในอีก 40 ปีข้างหน้า จึงนับว่าเป็นปัญหาเหล่านี้เป็นปัญหาหลักที่ประเทศไทยจะต้องให้ความสนใจเป็นพิเศษที่จะต้องหาแหล่งของวัสดุชีวภาพ (biomaterial) ที่ย่อยสลายได้และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมเพื่อทดแทนการใช้พลาสติก รวมถึงหาแหล่งพลังงานทดแทนที่ยั่งยืนอย่างเร่งด่วน แหล่งของวัสดุชีวภาพและแหล่งพลังงานทดแทนที่สำคัญแหล่งหนึ่งคือสารประกอบในกลุ่มไฮโดรคาร์บอน ที่ได้จากการสังเคราะห์โดยกระบวนการทางชีวภาพของจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ เช่น รา และแบคทีเรีย โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารประกอบเชิงซ้อนในกลุ่มของ polyketide และ non-ribosomal peptide จากจุลินทรีย์เหล่านี้จะมีความเหมาะสมต่อการนำมาประยุกต์ใช้เป็นสารตั้งต้นเพื่อผลิตวัสดุชีวภาพ หรือสารที่สามารถนำมาใช้เป็นสารทดแทนสารประกอบปิโตรเคมีที่กำลังจะหมดไปได้

polyketide และ non-ribosomal peptide เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ซึ่งเป็นสารประกอบกลุ่มใหญ่ที่มีปริมาณมาก และสามารถพบได้ทั่วไปในจุลินทรีย์หลายชนิด เนื่องจากสารประกอบ polyketide และ non-ribosomal peptide มีคาร์บอนเป็นองค์ประกอบหลัก สารประกอบเหล่านี้จึงมีศักยภาพที่จะนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์วัสดุชีวภาพ และสารประกอบปิโตรเคมีอื่น ๆ ได้อย่างยั่งยืน ทั้งนี้ หากสามารถค้นหาสารประกอบ polyketide และ non-ribosomal peptide ชนิดต่าง ๆ ในจุลินทรีย์ และทำการศึกษาเพื่อให้เข้าใจในกระบวนการสังเคราะห์อย่างถ่องแท้ จะนำมาสู่การพัฒนาสารประกอบเหล่านี้เพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับการผลิตวัสดุชีวภาพต่าง ๆ อาทิเช่น ไบโอดีเซล โอลิโอฟิลเมอร์ โอลิเฟน สไตรีน และ แลคโตน เพื่อทดแทนสารประกอบทางปิโตรเคมีได้ ซึ่งแสดงได้ดังแผนภาพที่ 1

Renewable Resources



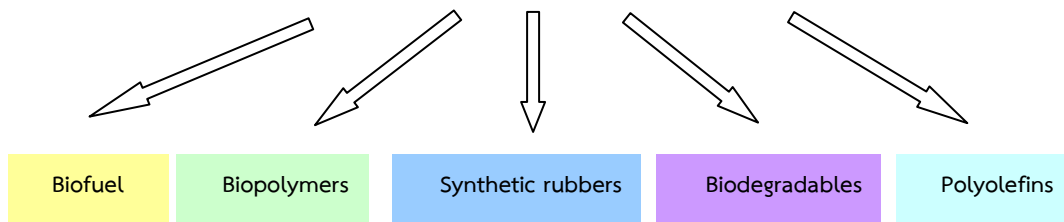
Xylaria



กระบวนการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ



Polyketide และ Non-ribosomal peptide



ภาพที่ 1 กระบวนการการผลิตสารประกอบโพลีคีไทดและนอนไรโบโซมอลเปปไทด์จาก *Xylaria* เพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพและวัสดุชีวภาพชนิดต่าง ๆ

ประเทศไทยมีความหลากหลายทางจุลินทรีย์สูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งราในกลุ่ม *Xylaria* ซึ่งเป็นรากกลุ่มใหญ่ที่พบไม่ที่พบบ่อย ราในกลุ่มนี้มีความหลากหลายและสามารถผลิตสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ในกลุ่มของ polyketide และ non-ribosomal peptide ที่มีคุณสมบัติเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลายชนิด ยกตัวอย่างเช่น depudecin, phaseolinone, phomenone, อนุพันธ์ของ cytochalasin Q และ (E)-methyl-3-(4-methoxy-phenoxy)

propenoate ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อมาลาเรีย และ multiplolide A และ B ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา รวมถึงสารประกอบ polyketide อื่น ๆ ที่มีศักยภาพที่จะนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตวัสดุชีวภาพชนิดต่าง ๆ อย่างไรก็ตาม แม้ว่า *Xylaria* จะเป็นราค้นพบได้เป็นจำนวนมากในประเทศไทย และเป็นแหล่งของสารประกอบ polyketide และ non-ribosomal peptide หลายชนิด แต่สารประกอบเหล่านี้ในรา *Xylaria* มีการนำมาใช้ประโยชน์ค่อนข้างน้อย และยังไม่มีผู้ใดทำการค้นหาสารประกอบ polyketide และ non-ribosomal peptide จาก *Xylaria* เพื่อนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตวัสดุชีวภาพเลย

งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นในการค้นหาสารประกอบ polyketide, non-ribosomal peptide และ building block ต่าง ๆ ที่ใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับการผลิตวัสดุชีวภาพจากราในกลุ่ม *Xylaria* โดยอาศัยความรู้ทางด้านชีววิทยาโมเลกุล และชีวสารสนเทศ แนวคิดดังกล่าวจะเริ่มจากการคัดเลือกราในกลุ่ม *Xylaria* การศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis) โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ nuclear ribosomal DNA ควบคู่กับการศึกษาความหลากหลายของ polyketide และ non-ribosomal peptide ของราในกลุ่มนี้จาก metabolite profiling ของ *Xylaria* แต่ละชนิด การศึกษาความหลากหลายของ polyketide และ non-ribosomal peptide และการจำแนกตามชนิดของสารเคมีด้วยหลักการทางชีวสารสนเทศนี้จะช่วยให้การจำแนกใน กลุ่มที่มีความแปรผันด้านสัณฐานโครงสร้างและไม่สามารถจำแนกได้ตามหลักการทางสัณฐานวิทยานั้นง่ายขึ้น จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการค้นหาสารประกอบ polyketide และ non-ribosomal peptide ที่สามารถนำมาใช้ทำเป็นสารตั้งต้นในการผลิตวัสดุชีวภาพที่มีคุณค่าได้ในอนาคต

2.

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษาความหลากหลายของสารประกอบ polyketide, non-ribosomal peptide และ building block ในรา *Xylaria* ชนิดต่าง ๆ จาก metabolite profiling เพื่อนำไปประยุกต์ใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตวัสดุชีวภาพ
2. ศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ และสร้าง phylogenetic tree ของราในกลุ่ม *Xylaria* โดยใช้ข้อมูลจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ Internal Transcribed Spacer (ITS) ใน nuclear ribosomal DNA
3. จำแนกรากลุ่ม *Xylaria* เป็นหมวดหมู่ตามหลักเคมีอนุกรมวิธาน (chemotaxonomy) หรือตามชนิดของสารประกอบ polyketide และ non-ribosomal peptide ที่ผลิต

ขอบเขตของการวิจัย

1. ตัวอย่างราในกลุ่ม *Xylaria* ที่ใช้ในงานวิจัยจะได้จาก Biotec Culture Collection และจากการเก็บตัวอย่างจากเศษซากพืชในบริเวณต่าง ๆ
2. เพาะเลี้ยง *Xylaria* สายพันธุ์ต่าง ๆ ในอาหารสูตรมาตรฐาน ได้แก่ Malt Extract Broth (MEB) และ Yeast Extract Sucrose (YES) เพื่อทำ metabolite profiling และ ศึกษาความหลากหลายของสารประกอบ polyketide, non-ribosomal peptide และ primary metabolite ได้แก่ building block ชนิดต่าง ๆ
3. ในการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการนั้นจะใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยการโคลนยีนบริเวณ Internal Transcribed Spacer (ITS) ของรา *Xylaria* และจะนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของราในกลุ่มนี้เพิ่มเติมจาก NCBI database มาทำการวิเคราะห์เพิ่มเติมด้วย

ทฤษฎีและกรอบแนวคิด

กรอบแนวคิดที่จะนำมาใช้ในการศึกษาความหลากหลายของสารประกอบ polyketide และ non-ribosomal peptide ใน *Xylaria* เพื่อนำไปประยุกต์ใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตวัสดุชีวภาพ สามารถทำได้โดยการศึกษา metabolite profiling ของ *Xylaria* ในอาหารชนิดต่าง ๆ และวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ หรือ phylogenetic analysis จากข้อมูลจากลำดับเบสของ nuclear ribosomal DNA ซึ่งมีหลักการ ดังนี้ คือ กำหนดกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษาในที่นี้คือ *Xylaria* จาก Biotech Culture Collection และตัวอย่างที่เก็บได้จากอุทยานแห่งชาติน้ำหนาว จากนั้นทำการเพาะเลี้ยง *Xylaria* ในอาหารสูตรต่าง ๆ เพื่อศึกษา metabolite profiling ของ *Xylaria* แต่ละชนิด ในส่วนของการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของ *Xylaria* ที่นำมาศึกษานั้นจะเลือกข้อมูลที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ ในงานวิจัยนี้จะเลือกใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ Internal Transcribed Spacer (ITS) ใน nuclear ribosomal DNA หลังจากนั้นจึงทำ multiple alignment และแสดง tree ของความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของ *Xylaria* แต่ละชนิด

อนึ่ง ในการทำ phylogenetic analysis ยังสามารถทำได้โดยใช้ข้อมูลจากการทำ chemotaxonomy ซึ่งเป็นการจัดลำดับความสัมพันธ์หรือจำแนกสายพันธุ์ wood-decay fungi ตามชนิดของ secondary metabolite ที่ผลิต การศึกษา phylogenetics นั้นจะมีประโยชน์อย่างยิ่งสำหรับการค้นหา metabolite ชนิดต่าง ๆ จาก *Xylaria* สายพันธุ์ต่าง ๆ เช่นหากทราบว่า *Xylaria* สายพันธุ์หนึ่งผลิตสารออกฤทธิ์ที่น่าสนใจชนิดหนึ่งแล้ว *Xylaria* อีกชนิดที่มีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการที่ใกล้เคียงกัน ก็จะมีโอกาสที่จะมี metabolite profile หรือมีการผลิตสารประกอบในกลุ่ม polyketide และ non-ribosomal peptide ชนิดนั้นเช่นกัน ซึ่งการที่เราทราบว่า *Xylaria* กลุ่มใดมี metabolite profile อย่างไรนั้น ก็จะช่วยให้ประหยัดทั้งเงินและเวลาในการค้นหา metabolite ชนิดต่าง ๆ ที่เราต้องการ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทำให้ทราบข้อมูลเกี่ยวกับเกี่ยวกับการผลิต และความหลากหลายของสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ในกลุ่มของ polyketide และ non-ribosomal peptide รวมถึง building block (primary metabolite) ใน *Xylaria* สายพันธุ์ต่าง ๆ และสามารถนำองค์ความรู้ไปใช้ในการค้นหาสารประกอบที่มีโครงสร้างที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตวัสดุชีวภาพ เพื่อทดแทนการใช้วัสดุที่ย่อยสลายยาก และทดแทนสารประกอบปิโตรเคมี ซึ่งเท่ากับว่าเป็นการช่วยแก้ปัญหาสิ่งแวดล้อมและปัญหาแหล่งพลังงานที่กำลังจะหมดไปในอนาคต

หน่วยงานที่สามารถนำงานวิจัยนี้ไปใช้ประโยชน์ได้แก่ มหาวิทยาลัย และสถาบันวิจัยทุกแห่งที่ศึกษาวิจัยเกี่ยวกับสารทุติยภูมิในกลุ่มของ polyketide และ non-ribosomal peptide ใน *Xylaria* ที่จะสามารถนำผลการวิจัยไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐาน หรือศึกษาต่อยอด รวมถึงเป็นประโยชน์ต่อภาคอุตสาหกรรม ที่ต้องการนำผลงานไปใช้ในการพัฒนาเป็นสารตั้งต้นสำหรับการผลิตพลาสติกชีวภาพ (bioplastic) เพื่อลดปัญหาสิ่งแวดล้อม

นอกจากนี้องค์ความรู้ใหม่ที่ได้จากงานวิจัยนี้สามารถนำไปเพื่อใช้ในการนำเสนอผลงาน และตีพิมพ์ในวารสารระดับประเทศหรือต่างประเทศ และเป็นการถ่ายทอดเทคโนโลยีทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพแก่นักศึกษาในระดับบัณฑิตศึกษาซึ่งเป็นการสร้างนักวิจัยรุ่นใหม่ให้แก่ประเทศต่อไป

การทบทวนวรรณกรรม

6.1 Xylaria

Xylaria เป็นรากลุ่มที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง จัดเป็น white-rot fungi ที่มีกพบนอยู่บนไม้ที่เปียกชื้นและเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการผุพังของไม้ชื้น หรือที่เรียกว่า lignicolous fungi ราในกลุ่มนี้สามารถย่อยสลายลิกนินในไม้ จนเหลือแต่เซลลูโลสที่มีสีอ่อน ๆ บางชนิดสามารถย่อยได้ทั้งลิกนินและเซลลูโลส เนื่องจาก white-rot fungi สามารถผลิตเอนไซม์ laccase ที่ใช้ในการย่อยลิกนินและสารอินทรีย์ที่มีโครงสร้างซับซ้อนอีกหลายชนิด ดังนั้นรากลุ่มนี้จึงถูกนำมาใช้กระบวนการ mycoremediation หรือ การกำจัดสารพิษหรือสารปนเปื้อนต่าง ๆ ออกจากสิ่งแวดล้อม ราในกลุ่มนี้เป็นรากลุ่มใหญ่สุดในบรรดา wood-decay fungi ได้แก่รา *Xylaria* ชนิดต่าง ๆ เป็นต้น (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 ลักษณะของรา *Xylaria* ชนิดต่าง ๆ (ก) *Xylaria hypoxylon*, (ข) *Xylaria polymorpha* (Deacon, 2005)

Xylaria เป็นราในวงศ์ *Xylariaceae* จัดอยู่ในกลุ่มของ Ascomycetes ซึ่ง Ascomycetes แบ่งเป็นกลุ่มใหญ่ ๆ ด้วยกัน 3 กลุ่มคือ *Plectomycetes* *Dictomycetes* และ *Pyrenomycetes* โดย *Xylariaceae* จัดอยู่ในกลุ่ม *Pyrenomycetes* ราเหล่านี้พบได้ทั่วไปในหลายประเทศทั่วโลก ส่วนมากมักพบราตระกูลนี้ตามต้นไม้ กองฟาง ดิน หรือมูลสัตว์ (Whalley และ Edwards, 1996) ปัจจุบันราในตระกูล *Xylariaceae* มีอยู่ 40 genera และ หลายร้อย species ด้วยกัน (Whalley และ Edwards, 1996) ยกตัวอย่างเช่น *Daldinia*, *Hypoxylon*, *Rosellinia*, *Xylaria*, *Anthostomella*, *Bisconiauxia*, *Camillea*, *Podosordania*, *Poronia* และ *Thamnomycetes* การจำแนกราในกลุ่ม

Xylariaceae ทำได้อย่างคร่าว ๆ โดยการดูรูปร่างสปอร์ และลักษณะทางสัณฐานวิทยา ราในกลุ่ม *Xylariaceae* เป็นราเส้นใยที่สามารถสร้างสารประกอบในกลุ่มของ polyketide และ non-ribosomal peptide ได้หลากหลายชนิด ทำให้นาสารเหล่านี้มาพัฒนาเป็นยารักษาโรค หรือนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมทางเทคโนโลยีชีวภาพต่าง ๆ เช่นใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับผลิตวัสดุชีวภาพเป็นต้น ดังนั้นจึงจำเป็นจะต้องศึกษาความหลากหลายของสารประกอบในกลุ่มนี้ เพื่อนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ในอนาคต

Xylaria sp. เป็นตัวอย่างของราในวงศ์ *Xylariaceae* ที่มีการศึกษากันพอสมควร *Xylaria* sp. นี้ เป็นราที่เจริญเติบโตได้ดีในพื้นที่เขตร้อน โดยส่วนใหญ่อาศัยอยู่ร่วมกับต้นไม้ ทำหน้าที่เป็นผู้ย่อยสลายหรือปรสิต ราชชนิดนี้มีเพียง 1 stroma ที่ไม่สมบูรณ์ และสามารถสังเคราะห์สารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ในกลุ่มของ polyketide และ non-ribosomal peptide เช่น cubensic acid, globoscinic acid (Adeboya และคณะ, 1995), soradin (Schneier และคณะ, 1995), xylaramide (Schneier และคณะ, 1996), piloformic acid (Chesters และ O' Hogen, 1997), cytochalasin phaseolinone และ xylobovide (Abates และคณะ, 1997) สาร secondary metabolites ที่สร้างจาก *Xylaria* sp. สามารถสรุปได้ดังตารางที่ 1

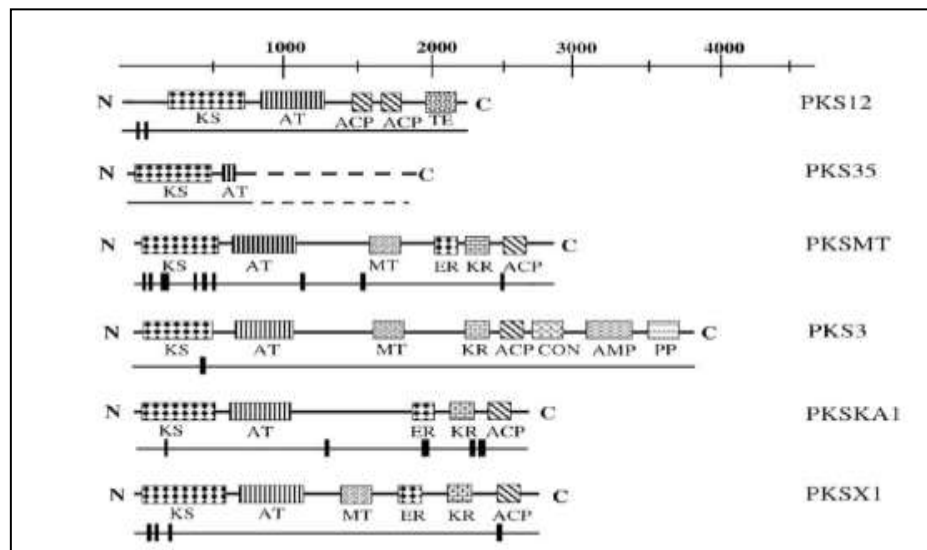
ตารางที่ 1 ชนิดของสาร secondary metabolites ที่สร้างจาก *Xylaria* sp.

Species	Metabolites	Reference
<i>X. polymorpha</i>	Xylaral	Gunawan และ Steglich (1990)
<i>X. sp.</i>	Xylaric acid	Salvatore และคณะ (1994)
<i>X. globosa</i>	Globoscin	Adeboya และคณะ (1995)
<i>X. cubensis</i>	Cubensic acid, Cytochalasin D	Adeboya และคณะ (1995)
<i>X. berterii</i>	Berteric acid	Adeboya และคณะ (1995)
<i>X. sp. (from Malaysia)</i>	Masaysic acid	Adeboya และคณะ (1995)
<i>X. sp. (from Cameroon)</i>	Cameronic acid	Adeboya และคณะ (1995)
<i>X. sp. (from France)</i>	Xylarin	Schneier และคณะ (1995)
<i>X. telfairii</i>	Telfairic acid	Adeboya และคณะ (1996)
<i>X. sp. (from Malaysia)</i>	Maldoxin, Maldoxone	Adeboya และคณะ (1996)
<i>X. longipes</i>	Xylaramide, Tyrosal	Schneier และคณะ (1996)
<i>X. obovata</i>	Xylobovide, Xylobovatol, Phaseolinone 19,20-epoxytochalasin C-deacetyl 19, 20-epoxytochalasin Cytochalasin Q, Clonostachydiol	Abates และคณะ (1997)

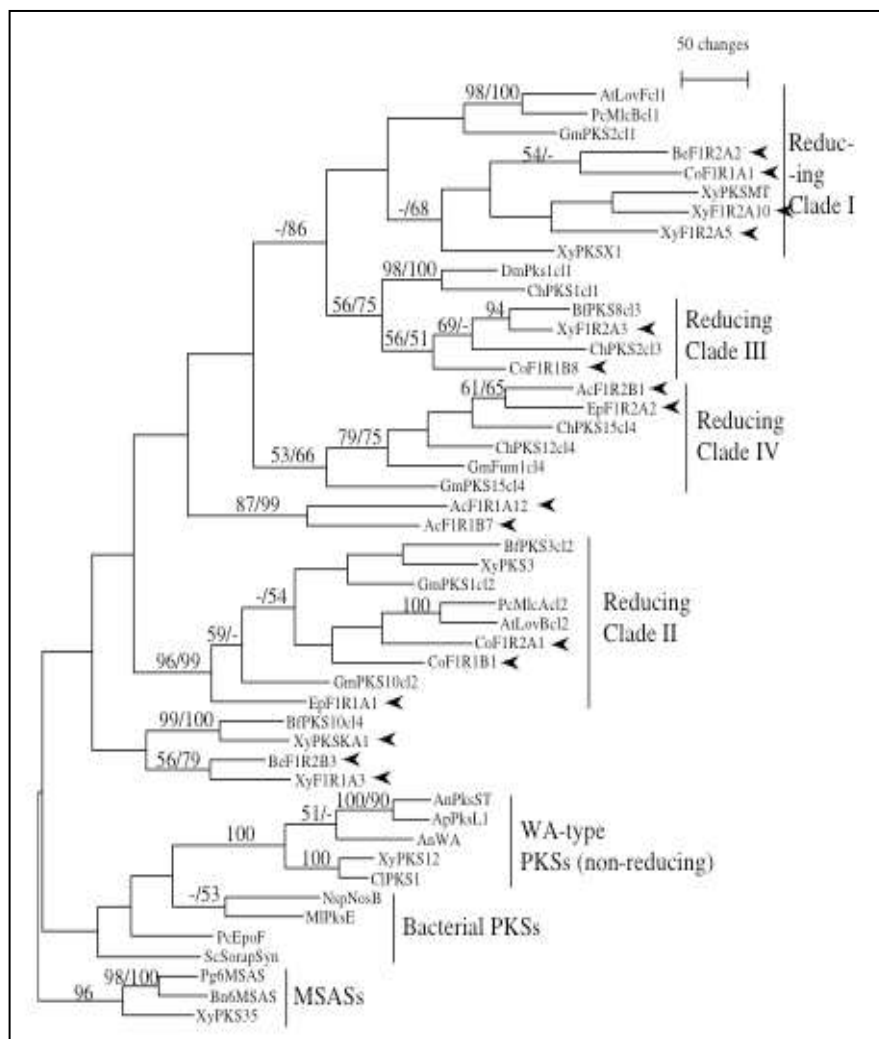
<i>X. hypoxylon</i>	Cytochalasins	Espada และคณะ (1997)
<i>X. longiana</i>	Longianone	Edwards และคณะ (1999)
<i>X. sp.</i>	Depudecin, Phomenone, (E)-methyl 3-(4-methoxyphenoxy)-propeonate	Isaka และคณะ (2000)
<i>X. sp</i> (from the south China sea coast)	Xytoketal A	Lin และคณะ (2001)
<i>X. grammica</i>	Grammicin	Edwards และคณะ (2001)
<i>X. sp.</i> PSU-F100	Xylarisin (Cytochalasin derivative)	Rukachaisirikul และคณะ (2009)
<i>X. sp</i> PB-30	(4S,5S,6S)-4-hydroxy-3-methoxy-5-methyl- 5,6-epoxycyclohex-2-en-1-one	Tansuwan และคณะ (2010)
<i>X. sp</i> BCC4297	Xylopinarane	Isaka และคณะ (2011)
<i>X. sp</i>	Proline-containing cyclopentapeptides	Wu และคณะ (2011)
<i>X. sp.</i> BCC1067	Xyrrolin	สุรณัฐ และคณะ (2012)

6.2 สารประกอบโพลีคีไทด์และการใช้ประโยชน์

สารโพลีคีไทด์ (polyketide) จัดเป็นสารในกลุ่มสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) ที่มีความสำคัญยิ่ง เนื่องด้วยสารโพลีคีไทด์หลาย ๆ ตัวถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมยา และเคมีภัณฑ์หลายประเภท เช่น ใช้เป็นเป็นสารกดภูมิคุ้มกัน (immunosuppresants agent) สารลดระดับโคเลสเตอรอล (anticholesterol agent) สารต้านมะเร็ง (anticancer) ยาฆ่าแมลง (antiparasite) โดยทั่วไปพบว่าสารโพลีคีไทด์สามารถพบได้ใน พืช แบคทีเรีย และโดยเฉพาะอย่างยิ่งในรา จากการศึกษาเบื้องต้น อนุวัฒน์และคณะ (2005) สามารถแยกยีนโพลีคีไทด์จากรา *Xylaria* sp. BCC 1067 ได้มากถึง 18 ยีน ประกอบด้วย 7 full length gene (*pks12*, *pks35*, *pksmt*, *pks3*, *pka1*, *pks5* and *pks11*) (ภาพที่ 3) และมียีนที่พบเพียงบางส่วน (partial gene) อีก 11 ยีน แต่เมื่อศึกษา function ของยีนต่าง ๆ ข้างต้น ด้วยเทคนิคการทำนายหน้าที่ด้วยโปรแกรม CDART (conserved domain architecture) พบว่าสามารถจำแนกหน้าที่ของยีนได้เพียงยีนเดียวคือ *pks12* ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์สาร melanin ส่วนยีนอื่น ๆ ไม่สามารถจำแนกได้ และจากการศึกษาของ Amnuaykanjanasin และคณะ (2005) ได้ทำการจำแนกหน้าที่ของยีนโพลีคีไทด์ที่แยกได้จากรา *Xylaria* sp. BCC 1067 ข้างต้น ด้วยเทคนิค phylogenetics analysis ก็ยังไม่สามารถที่จะจำแนกหน้าที่ที่แท้จริงของยีนต่าง ๆ ได้ เพียงแต่สามารถจัดกลุ่มยีนโพลีคีไทด์ข้างต้นให้เข้ามาอยู่ด้วยกันภายใต้การแบ่งตามการเข้าทำปฏิกิริยา (ภาพที่ 4)

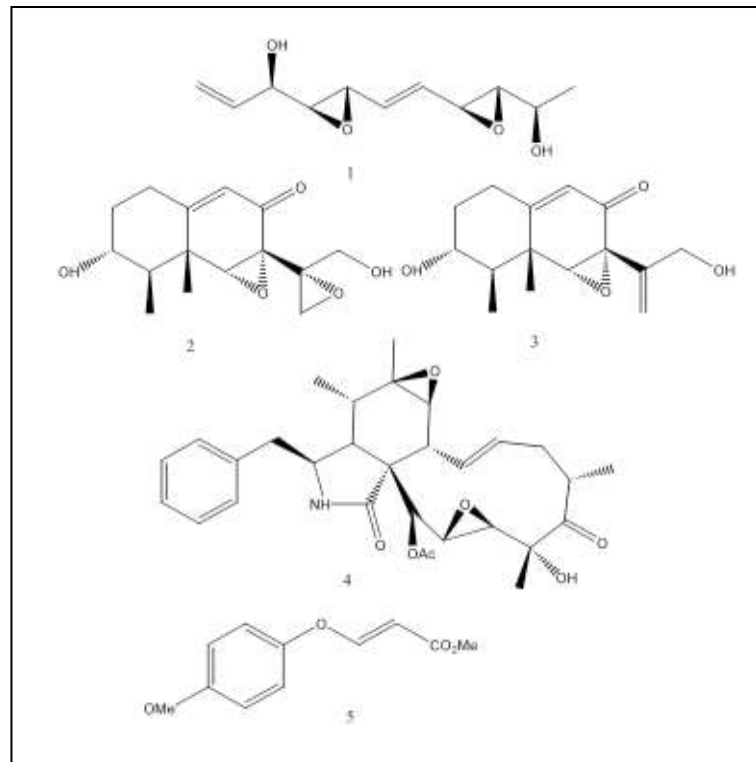


ภาพที่ 3 โครงสร้างยีนโพลีคีไทด์ (gene organization) ที่แยกได้จากรา *Xylaria* sp. BCC 1067



ภาพที่ 4 การจัดกลุ่มของยีนโพลีคีไทด์ต่าง ๆ ด้วย phylogenetic analysis

จากการศึกษาในห้องปฏิบัติการทางเคมีพบว่า *Xylaria* sp. BCC 1067 มีศักยภาพในการสังเคราะห์สารโพลีคีไทด์ที่เป็น major compound อยู่ 5 ชนิด ประกอบด้วย 1) depudecin 2) phaseolinone 3) phomenone 4) 19,20-epoxycytochalasin Q และ 5) propenoate (ภาพที่ 5) (Isaka และคณะ, 2000) ซึ่งพบว่า 2 ใน 5 จัดเป็นสารในกลุ่มโพลีคีไทด์ คือ depudecin และ 19,20-epoxycytochalasin Q โดยสารโพลีคีไทด์ทั้งสองชนิดมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งและยับยั้งเชื้อมาลาเรีย (antiplasmodial)



ภาพที่ 5 โครงสร้างทางเคมีของสารเมตาบอไลต์ที่แยกได้จากรา *Xylaria* sp. BCC 1067

6.3 การสร้าง phylogenetic tree เพื่อศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

phylogenetic tree สามารถสร้างได้โดยอาศัยข้อมูลลักษณะสัณฐานวิทยา ชากดึกดำบรรพ์หรือข้อมูลระดับโมเลกุล โดยเฉพาะลำดับนิวคลีโอไทด์หรือลำดับโปรตีนของยีนต่าง ๆ ที่เป็นออร์โธล็อก (orthologue) องค์ประกอบของ phylogenetic tree นั้นจะคล้ายต้นไม้ คือประกอบด้วยกิ่งก้านหรือแขนง (branch) ก้านอาจแตกเป็นกิ่งย่อยแบบสองทาง (bifurcation) หรือหลายทาง (multifurcation) ซึ่งแบบหลังนี้พบน้อยมาก ตำแหน่งที่ก้านแตกเป็นกิ่งย่อยเป็นจุดต่อเรียกว่า node ที่ปลายสุดของกิ่งเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ หรือโปรตีน หรือสายพันธุ์ (species) ของสิ่งมีชีวิต เรียกว่า ใบ (leaf) หรือแทกซอน (taxon) phylogenetic tree อาจมีจุดกำเนิดร่วมหรือราก (rooted tree) ซึ่งเป็นส่วนยอดที่เป็นตำแหน่งของบรรพบุรุษร่วมของแทกซอน (taxa) ทั้งหมด หรือไม่มีราก (unrooted tree) ก็ได้ phylogenetic tree ที่มีรากทำให้ทราบทิศทาง เวลา และบรรพบุรุษในการวิวัฒนาการ ความยาวของก้านที่แตกต่างกันแสดงระยะห่างของวิวัฒนาการ ซึ่งแต่

ละก้านอาจจะมีอัตราเร็วของวิวัฒนาการแตกต่างกัน ระยะห่างอาจจะแสดงเป็นตัวเลขบนแต่ละก้าน หรืออาจเขียนเป็นสเกลความยาวบอกขนาดในภาพ

ถ้าตั้งสมมติฐานให้ phylogenetic tree มีอัตราการกลายพันธุ์ (mutation rate) คงที่ สำหรับทุกสายทาง (lineages) สำหรับการวิวัฒนาการของลำดับนิวคลีโอไทด์หรือโปรตีน จะเรียกสมมติฐานนี้ว่า molecular clock assumption เนื่องจากอัตราการกลายพันธุ์คงที่ ดังนั้น ปริมาณการกลายพันธุ์ของแต่ละเส้นขอบจะเป็นสัดส่วนกับเวลาที่ผ่านไป ดังนั้น ไม่ว่าจะใช้ความยาวของเส้นแทนปริมาณการกลายพันธุ์หรือเวลาที่ผ่านไปจะได้ตัวเลขตัวเดียวกัน แต่ถ้าไม่ใช่ molecular clock assumption ที่ขอบที่มีระยะเวลาเท่ากัน แต่มีอัตราเร็วของการกลายพันธุ์แตกต่างกัน ขอบที่มีอัตราเร็วการกลายพันธุ์มากกว่าจะมีปริมาณการกลายพันธุ์มากกว่าในช่วงเวลาที่ผ่านไปเท่ากัน (Allman และ Rhodes, 2004) กลุ่มของแทกซาที่กำเนิดมาจากบรรพบุรุษร่วมกันเรียกว่า เคลด (clad) tree อาจจะมีเพียงเคลดเดียวเรียกว่า monophyletic tree หรือมีหลายเคลดเรียกว่า polyphyletic tree แต่ละคู่ของสปีชีส์หรือแทกซาที่แยกจากกันและกันหนึ่งช่วงโนดที่อยู่ภายใน tree (internal node) หรือกล่าวอีกอย่างก็คือแทกซาคู่ใด ๆ ที่เส้นขอบวิ่งไปบรรจบกัน เรียกว่าเป็นเพื่อนบ้านกัน (neighbors) สำหรับสปีชีส์หรือแทกซาที่แยกออกจากสปีชีส์อื่นที่กำลังศึกษาในระยะแรก ๆ ของการวิวัฒนาการ เรียกว่า พวกนอกกลุ่ม (outgroup) ซึ่งสปีชีส์เหล่านี้สามารถนำมาใช้เพื่อสร้าง tree แบบมีรากได้ (Deonier และคณะ, 2005; Krane และ Raymer, 2003)

จำนวนของ tree ทั้งชนิดมีรากและไม่มีราก สามารถคำนวณหาได้เมื่อทราบจำนวนของแทกซา ซึ่งจะมีจำนวนมากมาย ดังนั้น โปรแกรมสำหรับสร้าง phylogenetic tree จึงมุ่งไปสู่การสร้างหรือค้นหา tree ที่เหมาะสมหรือดีที่สุด ซึ่งบางวิธีจะใช้เวลาและกำลังคอมพิวเตอร์ในการวิเคราะห์มาก การสร้าง phylogenetic tree มี 5 ขั้นตอน คือ การรวบรวมชุดข้อมูล การจัดเรียงลำดับ การพิจารณาเลือกวิธีวิเคราะห์ เลือกโมเดลวิวัฒนาการ และโปรแกรมการทดสอบ และการนำเสนอ ดังนี้

1. การรวบรวมชุดข้อมูล อาจทำได้โดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในห้องทดลอง หรือทำการเรียกข้อมูลโดยใช้คำสำคัญ โดยใช้โปรแกรมเรียกข้อมูลเช่น SRS หรือ Entrez จากฐานข้อมูลนิวคลีโอไทด์ทั่วไป คือ DDBJ, EMBL และ GenBank หรือจากฐานข้อมูลจีโนมจำเพาะเช่น TIGR, JGI, Sanger และ NCBI และอาจทำได้ได้โดยการเรียกข้อมูลโดยการค้นค่าคล้ายกัน โดยใช้โปรแกรมบลาส (BLAST) ซึ่งมีในทุกฐานข้อมูลและเว็บไซต์จีโนมส่วนใหญ่ เช่น NCBI BLAST

2. พิจารณาเลือกที่จะสร้าง tree จากลำดับนิวคลีโอไทด์หรือลำดับของโปรตีน โดยชนิดของกรดอะมิโนจะมีจำนวนหลากหลายกว่าชนิดของนิวคลีโอไทด์ แต่ถ้าลำดับโปรตีนมีความใกล้เคียงกันมากจะมีการเปลี่ยนแปลงมากกว่าที่ระดับนิวคลีโอไทด์ ดังนั้น ควรใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ในการทำ phylogenetic แต่ถ้าลำดับมีความสัมพันธ์ที่ห่างกันมาก ลำดับของกรดอะมิโนจะเก็บข้อมูลมากกว่า จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์หรือโปรตีนมาจัดเรียง เนื่องจากการจัดเรียงลำดับโดยใช้

โปรแกรมเช่น ClustalX หรือ ClustalW ผลที่ได้อาจเกิดช่องว่าง (gaps) ในตำแหน่งที่ไม่เหมาะสม ดังนั้นจะต้องนำมาปรับแต่งโดยการตรวจสอบด้วยตนเองอีกครั้งโดยใช้โปรแกรม BioEdit

3. การเลือกใช้วิธีวิเคราะห์โมเดลและโปรแกรมสำหรับสร้าง tree

3.1 พิจารณาเลือกที่จะสร้าง tree แบบมีรากหรือไม่มีราก ในบางกรณี que พิจารณา tree เพื่อตรวจสอบว่ากลุ่มยีนเป็น orthologue กันหรือไม่ อาจใช้ tree แบบไม่มีราก แต่ส่วนมากแล้วการสร้าง tree แบบมีราก คือ tree ที่แสดงบรรพบุรุษร่วมของทุก taxa ที่ศึกษา จะเป็นพื้นฐานความเข้าใจกระบวนการวิวัฒนาการ ดังนั้นจึงต้องสร้าง tree แบบมีราก วิธีการทำได้สองวิธีคือ การใส่ลำดับของพวกนอกกลุ่มเข้าไปในการสร้าง tree โดยเลือกหาพวกนอกกลุ่มจากข้อมูลหรือลำดับการจัดเรียงหรือโดยใช้ยีนที่ถูกจำลองมาก (duplicated gene) โดยใช้ลำดับจากเซลล์หนึ่งไปใช้เป็นฐานของอีกเซลล์หนึ่ง

3.2 ตรวจสอบการจัดเรียงแล้วตัดสินใจเลือกที่จะรวมส่วนไหนและตัดส่วนไหนออกจากการวิเคราะห์ หลักการทั่วไปคือให้ตัดส่วนใดก็ตามที่มีช่องว่าง (gaps) รวมทั้งคอลัมน์ที่ยังคลุมเครือออกไป เพราะไม่สามารถเชื่อมั่นได้เลยว่าบริเวณเหล่านี้จัดเรียงกันอย่างถูกต้อง และถ้าจัดเรียงไม่ถูกต้องแล้ว ก็จะทำให้ได้ข้อมูล tree ที่ไม่ถูกต้องด้วย และแม้ว่าทราบแน่นอนว่าบริเวณที่มีช่องว่างนั้นเป็นการจัดเรียงอย่างถูกต้อง บริเวณนั้นก็ยังคงมีผลต่อ tree ต่อไป เพราะว่าช่องว่างยังมีขนาดใหญ่ก็จะมีจำนวนตัวอักษรที่รวมกันเป็นกลุ่มร่วมกันมากขึ้น (เนื่องจากในความเป็นจริง ช่องว่างหนึ่ง ๆ เป็นเพียงเหตุการณ์ทางวิวัฒนาการครั้งเดียว โดยไม่ขึ้นกับขนาด) ความสำคัญของช่องว่างช่องหนึ่งจะไม่เป็นสัดส่วนเดียวกับขนาดของช่อง

3.3 เลือกวิธีการสำหรับใช้คำนวณ phylogenetic tree วิธีที่ใช้คำนวณแบ่งเป็นสองกลุ่ม (Allman และ Rhodes, 2004; ITC-Academic Computing Health Science, 1998) ดังนี้

3.3.1 วิธีที่ใช้เมทริกซ์ของระยะห่าง (Distance-matrix methods) วิธีนี้จะสรุปความแตกต่างระหว่างลำดับโดยการคำนวณค่าระยะห่างเป็นคู่ ๆ ระหว่างลำดับที่มาจัดเรียงทั้งหมด อาจเรียกว่าวิธีจัดรวมกลุ่ม หรือวิธีเลขคณิต (clustering หรือ algorithmic methods) วิธีนี้จะสร้างตารางเมทริกซ์ ซึ่งบอกระยะห่างหรือความแตกต่างเป็นค่าตัวเลขระหว่างลำดับเบสหรือโปรตีนต่าง ๆ ที่เปรียบเทียบ โดยเปรียบเทียบลำดับแต่ละคู่ และหาความแตกต่างระหว่างลำดับ จากนั้นจึงนำมาจัดกลุ่ม โดยใช้วิธีดังต่อไปนี้

3.3.1.1 UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetic mean) วิธีนี้จะสร้าง tree ชนิดมีราก และใช้ molecular clock assumption ซึ่ง tree ที่ได้จะวาง taxa ทั้งหมดอยู่ในระยะห่างจากรากเท่ากัน ดังนั้นปริมาณการกลายพันธุ์จากรากจนถึงแต่ละ taxon จะเท่ากัน

3.3.1.2 Fitch-Margoliash วิธีนี้อาศัยพื้นฐานเดียวกับวิธี UPGMA แต่จะใช้เทคนิคการรวม taxa ที่นำมาวิเคราะห์บาง taxa เข้าเป็นกลุ่มเดียวกันในลักษณะที่ทำให้เหลือ 3 กลุ่มที่จะเปรียบเทียบ แล้วใช้สูตรคำนวณระยะห่างแบบสามจุด (three-point formula) วิธีนี้มักจะได้ tree แบบเดียวกับวิธี UPGMA แต่ tree ที่ได้จะเป็นแบบไม่มีราก

3.3.1.3 Neighbor-joining วิธีนี้มาจากการพิจารณา tree ไม่มีราก ที่ประกอบด้วย 4 แทกซา พบว่า ผลบวกระยะห่างระหว่างคู่ของเพื่อนบ้านทั้งสองคู่จะน้อยกว่าผลบวกระยะห่างระหว่างคู่ที่ไม่ใช่เพื่อนบ้านเสมอ วิธีนี้เป็นวิธีที่ให้ผลดีกว่า UPGMA และ Fitch-Margoliash

3.3.2 วิธีที่ใช้ข้อมูลที่ไม่เกี่ยวข้องกันเช่น ตัวอักษร (Discrete data methods) วิธีนี้อาจเรียกว่าการค้นหา tree (tree searching methods) โดยใช้ข้อมูลในลักษณะตัวอักษรตลอดทั้งลำดับ วิธีที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้คือ

3.3.2.1 Parsimony วิธีนี้ยึดถือหลักที่ว่า tree ที่เหมาะสม คือ tree ที่มีการกลายพันธุ์หรือการเปลี่ยนแปลงน้อยที่สุด ดังนั้น จะนับจำนวนการกลายพันธุ์ที่น้อยที่สุดในแต่ละ tree เป็นคะแนน (parsimony score) แล้วเลือก tree ที่มีค่าคะแนนน้อยสุดเป็นคำตอบ (Krone และ Raymer, 2003)

3.3.2.2 Maximum likelihood วิธีนี้จะหาค่า likelihood ของ parameter model ที่เป็นพื้นฐานของข้อมูล คือการนำเอาข้อมูลที่มีอยู่มาใช้ประมาณค่าพารามิเตอร์ โดยใช้วิธีการแทนค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ลงในโมเดลของความน่าจะเป็น แล้วพิจารณาหาค่าพารามิเตอร์ที่มีค่า likelihood สูงสุดหรือทำให้ข้อมูลนั้นน่าจะเป็นไปได้ที่สุด (Purcell, 2007)

3.3.2.3 Bayesian method เป็นวิธีหาค่า likelihood อีกชนิดหนึ่งที่ได้รับ ความนิยม มีสมมุติฐานมากขึ้นและใช้อัลกอริทึมที่แตกต่างกัน (Mau และคณะ, 1999)

ในชุดโปรแกรม phylip จะมีโปรแกรมหลายชนิดให้เลือกใช้ตามวิธีคำนวณที่ต้องการ เมื่อเปรียบเทียบทั้งสองวิธี วิธีหาระยะห่างมักจะใช้ในการสร้าง tree ในขั้นต้น ถ้านำไปใช้เป็นคำตอบทันทีต้องระมัดระวัง ส่วนวิธี parsimony และ likelihood เป็นวิธีที่ดีกว่า เนื่องจากเป็นวิธีที่สำรวจความสัมพันธ์ระหว่าง tree และองค์ประกอบอื่น ๆ อย่างละเอียด แต่โดยทั่วไปแล้วส่วนมากให้ผลเหมือน ๆ กัน ความแตกต่างของทั้งสองกลุ่มที่สำคัญคือ ความยากง่าย ความรวดเร็ว และ ข้อมูลที่ได้รับบางครั้ง นอกจากนี้ไม่ว่าจะด้วยเหตุผลใดก็ตาม การใช้วิธีใดวิธีหนึ่งอาจให้ผลไม่ถูกต้อง ดังนั้น โดยทั่วไป tree ที่ได้ควรจะถูกทดสอบโดยใช้มากกว่า 1 วิธี

3.4 พิจารณาเลือกโมเดลของการวิวัฒนาการ วิธีคำนวณระยะห่างของลำดับอาจใช้โมเดลการวิวัฒนาการที่ต่างกันได้ โดยโมเดลนี้คือ สูตรทางคณิตศาสตร์ที่จะชดเชยปัญหาการแทนที่ที่เกิดขึ้นซ้ำ ๆ กันหลายครั้ง (multiple substitutions) และการแทนที่มีน้ำหนักไม่เท่ากันระหว่างการแทนที่แบบทรานสชัน คือ ระหว่างเบสภายในกลุ่มไพริมิดีนหรือภายในกลุ่มพิวรีน (transition; Ts) และการแทนที่แบบทรานสเวอร์ชัน คือ ข้ามกลุ่มไพริมิดีนหรือพิวรีน (transversion; Tv) ชนิดของโมเดลที่สำคัญ โดยเฉพาะที่สามารถเลือกใช้จากโปรแกรม phylip และลักษณะของโมเดล สามารถสรุปได้ดังตารางที่ 2

3.5 เลือกโปรแกรมที่จะใช้ โปรแกรมที่มีความสมบูรณ์มากที่สุดและใช้กันอย่างกว้างขวาง เช่น PHYLIP, Mega และ PAUP ซึ่งต่างรวมโมเดลและวิธีการคำนวณที่หลากหลาย โดยโปรแกรม Mega3.1 ใช้ง่ายสุด เนื่องจากเป็นลักษณะของวินโดวส์ และให้เลือกรายงานจากแถบรายการ ส่วน PAUP มีความซับซ้อนมากที่สุด

ตารางที่ 2 โมเดลวิวัฒนาการชนิดต่าง ๆ (Allman และ Rhodes, 2004)

โมเดล	คำอธิบายลักษณะโมเดล
Jukes-Cantor distance	เป็นโมเดลที่ใช้พารามิเตอร์ค่าเดียว (•) ในการกำหนดอัตราการกลายพันธุ์ คือ ใช้สมมติฐานว่าการแทนที่ทั้งหมดสามารถเกิดได้เท่า ๆ กัน และที่สมดุลเบสทุกชนิดมีความถี่เท่ากับ 0.25
Kimura distance	เป็นโมเดลที่กำหนดอัตราการเปลี่ยนแปลงแตกต่างกัน 2 ชนิด คือ อัตราหนึ่งสำหรับการแทนที่แบบทรานสิชัน (อัตรา •) และอีกอัตราสำหรับการแทนที่แบบทรานสเวอร์ชัน (อัตรา •) (ที่สมดุลเบสทุกชนิดมีความถี่ 0.25) โมเดลนี้เหมาะกับข้อมูลที่เห็นว่าการแทนที่ทั้งสองแบบเกิดในอัตราที่ไม่เท่ากัน
F84 distance	โมเดลนี้กำหนดพารามิเตอร์ของอัตราเป็นสองอัตรา คือ อัตราสำหรับการแทนที่แบบทรานสิชัน และอัตราสำหรับการแทนที่แบบทรานสเวอร์ชัน (แต่ความถี่ที่สมดุลของแต่ละเบสจะมีค่าแตกต่างกันได้)
LotDet distance	โมเดลนี้ใช้การแปลงค่าด้วยการหาดีเทอร์มิแนนท์ของแมทริกซ์ ตามด้วยการหาค่า logarithm (Lockhart และคณะ, 1994) โมเดลนี้ใช้เมื่อมีความแตกต่างความถี่ของเบสสูงมากระหว่างลำดับใน tree แต่โมเดลนี้ไม่สามารถใช้กับอักษรที่ยังคลุมเครือเช่น เบส P, R หรือ N เป็นต้น ดังนั้นลำดับจะต้องทราบแน่นอนทั้งหมด (Tuimala, 2006)

4. การทดสอบ

4.1 Bootstrapping เป็นวิธีทดสอบที่ง่ายที่สุดสำหรับตรวจสอบความถูกต้องของ phylogenetic tree หลักการสำคัญของการวิเคราะห์อยู่บนพื้นฐานง่าย ๆ คือ ถ้าความเกี่ยวข้องระหว่างลำดับสองลำดับมีมาก ๆ การเปลี่ยนแปลงเบสเพียงบางเบสแบบไม่จำเพาะเจาะจงไม่น่าจะมีผลต่อความเกี่ยวข้องนี้ ตรงกันข้ามถ้าทั้งสองลำดับเกี่ยวข้องกันน้อยมาก การเปลี่ยนแปลงบางเบสจะมีผลอย่างมาก คือ เป็นการทดสอบว่าชุดของข้อมูลทั้งหมดสอดคล้องกับ tree หรือไม่ หรือว่า tree ที่ได้เป็นเพียง tree หนึ่งในบรรดา tree อื่น ๆ ทั้งหมดที่ดีเท่าเทียมกันจำนวนมาก โปรแกรมที่ใช้คือ เซคบูท (Seqboot) ขั้นตอนการทดสอบนี้ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนคือ การสุ่มตัวอย่างย่อย ๆ ในแต่ละคอลัมน์มาจากคอลัมน์ใด ๆ ของชุดข้อมูล จากนั้นนำมาสร้าง tree ต่าง ๆ สำหรับแต่ละตัวอย่างย่อย เช่นจำนวน 1,000 tree แล้วคำนวณความถี่ที่ส่วนต่าง ๆ ของ tree นั้นถูกสร้างขึ้นใน

แต่ละตัวอย่างย่อยที่สุ่มขึ้นมาเหล่านั้น เช่น ถ้าพบการจับกลุ่มของลำดับแบบหนึ่ง ๆ ในทุก tree ของทุกตัวอย่างย่อย ก็หมายความว่าค่าสนับสนุน (Bootstrap support) เป็น 100% แต่ถ้าพบเพียง 2 ใน 3 ของ tree ของตัวอย่างย่อย ก็แสดงว่าค่าสนับสนุนเท่ากับ 67% เท่านั้น ค่าจะเขียนไว้ที่ node ของ tree เรียกความน่าจะเป็นโพสทีเรียร์ (posterior probability)

4.2 Jack-knife เป็นเปอร์เซ็นต์จำนวนครั้งที่ clad ปรากฏ เมื่อจำนวนเปอร์เซ็นต์ของตัวอักษรถูกเอาออกอย่างสุ่มจากชุดข้อมูลแล้วทำการวิเคราะห์อีกครั้ง

4.3 Long branches ปัญหาแขนงยาว คือการที่มีการโน้มเอียงของลำดับที่แยกออกมาก ๆ จะจับกลุ่มกันใน tree โดยไม่เป็นความสัมพันธ์แท้จริง อย่างน้อยส่วนหนึ่งเกิดเนื่องจากลำดับวิวัฒนาการอย่างรวดเร็ว หรือลำดับที่ไม่มีสายสัมพันธ์ใกล้ชิดจะมีการกลายพันธุ์จำเพาะมากมาย แต่เนื่องจากความจำกัดที่จำนวนชนิดกรดอะมิโนมี 20 ชนิด หรือนิวคลีโอไทด์มี 4 ชนิด ทำให้การเปลี่ยนแปลงจำนวนมากเริ่มที่จะเกิดความคล้ายกัน ถ้าแขนงมีความยาวมาก ความคล้ายกันเหล่านี้จะกลบลักษณะของ phylogeny ที่แท้จริง แล้วลำดับเหล่านั้นจะดึงดูดกันเอง ซึ่งจะเป็นปัญหาหลายอย่าง ปัญหาอย่างหนึ่ง คือ ทำให้ค่า bootstrap ของ tree ไม่ดี วิธีการทดสอบว่ามีลักษณะของแขนงยาวเกิดขึ้นในชุดข้อมูลหรือไม่ คือ ตัดลำดับเหล่านี้ออกไปจากชุดข้อมูล แล้วหาค่า bootstrap ใหม่ดูว่าค่าจะเพิ่มขึ้นหรือไม่ การใช้วิธีอื่น เช่น maximum likelihood จะถูกผลกระทบจากปัญหานี้น้อยกว่า วิธีที่ดีที่สุดในการแยกส่วนของแขนงยาวทำได้โดยการหาลำดับที่อยู่ระหว่างกลางมาใส่รวมใน tree แล้วตรวจดูว่าลำดับนั้นเข้ากันดีกับลำดับที่เหลือหรือไม่

5. การนำเสนอข้อมูล การนำเสนอ phylogenetic tree มีหลักปฏิบัติที่ยอมรับ คือ (1) ความยาวของแขนงจะเขียนตามสเกล (คือเป็นสัดส่วนกับปริมาณของวิวัฒนาการ) ทุกครั้ง แม้ว่าความสัมพันธ์ระหว่างความยาวของแขนงและช่วงเวลาจริงจะห่างไกลกัน ถ้าเขียนตรงไปตรงมาอาจไม่น่าเชื่อถือสำหรับยืน ๆ เดียว แต่ความยาวยังคงให้ภาพที่ดีสำหรับแสดงอัตราการเปลี่ยนแปลงสัมพัทธ์ตลอด tree (2) ให้ออกค่า bootstrap เป็นเปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะทำให้ tree อ่านและเปรียบเทียบกันได้ง่ายและรายงานผลเพียงถ้าค่า bootstrap นั้นสูงกว่าหรือเท่ากับ 50% (3) เลือกใช้ OTU ที่มีความหมาย

6.4 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการกับการนำมาใช้ประโยชน์

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis) โดยการสร้าง phylogenetic tree นอกจากจะใช้เพื่อศึกษาวิวัฒนาการและความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตแล้ว ยังสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในด้านต่าง ๆ เช่น

1. ช่วยในการศึกษาความหลากหลายของของสารประกอบชนิดต่าง ๆ ได้แก่สารประกอบปฐมภูมิ (primary metabolite) และสารประกอบทุติยภูมิ (secondary metabolite) ที่สิ่งมีชีวิตชนิดนั้นสร้างขึ้น โดยสิ่งมีชีวิตที่มีสายพันธุ์ใกล้เคียงกัน หรือมีลำดับวิวัฒนาการที่ใกล้เคียงกัน ก็จะมี

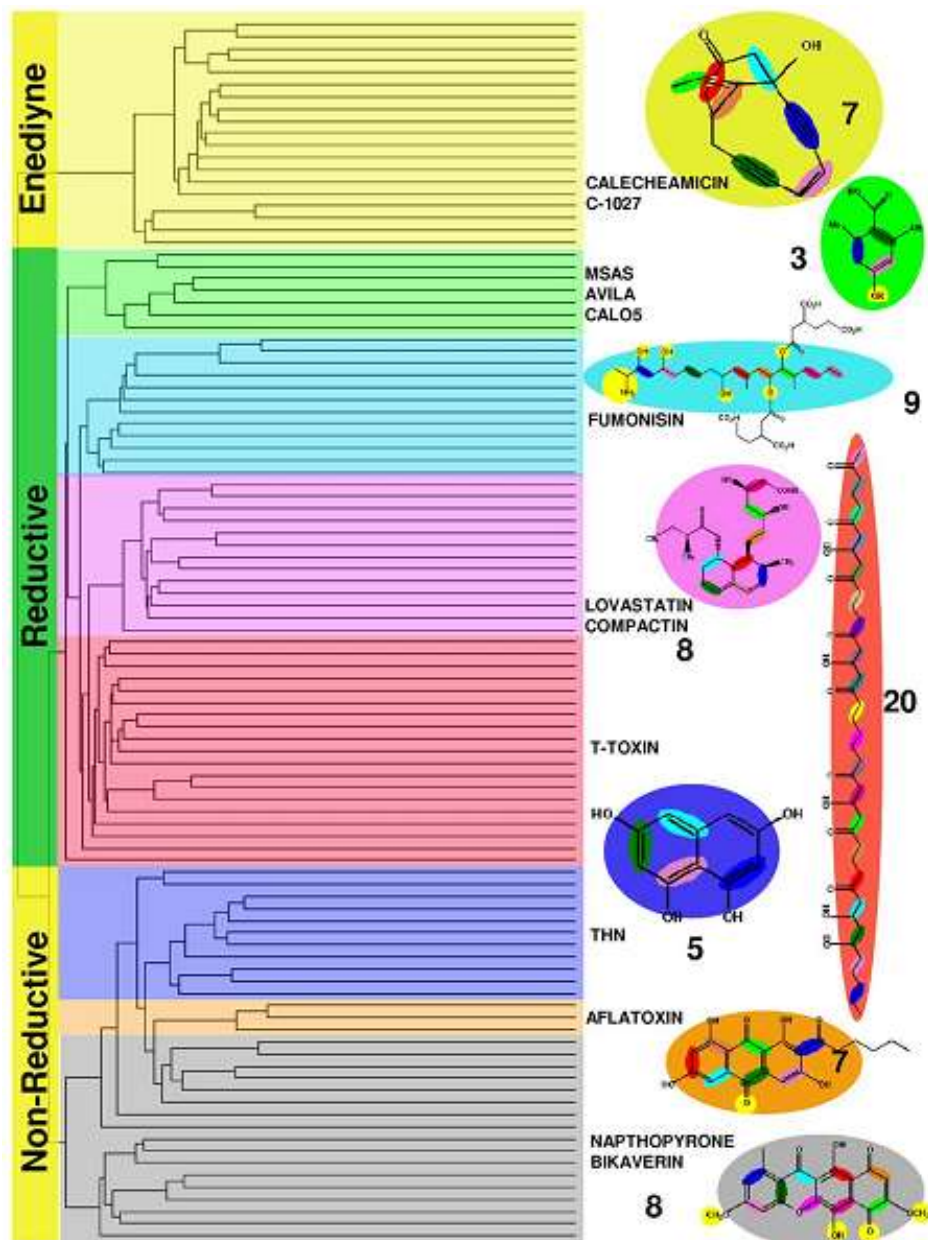
metabolite ชนิดต่าง ๆ ที่ใกล้เคียงกันด้วย ทำให้เป็นประโยชน์ต่อการคัดเลือกสายพันธุ์เพื่อใช้ผลิตสารที่ต้องการ (ภาพที่ 6)

2. ประโยชน์ทางระบาดวิทยา การควบคุมโรคติดต่อ และการออกแบบวัคซีน เช่น การวิเคราะห์ phylogenetic tree ของแบคทีเรีย enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคท้องร่วงสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่มาจากหลายแหล่งภูมิศาสตร์และชนิดของโฮสต์ ช่วยให้เข้าใจการได้รับยีนของสารพิษที่ก่อความรุนแรงในการเกิดอาการท้องเสียจากแบคทีเรียชนิดนี้ (Turner และคณะ, 2006) หรือการวิเคราะห์ phylogenetic tree ของไวรัสโพลีโอและไวรัส coxsackie ที่จัดรวมอยู่ในเอ็นเทอร์โรไวรัสคัลลัสเตอร์ C ของคน (HEV-C) ช่วยให้สามารถทำนายความเป็นไปได้ที่ไวรัสโพลีโออาจจะกำเนิดมาจากการกลายพันธุ์ของไวรัสใกล้เคียงที่ก่อโรคไม่รุนแรง ทำให้ได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในโครงการณรงค์ทำลายล้างไวรัสโพลีโอทั่วโลก (Jiang และคณะ, 2007)

3. ใช้เป็นแผนที่นำทางเพื่อช่วยทำนายคุณสมบัติของสายพันธุ์ (species) ที่ยังไม่มีการศึกษา เพื่อค้นหาสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อใช้เป็นยา หรือเป็นเครื่องมือวิจัยทางสรีรวิทยา เช่น การใช้ phylogenetic tree ช่วยในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสายพันธุ์ต่าง ๆ ทำให้ทราบว่ารากลุ่มที่นำมาศึกษานี้มีศักยภาพในการสังเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใดบ้าง และอาจนำไปสู่การศึกษาเพื่อใช้ประโยชน์หรือการพบสายพันธุ์ใกล้เคียง หรืออาจใช้เป็นแหล่งของสารตั้งต้นทดแทนสารที่ต้องการ เช่น การใช้ใบของ *Taxus baccata* เป็นแหล่งของสารแทนการใช้เปลือกของ *T. brevifolia* ในการผลิตยาต้านมะเร็ง paclitaxel (Smith และ Wheeler, 2006)

4. นำไปสู่ความรู้ด้านความหลากหลายของสิ่งมีชีวิต สำหรับเป็นแหล่งศึกษาโครงสร้างและหน้าที่ และการออกแบบยารักษาโรค เช่น การวิเคราะห์ phylogenetic tree ของยีน eIF4E factor (Joshi และคณะ, 2005) หรือการวิเคราะห์ที่ทำให้พบว่า ภูและกิ้งก่ามีระบบพิษที่วิวัฒนาการจากจุดเริ่มต้นเดียวกันที่จะนำไปสู่การวิจัยทางชีวการแพทย์และการออกแบบยา (Fry และคณะ, 2006)

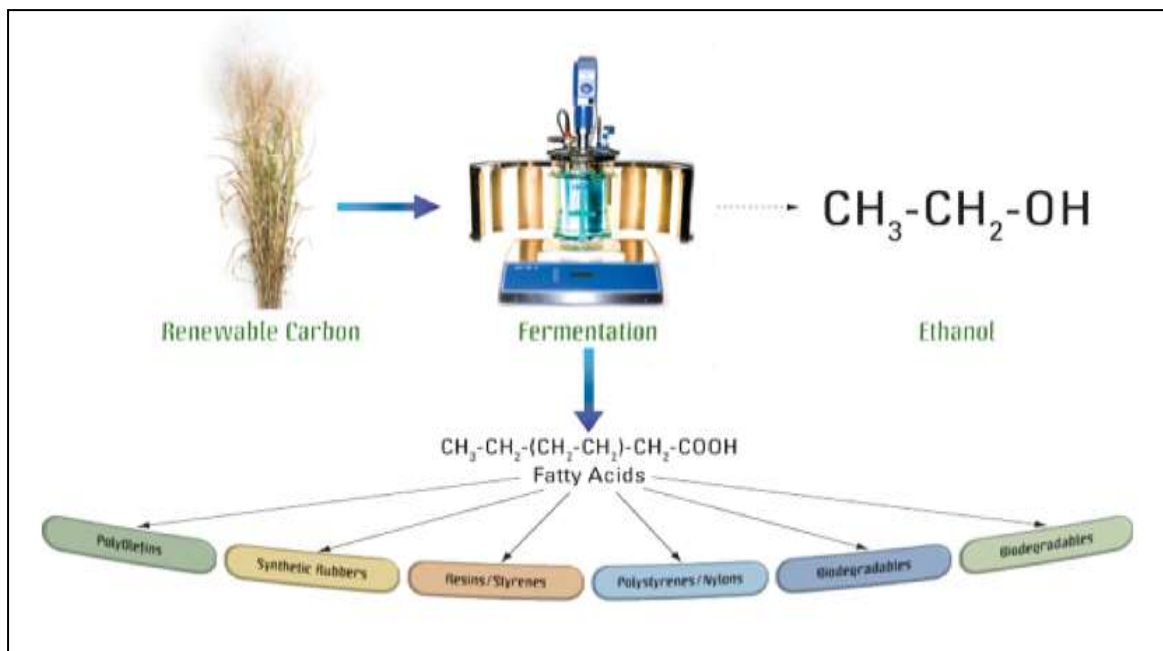
5. เป็นพื้นฐานสำหรับการออกแบบเวกเตอร์อะดีโนไวรัส (adenovirus) ให้มีความจำเพาะต่อเนื้อเยื่อ (Madisch และคณะ, 2007)



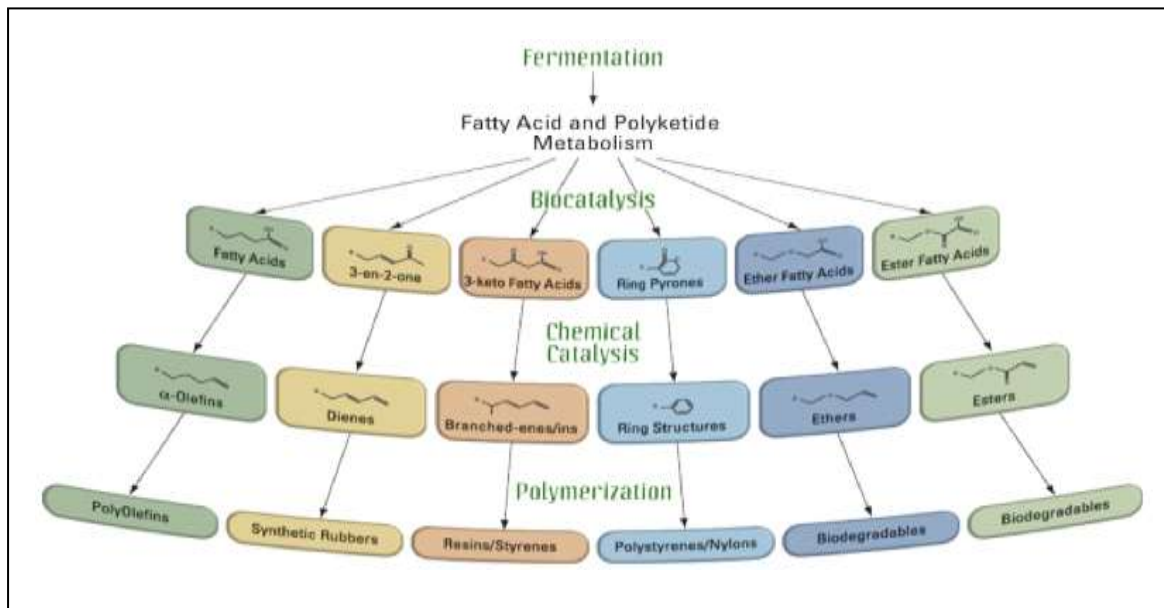
ภาพที่ 6 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของราชชนิดต่าง ๆ แสดงให้เห็นว่าราชที่นำมาศึกษานั้นมีศักยภาพที่จะสังเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพประเภทใดได้บ้าง (Yadav และคณะ, 2009)

6.5 การพัฒนาสารเมตาบอลิท์เพื่อใช้งานเชิงอุตสาหกรรม

ปัจจุบันพบว่าได้มีงานวิจัยหลากหลายที่สนใจที่จะนำเอาสารเมตาบอลิท์ที่ถูกสังเคราะห์ได้ในห้องปฏิบัติการทั่ว ๆ ไป เพื่อนำไปใช้งานในเชิงอุตสาหกรรม เช่น การนำงานวิจัยไปต่อยอดเพื่อสร้างยารักษาโรคหรือเวชภัณฑ์และเคมีภัณฑ์ต่าง ๆ นอกจากนั้นยังพบว่านักวิจัยในกลุ่ม NSF Engineering Research Center for Biorenewable Chemicals, Biorenewables Research Laboratory, Iowa State University of Science and Technology, USA. (CBiRC) ได้สนใจที่จะใช้เทคโนโลยีชีวภาพในการสร้างสารตั้งต้นชนิดต่าง ๆ เช่น สร้าง fatty acid, ring pyrone, ester & ether fatty acid จากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร (raw material) จากนั้นจะใช้กระบวนการทางเคมีและเอนไซม์เทคโนโลยีเพื่อที่จะเปลี่ยนสารข้างต้นให้ไปเป็นสาร polymer และ plastic ต่าง ๆ ทดแทนการใช้งานของสารจากอุตสาหกรรมปิโตรเคมีคอล (petrochemical industry) (ภาพที่ 7 และ 8)



ภาพที่ 7 แผนภูมิแนวคิดของงานวิจัยกลุ่ม CBiRC ที่จะเปลี่ยนวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรไปเป็นวัตถุดิบทดแทนเพื่อสังเคราะห์พลาสติกและโพลีเมอร์ต่าง ๆ แทนการใช้น้ำมันปิโตรเลียม
[<http://www.cbirc.iastate.edu/overview.asp>]



ภาพที่ 8 แผนภูมิแนวความคิดของกลุ่มวิจัย CBIRC ที่จะใช้เทคโนโลยีทางด้านยีนและเอนไซม์ในการเปลี่ยนวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรไปเป็นสารโมโนเมอร์รูปแบบง่าย ๆ ก่อนที่จะใช้เทคโนโลยีทางเคมีในการเปลี่ยนโครงสร้างสารโมโนเมอร์ให้มีความซับซ้อนขึ้น

[<http://www.cbirc.iastate.edu/vision.asp>]

จากแนวคิดของกลุ่มวิจัย CBIRC ที่จะใช้เทคโนโลยีชีวภาพทางด้านยีนและเอนไซม์ร่วมกับกระบวนการหมัก เพื่อเปลี่ยนรูปวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรให้ไปเป็นสารทดแทนพลาสติกและโพลีเมอร์ (bioplastic และ biopolymer) ที่ได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี ซึ่งนอกจากจะเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรแล้ว ยังเป็นการลดการใช้น้ำมันดิบที่มีแนวโน้มว่าจะหมดไปในอนาคตแล้ว ยังเป็นการลดสภาวะโลกร้อน (global warming) ในทางอ้อมได้ด้วย

นอกจากแนวคิดที่จะเป็นวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรไปเป็นสารมูลค่าสูง (high value compounds) อื่น ๆ แล้ว ยังพบว่าสารเมตาบอไลต์กลุ่มโพลีคีไทด์ยังถูกพัฒนาเพื่อใช้เป็นยารักษาโรคต่าง ๆ เช่น ใช้รักษาโรคมะเร็ง ใช้เป็นยาฆ่าเชื้อแบคทีเรียและรา ใช้เป็นสารก่อกำเนิดก้อนและใช้เป็นสารลดโคเลสเตอรอลได้เช่นกัน (ตารางที่ 3) (Carreras และคณะ, 2000)

ตารางที่ 3 สารประกอบโพลีคีไทด์ที่นำมาใช้เป็นยารักษาโรค

Product	Therapeutic area	Company
Azithromycin	Antibacterial	Pfizer
Clarithromycin	Antibacterial	Abbott
Erythromycin	Antibacterial	Abbott, others
Josamycin	Antibacterial	Yamanouchi
Minocycline (Dynacil)	Antibacterial	Wyeth-Ayerst
Miokamycin	Antibacterial	Meiji Seika
Mycinamicin	Antibacterial	Asahi
Oleandomycin	Antibacterial	Pfizer
Pseudomonic acid	Antibacterial	SmithKline Beecham
Rifamycins (Rifampin)	Antibacterial	Novartis, Lepetit
Tetracyclines	Antibacterial	Asahi
Aclarubicin (Aclacinomycin)	Anticancer	Pfizer, Weth-Ayerst
Adriamycin (Doxorubicin)	Anticancer	Bristol-Myers squibb
Chromomycin	Anticancer	Pharmacia-Upjohn
Daunorubicin	Anticancer	Takeda
Enediynes	Anticancer	Astra, Chiron
Idarubicin (Idamycin)	Anticancer	Pharmacia-Upjohn
Amphotericin B	Antifungal	Bristol-Myers Squibb
Candididin	Antifungal	Hoechst Marion Roussel
Griseofulvin	Antifungal	Schering, Wyeth-Ayerst, Ortho
Nystatin/Mycostatin	Antifungal	Bristol-Myers Squibb, others
Spiramycin	Antirickettsial	Rhone-Poulenc
Mevacor (Lovastatin)	Cholesterol-lowering	Merck
Mevastatin (Compactin)	Cholesterol-lowering	Sankyo
Pravastatin	Cholesterol-lowering	Sankyo, Bristol-Myers Squibb
Zocor	Cholesterol-lowering	Merck
Zearalenone	Estrogenic activity	
Ascomycin (Immunomycin)	Immunosuppressant	Merck
FK506	Immunosuppressant	Fujisawa
Rapamycin	Immunosuppressant	Wyeth-Ayerst
Spinosad	Insecticide	Dow Elanco
Avermectin	Veterinary product	Merck
Lasalocid A	Veterinary product	Hoffman LaRoche
Milbemycin	Veterinary product	Sankyo

วิธีดำเนินการวิจัย

- 7.1 เก็บตัวอย่างราในกลุ่ม *Xylaria* จากเศษซากพืชในบริเวณต่าง ๆ และซื้อตัวอย่างราเพิ่มเติมจาก Biotec Culture Collection
- 7.2 นำราที่เก็บได้มาคัดแยกให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์
- 7.3 นำตัวอย่างรามาทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร malt extract agar (MEA) เพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ หลังจากนั้นจึงนำมาเลี้ยงในอาหาร malt extract broth (MEB) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 อาทิตย์และทำการสกัด genomic DNA
- 7.4 นำ genomic DNA ที่ได้จากราแต่ละชนิดมาใช้เป็นต้นแบบสำหรับการขยายยีนบริเวณ Internal Transcribed Spacer (ITS) ใน nuclear ribosomal DNA ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ primer ITS4 และ ITS5 นำ PCR product ที่ได้ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับการศึกษาวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis)
- 7.5 นำราที่ได้จากข้อ 7.3 มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรมาตรฐาน Malt Extract Broth (MEB) และ Yeast Extract Sucrose (YES) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 วัน โดยเขย่าที่ 150 rpm ทำซ้ำ 3 ครั้ง
- 7.6 นำ fermentation broth มาวิเคราะห์ด้วย HPLC เพื่อหาในกลุ่ม primary metabolite ที่สามารถนำมาใช้เป็น building block สำหรับการผลิตวัสดุชีวภาพ และนำ fermentation broth อีกส่วนหนึ่งมาสกัดด้วยตัวทำละลาย ethyl acetate หลังจากนั้นจึงระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง vacuum evaporator และนำ crude extract ที่ได้มาละลายใน acetonitrile และฉีดเข้าเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยใช้ C-18 reverse phase column วิเคราะห์ extracellular metabolite ที่ผลิตได้ และศึกษา metabolite profiling ของ *Xylaria* แต่ละชนิด เพื่อใช้เป็นข้อมูลสำหรับการทำ chemotaxonomy
- 7.7 วิเคราะห์ผลการทดลองและเปรียบเทียบ phylogenetic tree ที่ได้จากข้อ 7.4 และ 7.6 ว่ามีความคล้ายคลึงหรือแตกต่างกันอย่างไร และใช้เป็นข้อมูลแสดงความหลากหลายของสารประกอบในกลุ่ม polyketide และ non-ribosomal peptide ในรา *Xylaria* ที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์เป็นสารตั้งต้นสำหรับการผลิตวัสดุชีวภาพชนิดต่าง ๆ ได้

ผลการทดลองและวิจารณ์

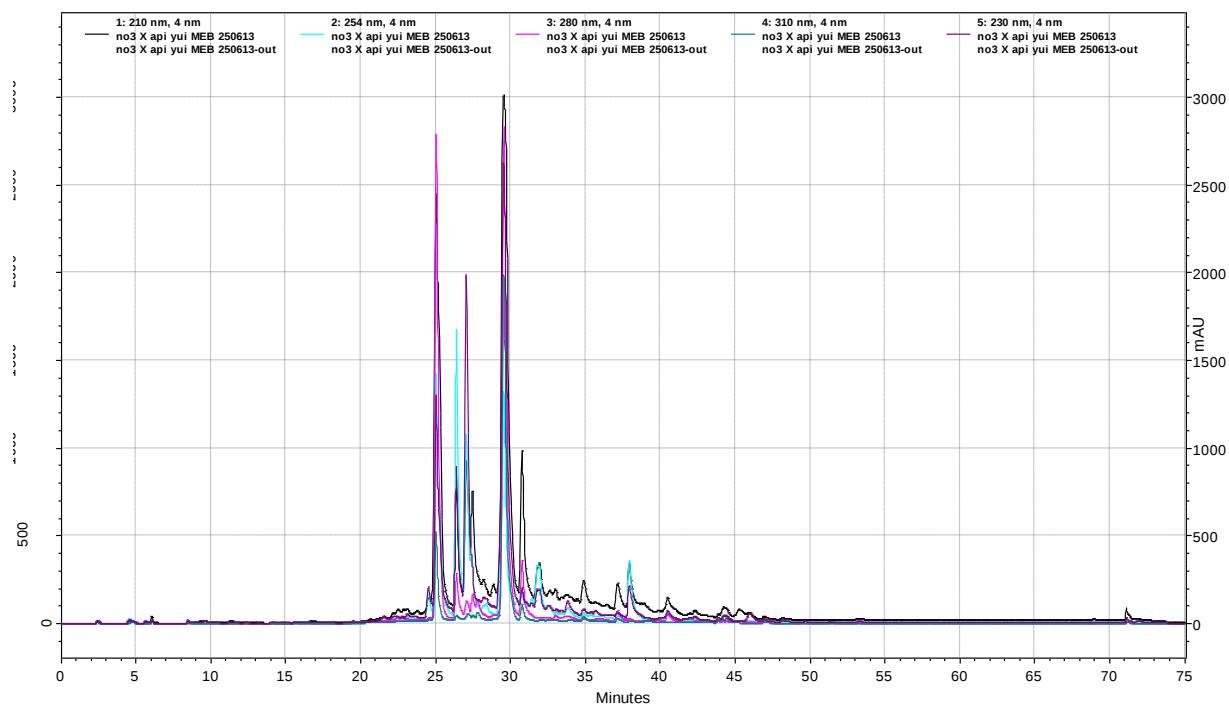
ผลการคัดแยกและการจำแนกชนิดของตัวอย่างรา

ในการเก็บตัวอย่างราจากเศษซากพืชในบริเวณต่าง ๆ พบว่ามีราในกลุ่ม *Xylaria* หลายชนิดที่มีลักษณะแตกต่างกัน จากนั้นจึงนำมาคัดแยกให้เป็นสายพันธุ์บริสุทธิ์และทำการสกัด DNA และ amplify ยีนในบริเวณ Internal Transcribed Spacer (ITS) พบว่าสามารถจำแนกราได้ ดังนี้

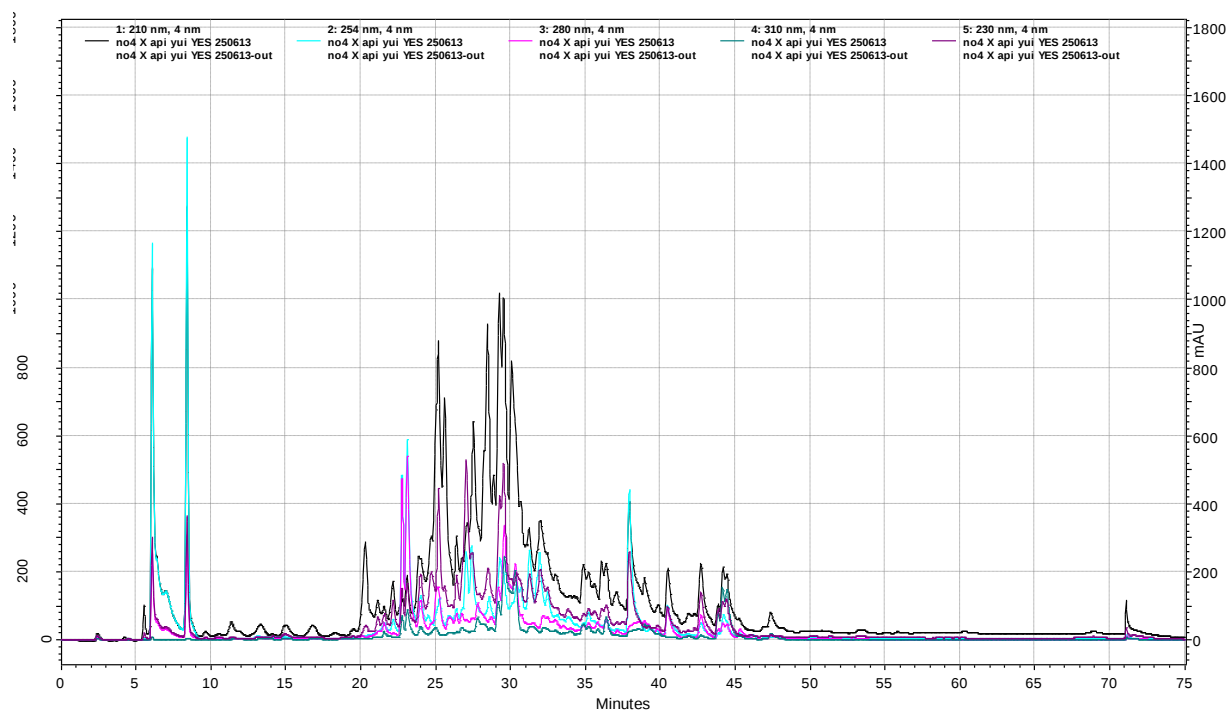
ลำดับที่	ชนิดของราในกลุ่ม <i>Xylaria</i> ที่จำแนกได้
1	<i>Xylaria cubensis</i>
2	<i>Xylaria globosa</i>
3	<i>Xylaria grammica</i>
4	<i>Xylaria multiplex</i>
5	<i>Xylaria nigripes</i>
6	<i>Xylaria telfeirii</i>
7	<i>Xylaria apiculata</i>
8	<i>Xylaria arbuscula</i>
9	<i>Xylaria hypoerythra</i>
10	<i>Xylaria obovata</i>

นอกจากนี้ยังได้รับตัวอย่างรา *Xylaria* sp. BCC 1067 อีก 1 ชนิด เพิ่มเติมจาก Biotec Culture Collection จากนั้นรา *Xylaria* ทั้ง 11 ชนิดได้ถูกนำมาเพาะเลี้ยงในอาหาร MEB และ YES ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 วัน เพื่อนำมาศึกษา metabolite profile ต่อไป ซึ่งสามารถแสดงได้ ดังนี้

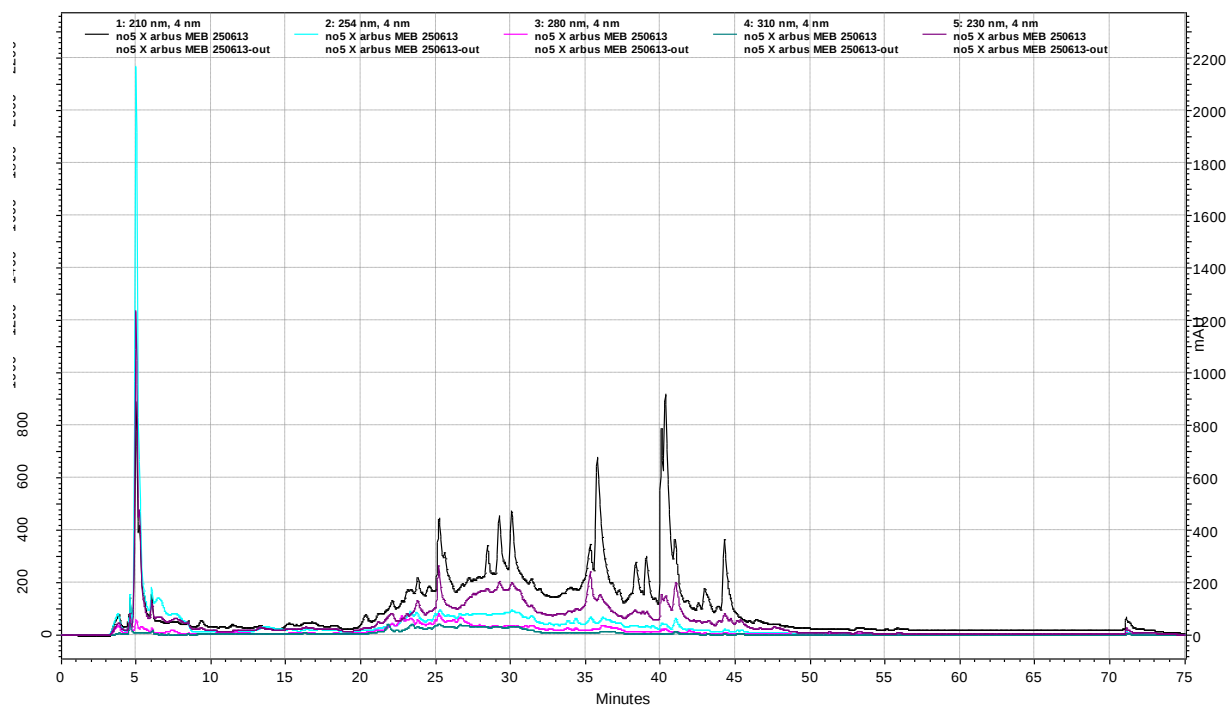
ตัวอย่างที่ 1: metabolite profile ของ *X. apiculata* ในอาหาร MEB



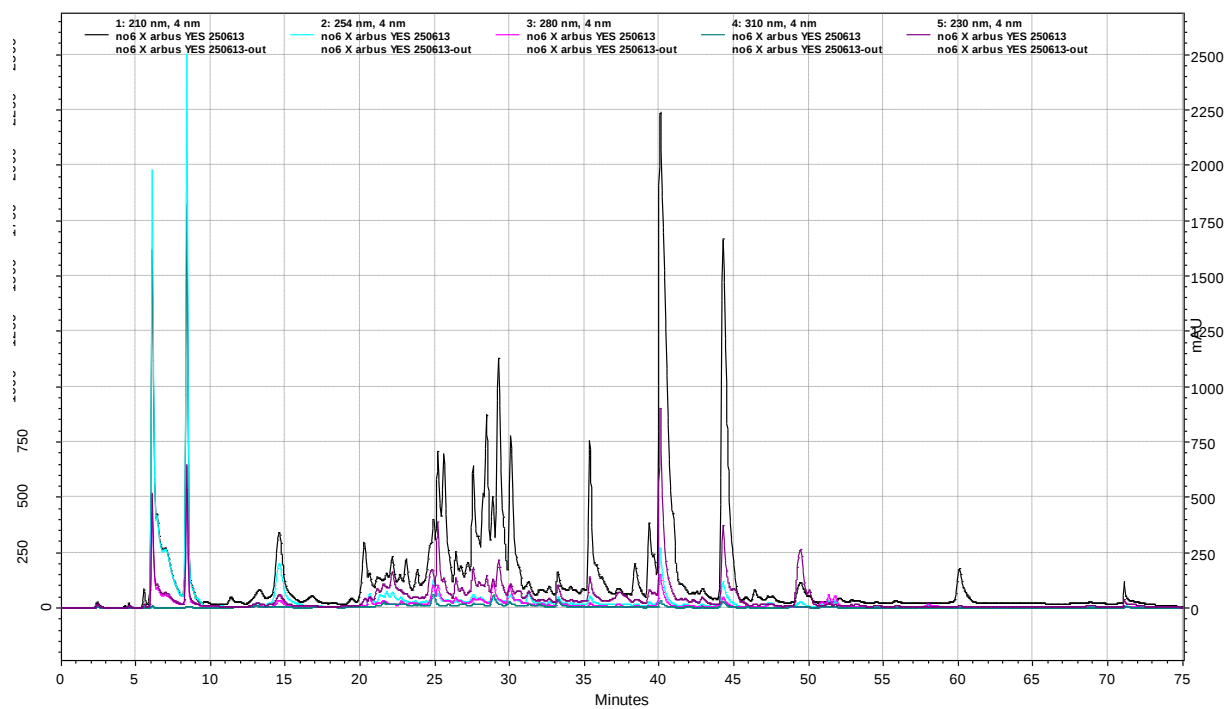
ตัวอย่างที่ 2: metabolite profile ของ *X. apiculata* ในอาหาร YES



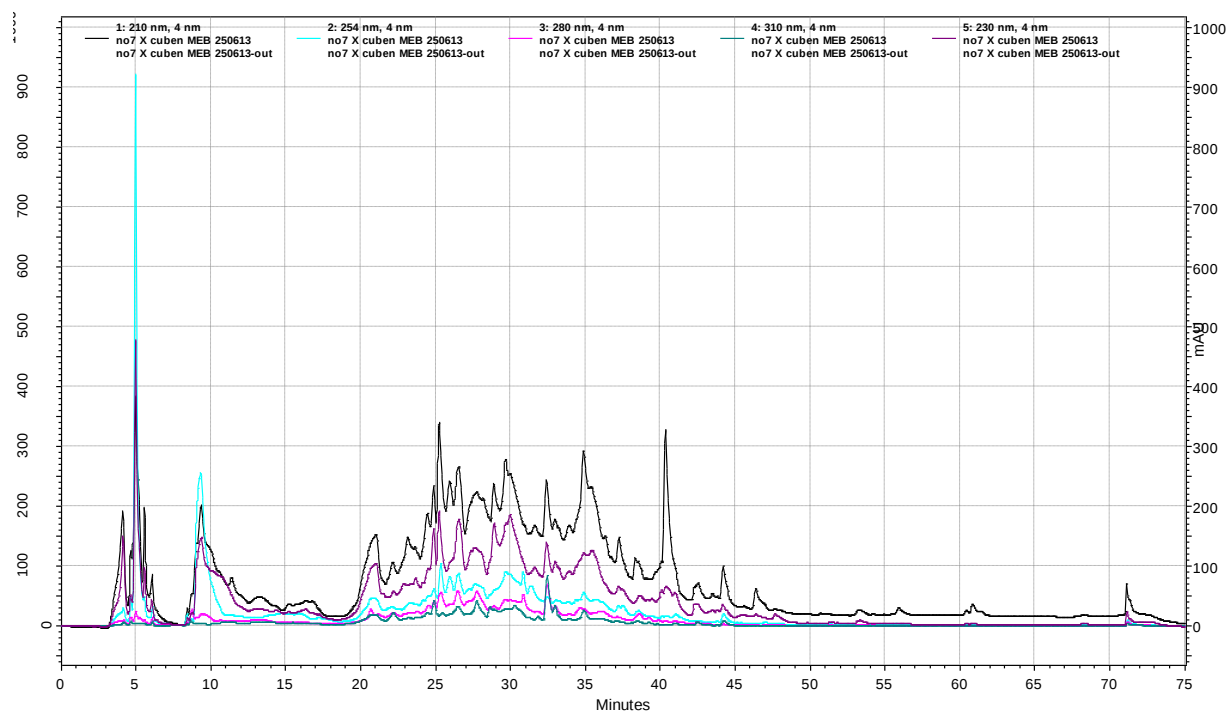
ตัวอย่างที่ 3: metabolite profile ของ *X. arbuscula* ในอาหาร MEB



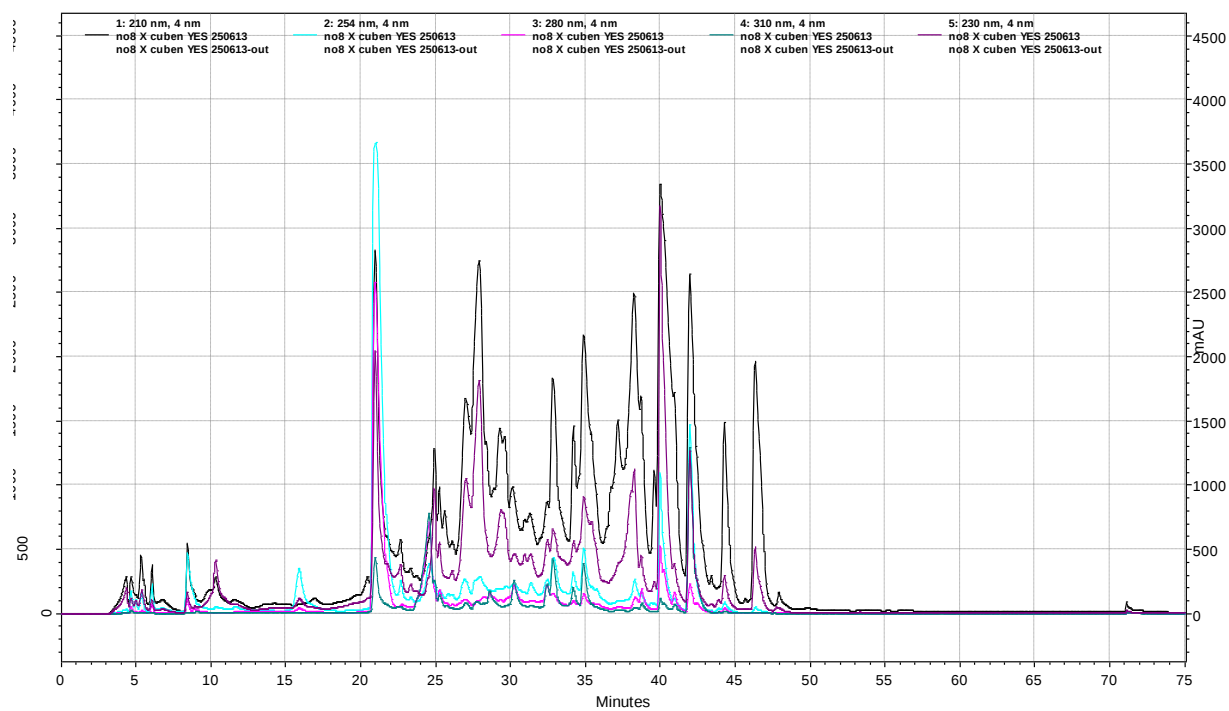
ตัวอย่างที่ 4: metabolite profile ของ *X. arbuscula* ในอาหาร YES



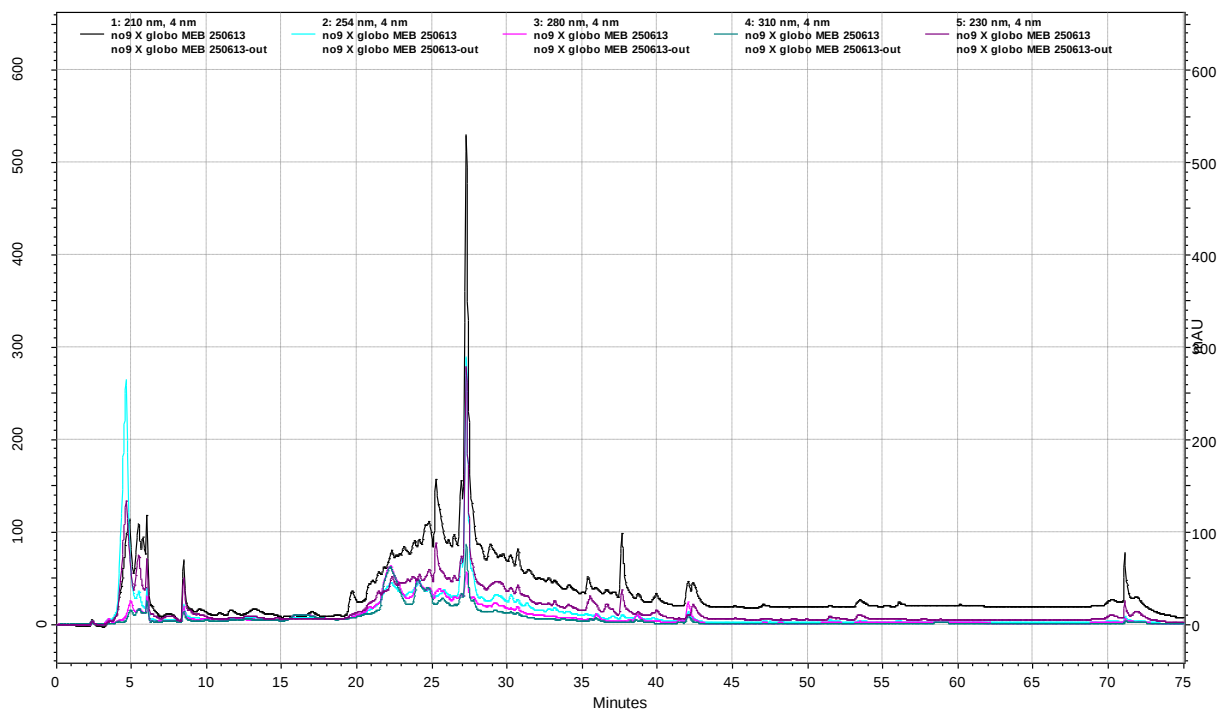
ตัวอย่างที่ 5: metabolite profile ของ *X. cubensis* ในอาหาร MEA



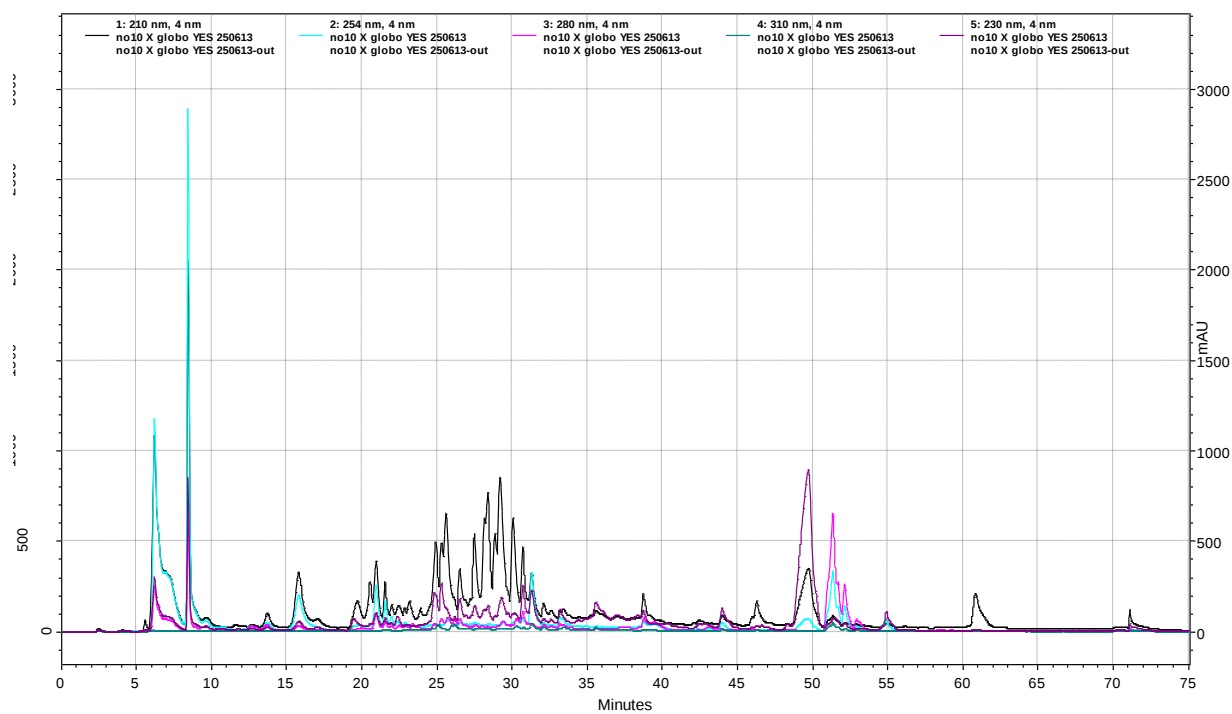
ตัวอย่างที่ 6: metabolite profile ของ *X. cubensis* ในอาหาร YES



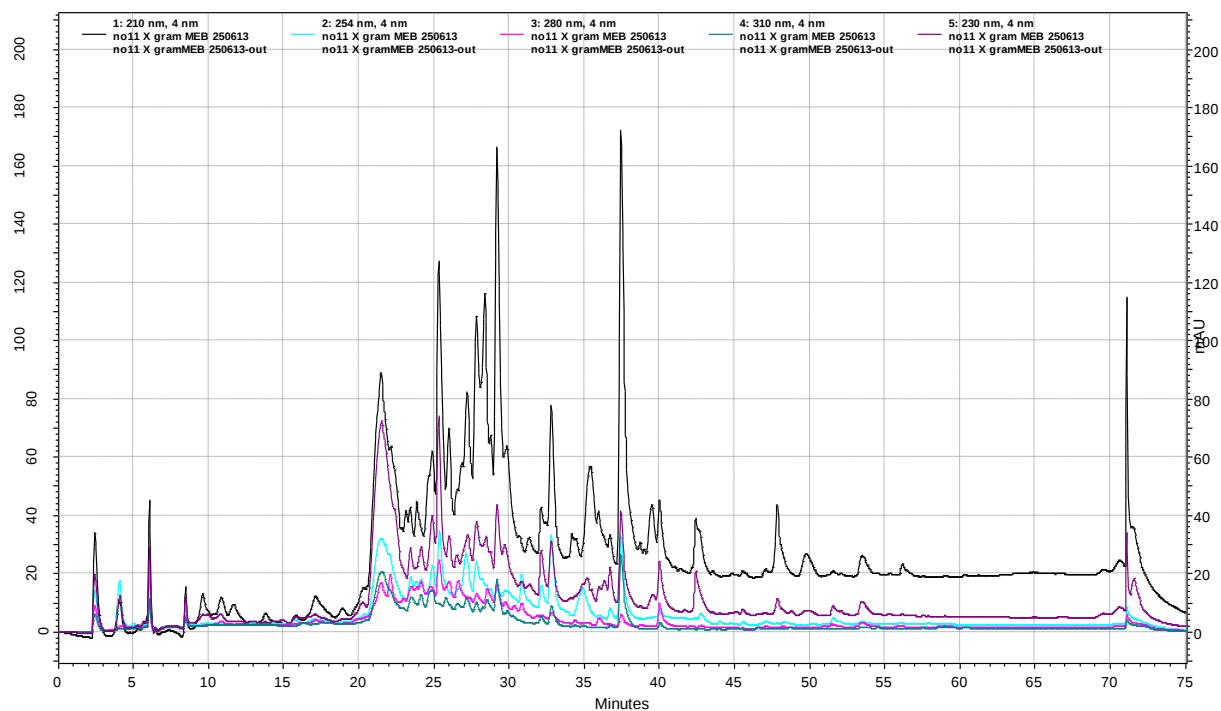
ตัวอย่างที่ 7: metabolite profile ของ *X. globosa* ในอาหาร MEA



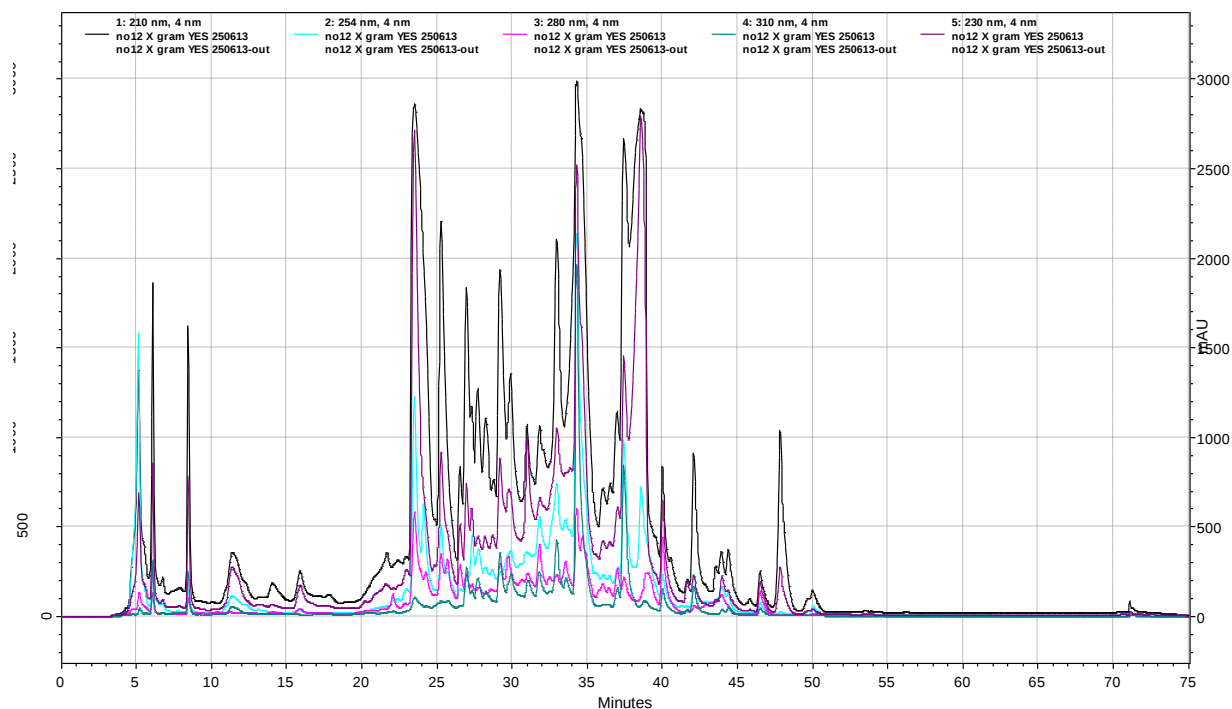
ตัวอย่างที่ 8: metabolite profile ของ *X. globosa* ในอาหาร YES



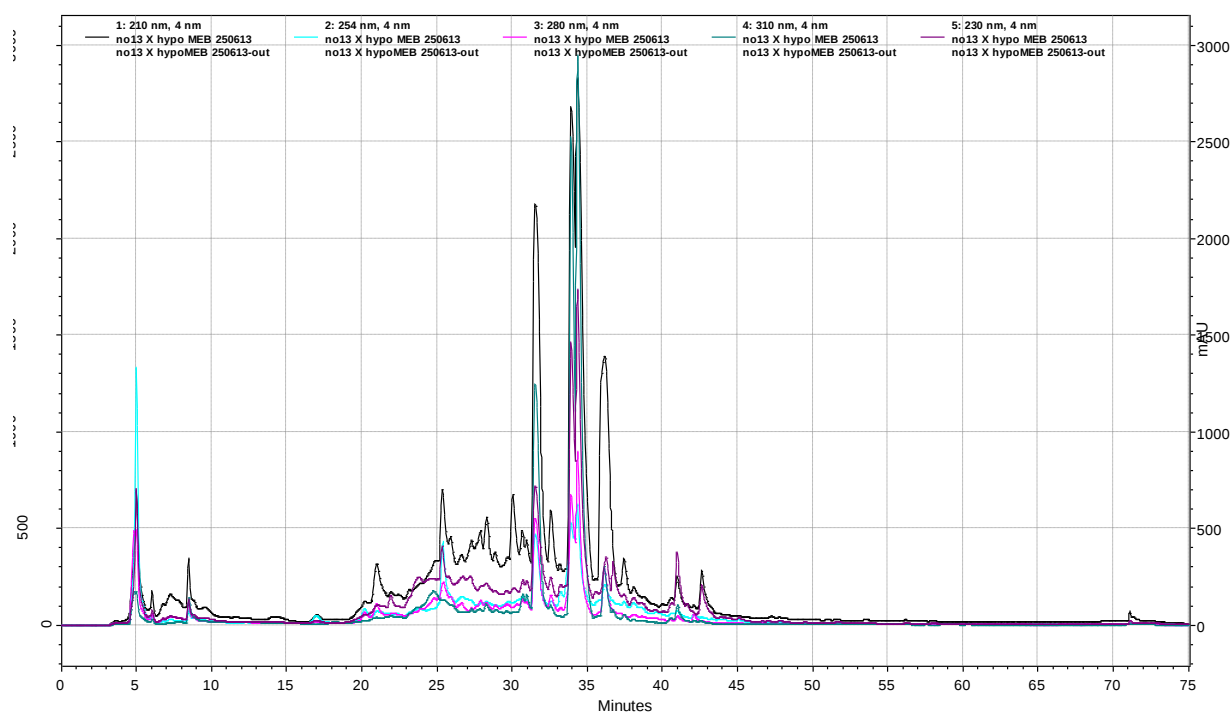
ตัวอย่างที่ 9: metabolite profile ของ *X. grammica* ในอาหาร MEA



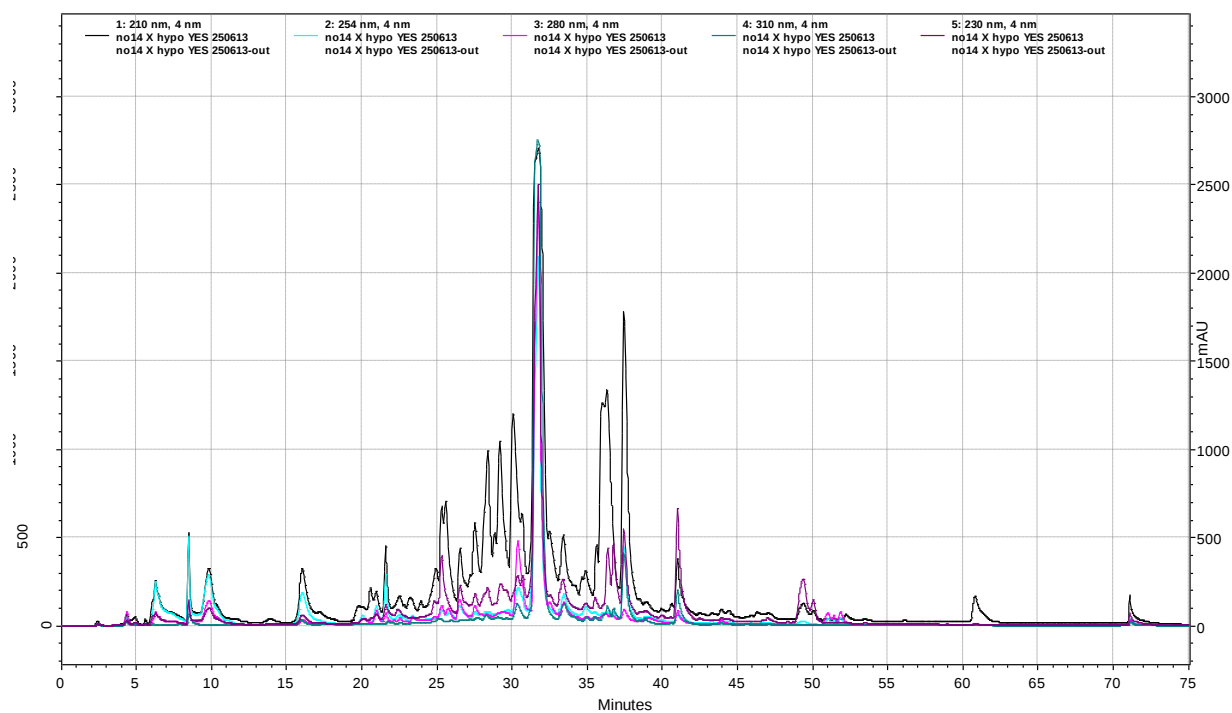
ตัวอย่างที่ 10: metabolite profile ของ *X. grammica* ในอาหาร YES



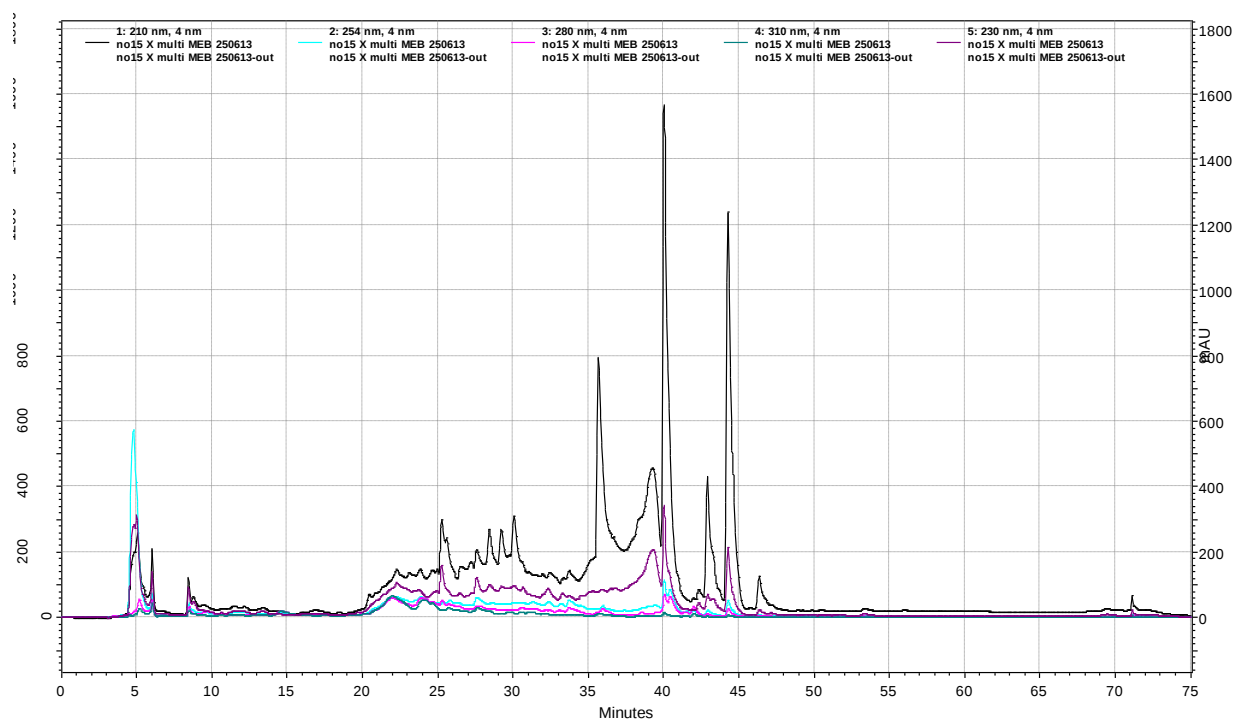
ตัวอย่างที่ 11: metabolite profile ของ *X. hypoerythra* ในอาหาร MEA



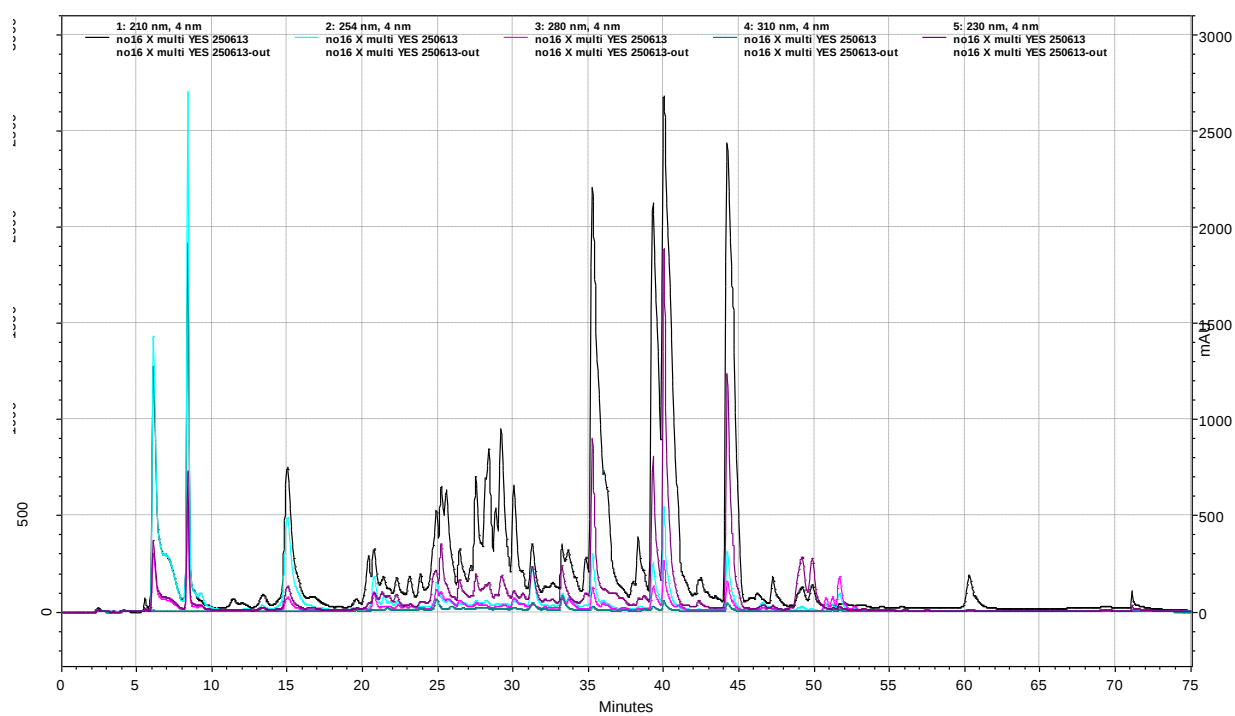
ตัวอย่างที่ 12: metabolite profile ของ *X. hypoerythra* ในอาหาร YES



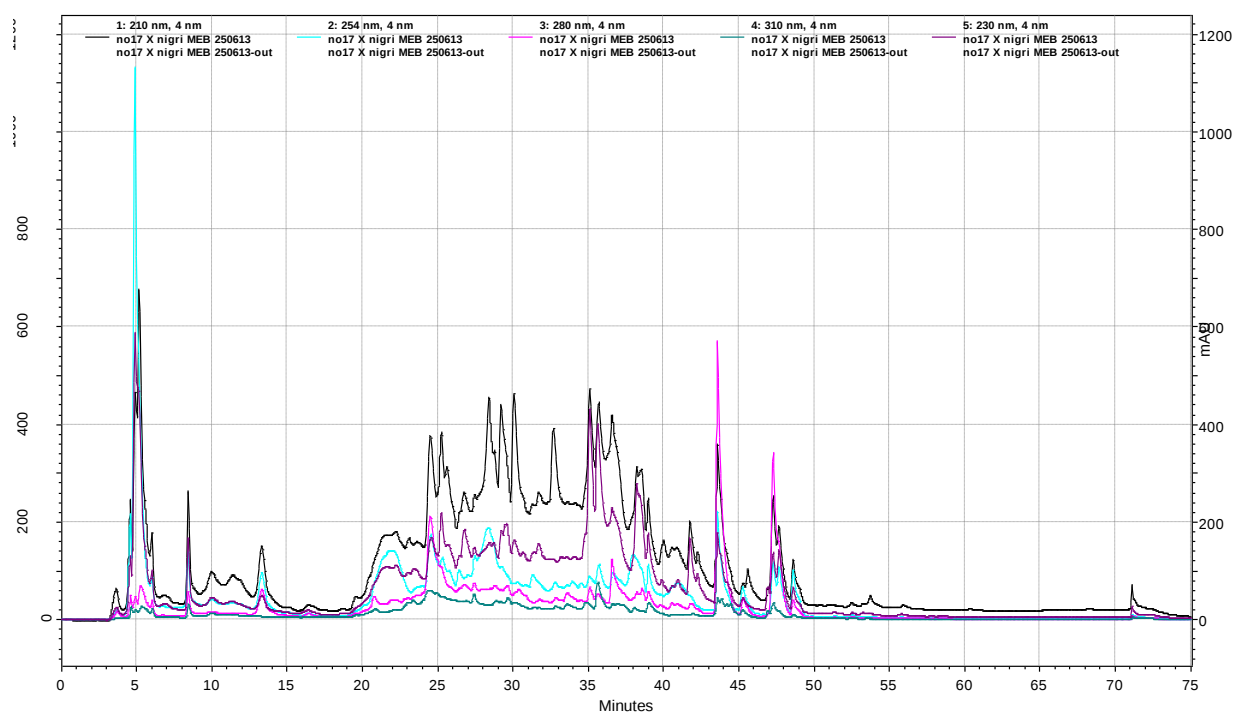
ตัวอย่างที่ 13: metabolite profile ของ *X. multiplex* ในอาหาร MEA



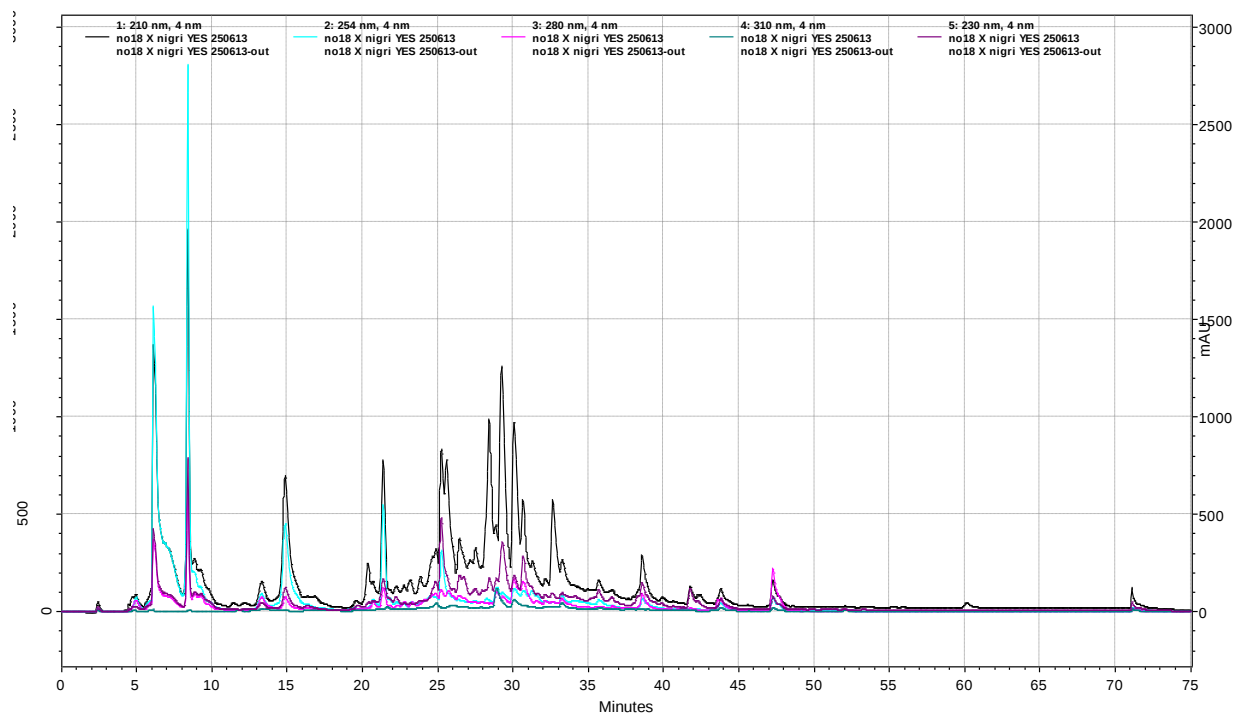
ตัวอย่างที่ 14: metabolite profile ของ *X. multiplex* ในอาหาร YES



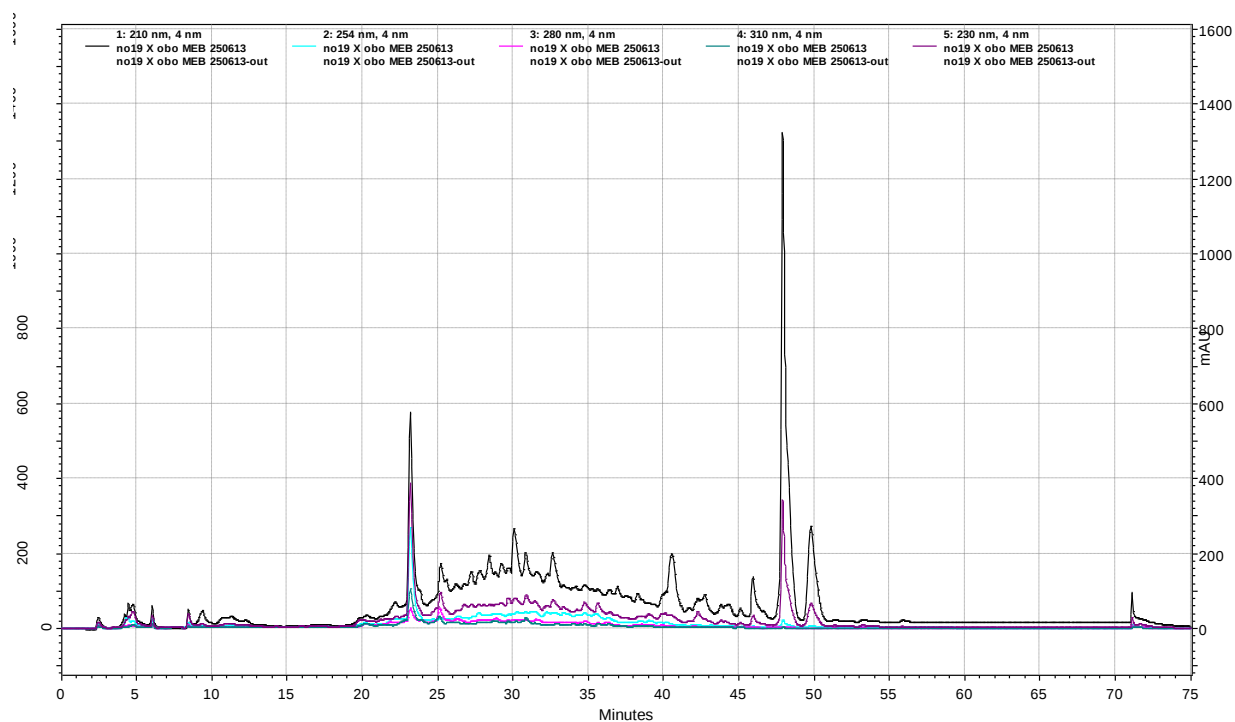
ตัวอย่างที่ 15: metabolite profile ของ *X. nigripes* ในอาหาร MEA



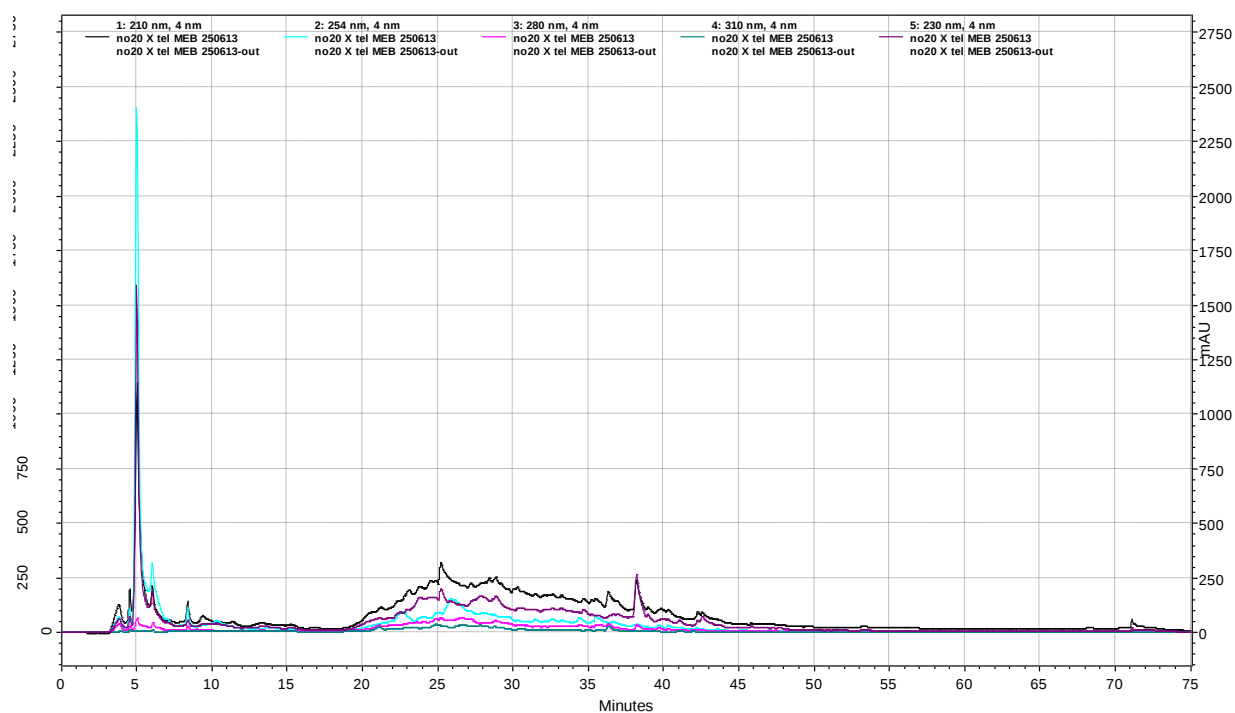
ตัวอย่างที่ 16: metabolite profile ของ *X. nigripes* ในอาหาร YES



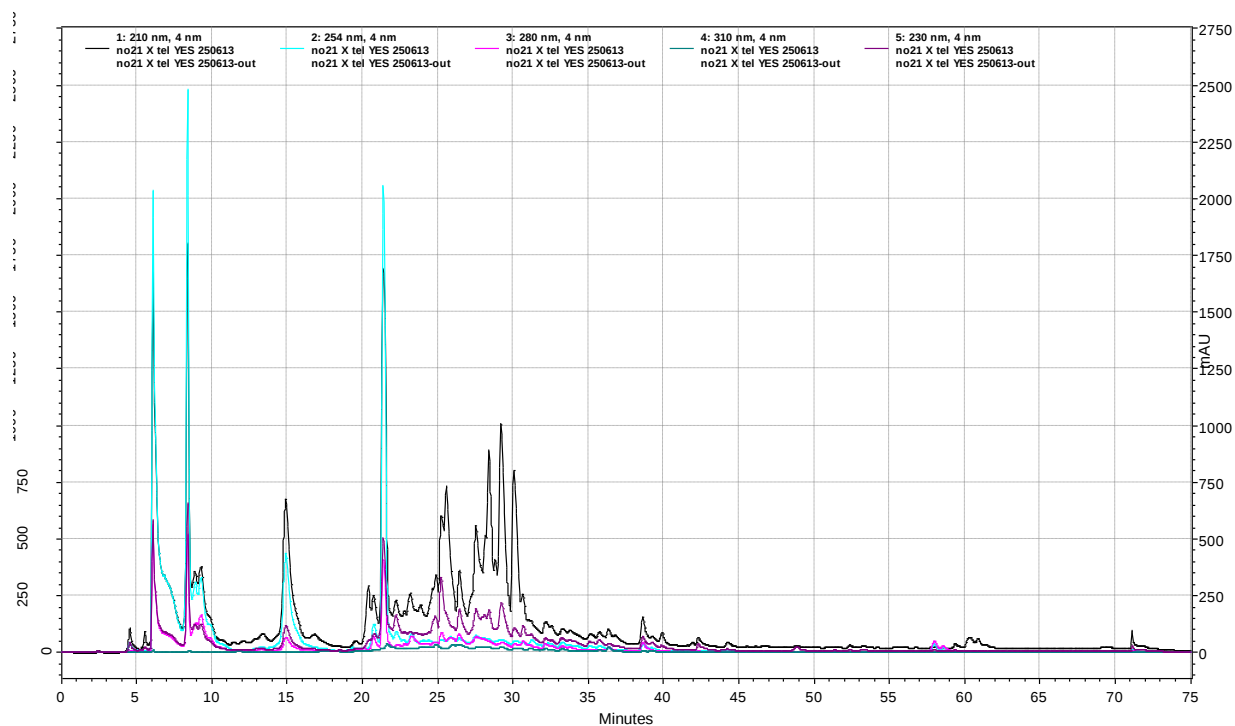
ตัวอย่างที่ 17: metabolite profile ของ *X. obovata* ในอาหาร MEA



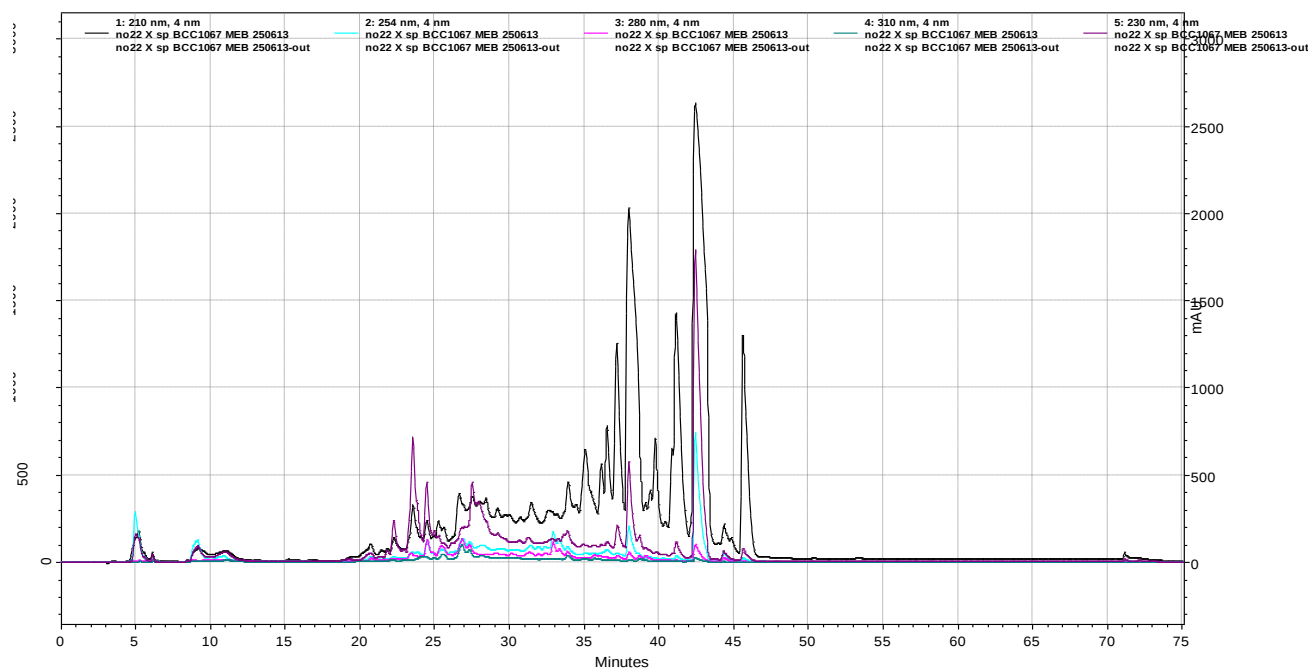
ตัวอย่างที่ 18: metabolite profile ของ *X. telfeiri* ในอาหาร MEA



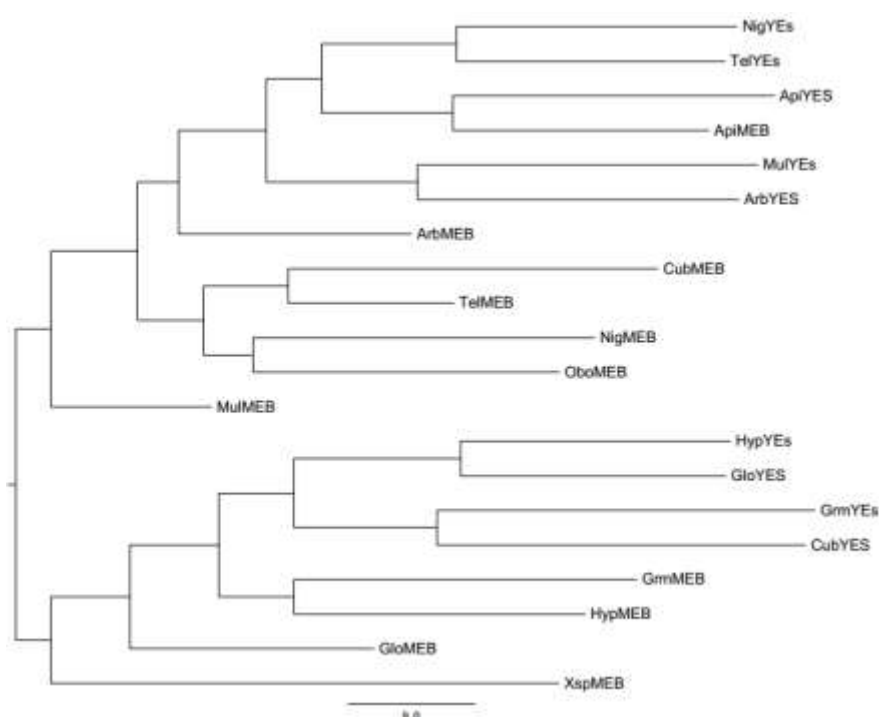
ตัวอย่างที่ 19: metabolite profile ของ *X. telfeirii* ในอาหาร YES



ตัวอย่างที่ 20: metabolite profile ของ *Xylaria* sp. BCC 1067 ในอาหาร MEA

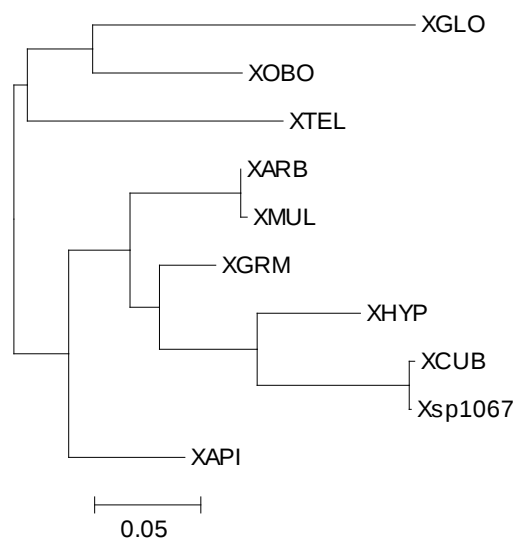


จากผลการทดลอง เมื่อนำรา *Xylaria* ชนิดต่าง ๆ เมื่อนำมาเลี้ยงลงในอาหาร YES และ MEB พบว่า metabolite profile ของราชนิดต่าง ๆ จะมีอย่างน้อยแตกต่างกัน และมีรูปแบบการผลิตสาร secondary metabolite ที่แตกต่างกันออกไป ในการทดลองนี้ยังไม่ได้มีการนำ MS (mass spectrometry) มาช่วยในการวิเคราะห์ จึงยังไม่สามารถชี้ชัดได้ว่าแต่ละพิกคือสารอะไร มีมวลเท่าไร อย่างไรก็ตามได้มีการนำพิกที่เกิดขึ้นในแต่ละเวลา (retention time) ในแต่ละ metabolite profile มาทำการเปรียบเทียบกัน และสร้างเป็น phylogenetic tree พบว่าสามารถแสดงได้ดังภาพที่ 9 โดยพบว่า อาหาร YES จะให้ metabolite profile ที่ใกล้เคียงกัน ส่วน อาหาร MEB ที่เลี้ยงรา *Xylaria* แต่ละชนิด ก็ให้ metabolite profile ที่ใกล้เคียงกันเช่นกัน



ภาพที่ 9 phylogenetic tree แบบ parsimony ของรา *Xylaria* ตามชนิดของสารเคมีที่ผลิตในอาหาร MEA และ YES

เมื่อนำลำดับ nucleotide บริเวณ Internal Transcribed Spacer (ITS) ที่เกิดจากการ amplify ขึ้นส่วนของ DNA ด้วย primer ITS4 (5'-TCC-TCC-GCT-TAT-TGA-TAT-GC-3') และ ITS5 (5'-GGA-AGT-AAA-AGT-CGT-AAC-AAG-G-3') ของราแต่ละชนิด มาทำ phylogenetic tree ด้วยวิธี parsimony พบว่าสามารถจำแนกได้ดังภาพที่ 10



ภาพที่ 10 phylogenetic tree ของราในกลุ่ม *Xylaria* เมื่อจำแนกโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ Internal Transcribed Spacer (ITS)

ผลการทำ phylogeny พบว่า phylogenetic tree ที่สร้างจาก metabolite profile กับ ลำดับ nucleotide มีความใกล้เคียงกันเฉพาะในบางสายพันธุ์ แต่บางสายพันธุ์นั้น phylogenetic tree ทั้งสองจะมีความแตกต่างกัน ดังนั้นการใช้ phylogenetic tree เพื่อทำนายการผลิตสารประกอบในกลุ่ม polyketide และ non-ribosomal peptide จึงเฉพาะกับบางสายพันธุ์เท่านั้น

การตรวจสอบชนิดของ building block จากน้ำหนักของราชชนิดต่าง ๆ

ในการทดลองนี้ได้นำรา *Xylaria* ชนิดต่าง ๆ มาทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร MEA จากนั้นทำการตรวจสอบชนิดของ building block ที่พบในน้ำหนักด้วยวิธี HPLC ซึ่งสามารถแสดงได้ตามตารางดังนี้

	<i>X. api</i>	<i>X. arb</i>	<i>X. cub</i>	<i>X. glo</i>	<i>X. gra</i>	<i>X. hyp</i>	<i>X. mul</i>	<i>X. nig</i>	<i>X. obo</i>	<i>X. tel</i>	<i>X. sp. 1067</i>
3 Carbon											
- 3-Hydroxypropionic acid	X		X	X		X					X
- Glycerol	X	X		X	X		X	X	X	X	X
- Lactic acid	X	X	X				X			X	X
- Propionic acid	X	X	X		X	X			X		
- Serine			X	X			X	X		X	X
4 Carbon											

- 3-Hydroxybutyrolactone											
- Acetoin	X										X
- Aspartic acid	X	X	X				X		X	X	X
- Fumaric acid		X			X	X	X		X		X
- Malic acid	X			X	X		X	X	X		X
- Succinic acid	X		X	X			X		X	X	X
- Threonine		X	X							X	X
5 Carbon											
- Arabitol	X	X		X			X		X		X
- Glutamic	X	X	X						X		X
- Itaconic acid				X		X					
- Xylitol	X		X		X	X	X	X		X	X
6 Carbon											
- 2,5 Furandicarboxylic acid											
- Aconitic acid	X					X					X
- Citric acid		X	X	X						X	
- Glucaric acid	X		X		X	X	X	X	X		X
- Gluconic acid				X							
- Lysine		X	X		X		X		X	X	X
- Sorbitol	X	X		X	X	X	X			X	X

หมายเหตุ X = มีการผลิตสารชนิดนั้น ๆ

จากตารางจะเห็นได้ว่าราในกลุ่ม *Xylaria* จะผลิต building block ที่ใช้ทำเป็นสารตั้งต้นสำหรับทำพลาสติกชีวภาพได้แตกต่างกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Xylaria* sp. BCC 1067 ที่มีการผลิต building block ที่เป็น primary metabolite ในกลุ่มของ C3-C6 ครบเกือบทุกชนิด ดังนั้นราในกลุ่ม *Xylaria* จึงเป็นราที่มีศักยภาพสูงที่จะนำมาเพาะเลี้ยงเพื่ออุตสาหกรรมการผลิตพลาสติกชีวภาพ

สรุปผลการวิจัย

1. ราในกลุ่ม *Xylaria* จะมีความสามารถในการผลิตสาร secondary metabolite ในกลุ่มของ polyketide และ non-ribosomal peptide ที่แตกต่างกันไป โดยจะมีการผลิตมากในอาหาร Yeast Extract Sucrose (YES) ซึ่งสารประกอบในกลุ่ม polyketide และ non-ribosomal peptide นี้จะมีความหลากหลายด้านโครงสร้างและสารบางชนิดสามารถที่จะนำมาพัฒนาต่อยอดเป็นพลาสติกชีวภาพชนิดใหม่ได้
2. ผลการศึกษา phylogenetic tree ที่สร้างจากชนิดของสารเคมีที่ผลิตและที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ Internal Transcribed Spacer (ITS) พบว่ามีความสัมพันธ์กัน ดังนั้นจึงใช้ phylogenetic tree ที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์มาใช้ในการทำนายการผลิตสารประกอบในกลุ่ม secondary metabolite ของรา *Xylaria* ที่มีสายพันธุ์ใกล้เคียงกันได้
3. ราในกลุ่ม *Xylaria* เป็นราที่มีศักยภาพในการผลิตสารในกลุ่ม primary metabolite ที่มีคาร์บอน 3-6 ตัวได้หลากหลายชนิด ซึ่งสารในกลุ่มนี้สามารถที่จะนำมาใช้เป็น building block สำหรับการผลิตวัสดุชีวภาพได้

บรรณานุกรม

อนุวัฒน์ เตชะฤทธิ และคณะ (2005) "ศึกษาคุณสมบัติและการแยกยีนที่เกี่ยวข้องกับวิถีการสังเคราะห์สาร polyketide จากรา *Xylaria* sp.BCC1067" รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

Abates D, Abraham WR, Mayer H. 1997. Cytochalasins and phytotoxins from the fungus *Xylaria* ovovata. *Phytochemistry* 44(8): 1446-1448.

Adeboya M, Edwards RL, Laessoe T, Maitland DJ. 1995. Metabolites of the higher fungi. Part 27. Berteric acid, cameronic acid, and malysic acid, three new polysubstituted fatty acids related to cubensic acid from species of the fungus genus *Xylaria*. *J. Chem. Res.* 9: 356-357.

Adeboya M, Edwards RL, Laessoe T, Maitland DJ, Shields DJ, Whalley AJS. 1996. Metabolites of higher fungi. Part 29. Maldotoxin, maldoxone, dihydroxymaldoxin, isodihydroxymaldoxin, and dechloroisodihydroxymaldoxin. A siprocyclohexadienone, a depsidone and there diphehyl ethers: Keys I the depsidone biosynthesis pathway from the member of the fungus genus *Xylaria*. *J. Chem. Soc., Perkins Trans.* 1(12): 1419-1425.

Allman ES, Rhodes JA. 2004. *Mathematical models in Biology: An introduction*. New York: Cambridge University Press.

Amnuaykanjanasin, A. and et. al., (2005) "Diversity of type I polyketide synthase genes in the wood-decay fungus *Xylaria* sp.BCC1067", *FEMS Microbio. Lett.*, 251: 125 – 136.

Carreras, C.W. and Ashley, G.W., (2000) "Manipulation of polyketide biosynthesis for new drug discovery", pp.89 – 108, *New Approaches to Drug Development*, ISBN:3-7643-6129-8, Berlin.

Chesters NC, O' Hogen D. 1997. Biosynthesis of fungal metabolite, piliformic acid (2-hexylidene-3-methylsuccinic acid). *J. Chem. Soc., Perkins Trans* 1(6): 827-834.

Deacon J. 2005. Fungal Biology. Blackwell Publishing, England.

Deonier RC, Tavaré S, Waterman MS. 2005. Computational genome analysis: An introduction. New York: Springer Science Business Media Inc.

Edwards R, Maitland DJ, Oliver CL, Pacey MS, Shields DJ, Whalley AJS. 1999. Metabolites of the higher fungi. Part 31. Longianone, a C₇H₆O₄ spiro bicyclic lactone from the fungus *Xylaria longiana* (Rehm.). J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1(6): 715-720.

Edwards R, Maitland DJ, Pittayakhajonwut P, Whalley AJS. 2001. Metabolites of the higher fungi. Part 33. Grammicin, a novel bicyclic C₇H₆O₄ furanopyranol from the fungus *Xylaria grammica* (Mont.) Fr., J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1(11): 1296-1299.

Espada A, Rivera SA, Hueso-Rodríguez JA, Elson SW. 1997. New Cytochalasins from the fungus *Xylaria hypoxylon*. Tetrahedron 53: 6485-6492.

Fry BG, Vidal N, Norman JA, Vonk FJ, Scheib H, Ramjan SF. 2006. Early evolution of the venom system in lizards and snakes. Nature 439: 584-588.

Gunawan S, Steglich W. 1990. Xylaral, a hydroxyphthalide derivative from fruiting bodies of *Xylaria polymorpha* (Ascomycetes). Liebigs Annalen der Chemie 8: 825-827.

Isaka M, Juturapat A, Kladwang W, Punya J, Lerwerawat Y, Tanticharoen M, Thebtaranonth Y. 2000. Antiplasmodial compounds from the wood-decayed fungus *Xylaria* sp. BCC1067. Planta Med. 66(5):473-475.

Isaka M, Yangchum A, Auncharoen P, Srichomthong K, Srikitikulchai P. 2011. Ring B aromatic norpimarane glucosides from a *Xylaria* sp. J. Nat. Prod. 74: 300-302.

ITC-Academic Computing Health Science. 1998. Phylip: Phylogenetic analysis workshop. Virginia, University of Virginia.

Jiang P, Faase JAJ, Toyada H, Paul A, Wimmer E, Gorbalenya AE. 2007. Evidence for emergence of diverse polioviruses from C-cluster coxsackie A viruses and implication for

global poliovirus eradication. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104: 9457-9462.

Joshi B, Lee K, Maeder DL, Jagus R. 2005. Phylogenetic analysis of eIF4E-family members. BMC Evolutionary Biology 5: 48.

Krane DE, Raymer ML. 2003. Fundamental concepts of bioinformatics. San Francisco: Benjamin Cummings.

Lin Y, Wu X, Feng S, Jiang G, Luo J, Zhou S. Vrijmoed LLP, Jones EBG, Krohn K, Steingröver K, Zsila F. 2001. Five unique compounds: Xyloketal from mangrove fungus *Xylaria* sp. from the south China sea coast. Organic Chemistry 66: 6252-6256.

Lockhart PJ, Steel MA, Hendy MD, Penny D. 1994. Recovering evolutionary trees under a more realistic model of sequence evolution. Molecular Biology and Evolution 11: 605-612.

Madisch I, Hofmayer S, Moritz C, Grintzalis A, Hainmueller J, Pring-Akerblom P. 2007. Phylogenetic analysis and structural predictions of human adenovirus penton proteins as a basis for tissue specific adenovirus vector design. J. Virology 81: 8270-8281.

Mau B, Newton MA, Larget B. 1999. Bayesian phylogenetic inference via Markov chain Monte Carlo methods. Biometrics 55: 1-12.

Phonghanpot S, Punya J, Tachaleat A, Laoteng K, Bhavakul V, Tanticharoen M, Cheevadhanarak S. 2012. Biosynthesis of Xyrrolin, A New Cytotoxic hHbrid Polyketide/Non-Ribosomal Peptide Pyrroline with Anticancer Potential, in *Xylaria* sp. BCC 1067, ChemBioChem. 13: 895-903.

Purcell S. 2007. BGIM: Maximum likelihood estimation primer. Retrieved July 16, 2007, from http://statgen.iop.kcl.ac.uk/bgim/mle/sslike_1.html

Rukachaisirikul V, Khamthong N, Sukpondma Y, Pakawatchai C, Phongpaichit S, Sakayaroj J, Kirtikara K. 2009. An [11] Cytochalasin derivative from the marine-derived fungus *Xylaria* sp. PSU-F100. Chem. Pharm. Bull. 57(12): 1409-1411.

Salvatore M, Hensens OD, Zink DL, Liesch J, Dufresne C, Ondeyka JG, Jurgens TM, Borris RP, Raghoobar S, McCauley E. 1994. L-741, 494, a fungal metabolites that is an inhibitor of interleukin-1 beta converting enzyme. J. Nat Prod. 57: 755-760.

Schneier G, Anke H, Aterner O. 1995. Xylarin, an antifungal *Xylaria* metabolite with an unusual tricyclic uronic and moiety. Nat. Prod. Lett. 7(4): 309-316.

Schneier G, Anke H, Aterner O. 1996. Xylaramide, an antifungal compound, and other metabolites from *Xylaria longipe*. Z. Naturforsch. 51(11-12): 802-806.

Smith WL, Wheeler WC. 2006. Venom evolution widespread in fishes: A phylogenetic road map for the bioprospecting of piscine venoms. J. Heredity 97: 206-217.

Tansuwan S, Chanaprat P, Teerawatananond T, Muangsin N, Pornpakakul S. 2010. (4S, 5S, 6S)-4-Hydroxy-3-methoxy-5-methyl-5,6-epoxycyclohex-2-en-1-one. Acta Cryst. E66: o2263.

Tuimala J. 2006. A primer to phylogenetic analysis using the PHYLIP package. Espoo: CSC-Scientific Computing Ltd.

Turner SM, Chaudhuri RR, Jiang ZD, DuPont H, Gyles C, Penn CW. 2006. Phylogenetic comparisons reveal multiple acquisitions of the toxin genes by enterotoxigenic *Escherichia coli* strains of different evolutionary lineages. J. Clinical Microbiol. 44: 4528-4536.

Walley A, Edwards RL. 1996. The Xylariaceae: way of life. Mycol. Res. 100(8): 897-922.

Wu W, Dai H, Bao L, Ren B, Lu J, Luo Y, Guo L, Zhang L, Liu H. 2011. Isolation and structural elucidation of praline-containing cyclopentapeptides from an endolichenic *Xylaria* sp. J. Nat. Prod. 74: 1303-1308.

Yadav G, Gokhale RS, Mohanty D. 2009. Towards prediction of metabolic products of polyketide synthases: An *In Silico* Analysis. Computational Biology 5(4): 1-14.