รายงานฉบับสมบูรณ์ (ปีที่ 1)

เก็บรวบรวมเชื้อราในดินและเศษซากพืชในบริเวณพื้นที่ปกปักพันธุกรรมพืชเขื่อนรัชชประภา จ.สุราษฎร์ธานี เพื่อใช้ในการเกษตร

Collection of Soil and Plant Debris Fungi in Plant Protected Area at Ratchaprapa Dam, Suratthani Province for Agricultural Uses.

โดย

เสมอใจ ชื่นจิตต์

วสันณ์ เพชรรัตน์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

บทคัดย่อ

ได้ทำการศึกษาความหลากหลายของเชื้อราในดินและเศษซากใบในบริเวณพื้นที่ปกปักพันธุกรรมพืชเขื่อนรัชชประภา จ.สุราษฎร์ธานี เก็บตัวอย่างดินและเศษซากใบ 4 ครั้งในเดือนมกราคม เมษายน มิถุนายน และสิงหาคม 2553 แยกเชื้อราจากตัวอย่างดินจำนวน 80 ตัวอย่าง ในห้องปฏิบัติการด้วยวิธี Dilution pour plate และวิธี baiting พบเชื้อราจำนวน 19 ชนิด ใน 4 สกุล ได้แก่ *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. *Trichoderma* spp. และ *Chaetomium* sp. สำหรับตัวอย่างเศษซากใบที่กำลังย่อยสลายระยะกลางจำนวน 80 ตัวอย่าง ทำการแยกเชื้อราในห้องปฏิบัติการด้วยวิธี Dilution pour plate และด้วยวิธี Direct isolation หลังการบ่มเชื้อในกล่องให้ความชื้น พบเชื้อราจำนวน 227 ไอโซเลท จัดจำแนกได้ 106 สกุล เชื้อราที่เป็นสายพันธุ์เด่น ได้แก่ *Acremonium butyric*, *Acremonium murorum*, *Aspergillus* spp., *Beltrania mangifera*, *Beltrania rhombica*, *Botryodiplodia* spp., *Circinotrichum maculiforme*, *Cladosporium tenuissimum*, *Cladosporium uredinicola*, *Colletotrichum* spp., *Corynespora* spp., *Curvularia lunata*, *Fusarium acuminatum*, *Harplographium* spp., และ *Nigrospora* spp. เป็นต้น

ABSTRACT

The diversity of fungi associated in soil and leaf litter were investigated in plant protected area of Rajjaprapa Dam, Surat Thari province. Samples of soil and leaf litter were collected four times during January, April, June and September 2010. Eighty soil samples were isolated for fungi by dilution pour plate and baiting technique. Fungal identification yielded 19 species which belong to 4 genera of *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Trichoderma* spp. and *Chaetomium* spp. In the case of fungi on leaf litter, eighty samples of mixed decomposing fallen leaves were isolated for fungi by dilution pour plate and direct observation after incubated in moisten plates. Two hundred and twenty- seven isolates were identified, comprising One hundred and six species. The dominant species were *Acremonium butyric*, *Acremonium murorum*, *Aspergillus* spp., *Beltrania mangifera*, *Beltrania rhombica*, *Botryodiplodia* spp., *Circinotrichum maculiforme*, *Cladosporium tenuissimum*, *Cladosporium uredinicola*, *Colletotrichum* spp., *Corynespora* spp., *Curvularia lunata*, *Fusarium acuminatum*, *Harplographium* spp. and *Nigrospora* spp.

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯสยามบรมราชกุมารี(อพ.สธ.)ในพื้นที่ปกปักพันธุกรรมพืชเขื่อนรัชชประภา การไฟฟ้าฝ่ายผลิตแห่งประเทศไทย ขอขอบคุณสำนักงานพัฒนาและวิจัย และภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

คณะผู้วิจัย

27 ตุลาคม 2553

สารบัญ

สารบัญ	หน้า
บทคัดย่อ	ก
Abstract	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
รายการตาราง	จ
รายการภาพ	ฉ
บทนำ	1
วัตถุประสงค์	3
วิธีการดำเนินงานวิจัย	4
ผลการวิจัย	6
สรุปผลการวิจัย	42

รายการตาราง

ตารางที่ หน้า

1. ชนิดและเปอร์เซ็นต์ความถี่ของเชื้อราที่ตรวจพบจากตัวอย่างดินในพื้นที่ปกปักพันธุกรรมพืชเขื่อนรัชชประภา ในอาหาร GANA และ TSM ระหว่างเดือน มกราคม ถึงสิงหาคม 2553ด้วยวิธี Dilution pour plate…….…… 7

2. ชนิดและเปอร์เซ็นต์ความถี่เชื้อราที่ตรวจพบจากดินในพื้นที่ปกปักพันธุกรรมพืชเขื่อนรัชชประภาระหว่างเดือน มกราคม ถึงสิงหาคม 2553 ด้วยวิธี Baiting…… 10

3. ชนิดและเปอร์เซ็นต์ความถี่ของเชื้อราที่ตรวจพบบนเศษซากใบในพื้นที่ปกปักพันธุกรรมพืชเขื่อนรัชชประภาในอาหาร GANA ระหว่างเดือน มกราคม ถึงสิงหาคม 2553 ด้วยวิธี Dilution pour plate……. 11

4. ชนิดและเปอร์เซ็นต์ความถี่ของเชื้อราที่ตรวจพบบนเศษซากใบในพื้นที่ปกปักษ์พันธุกรรมพืชเขื่อนรัชชประภา ระหว่างเดือน มกราคม ถึงสิงหาคม 2553 ด้วยวิธี Direct isolation …… 13

รายการภาพ

ภาพที่ หน้า

1. การศึกษาเชื้อราในตัวอย่างดิน 8
2. เพอริทีเชียมและสปอร์ของเชื้อรา *Chaetomium malaysiense* 9
3. เพอริทีเชียมและสปอร์ของเชื้อรา *Chaetomium fusiforme* 9
4. การศึกษาเชื้อราบนเศษซากพืช 12
5. *Acremonium cerealis* 22
6. *Acremonium luzulae* 22
7. *Acremonium* sp. 22
8. *Acrodictys* sp.1 23
9. *Acrodictys* sp.2 23
10. *Acrodictys* sp.3 23
11. *Aspesgillus* sp. 24
12. *Beltraniopsis esenbeckiae* 24
13. *Beltrania mangifera* 24
14. *Beltrania rhombic* 25
15. *Beltraniella odinae* 25
16. *Beltraniella* sp. 25
17. *Circinotrichum maculiforme* 26
18. *Cladosporium cucumerinum* 26
19. *Cladosporium* sp. 26
20. *Codinaea assamica* 27
21. *Codinaea britannica* 27
22. *Codinaea fertilis* 27
23. *Codinaea hughesii* 28
24. *Colletotrichum* sp.1 28
25. *Colletotrichum* sp.2 28
26. *Colletotrichum* sp.3 29
27. *Curvularia* sp.1 29
28. *Curvularia* sp.2 29
29. *Dactylaria hyalina* 30

รายการภาพ

ภาพที่ หน้า

30. *Dactylaria junci* 30
31. *Didymosphaeria oblitescens* 30
32. *Ellisopsis gallesiae* 31
33. *Fusarium acuminatum* 31
34. *Gyrothrix circinata* 31
35. *Harphographium* sp.1 32
36. *Harphographium* sp.2 32
37. *Henicospora coronata* 32
38. *Humicola fuscoatra* 33
39. *Menispora* sp. 33
40. *Monacrosporium* sp. 33
41. *Monacrosporium* sp. 34
42. *Mirandina corticola* 34
43. *Nigrospora sphaerica* 34
44. *Penicillium* sp. 35
45. *Periconia* sp. 35
46. *Pestalotiopsis disseminata* 35
47. *Pestalotiopsis sydowiana* 36
48. *Polyscytalum fecundissimum* 36
49. *Pseudobeltrania cedrelae* 36
50. *Pseudobeltrania penzigii* 37
51. *Rhinocladiella* sp. 37
52. *Septonema secedens* 37
53. *Scolecobasidiell avellnea* 38
54. *Sporidesmium harknesii* 38
55. *Sporoschismopsis* sp. 38
56. *Sporidesmium flagellatum* 39
57. *Torula graminis* 39
58. *Tripospermum myrti* 39

รายการภาพ

ภาพที่ หน้า

59. *Tripospermum* sp. 40
60. *Triscelophorus acuminatus* 40
61. *Wiesneriomyces javanicus* 40
62. *Zygosporium echinosporum* 41
63. *Zygosporium gibbum* 41
64. *Zygosporium masonii* 41

บทนำ

ป่าไม้เป็นแหล่งทรัพยากรชีวภาพที่สำคัญแห่งหนึ่งของโลก โดยเฉพาะป่าในเขตร้อน ส่วนใหญ่ประชาชนมีการศึกษาทรัพยากรชีวภาพที่มีขนาดใหญ่ เช่น ไม้ยืนต้น สมุนไพร สัตว์ป่า แมลง และอื่น ๆ ในขณะที่จุลินทรีย์ซึ่งมีขนาดเล็ก ไม่เป็นที่รู้จักนักทั้ง ๆ ที่เป็นตัวที่ช่วยในการหมุนเวียนแร่ธาตุ อาหาร โดยย่อยสลายซากพืช และอินทรียวัตถุต่าง ๆ เช่น กิ่งไม้ ใบไม้ ตลอดจนส่วนของพืชที่ตายแล้ว และในบรรดาสิ่งมีชีวิตที่ทำหน้าที่ย่อยสลายอินทรียสาร เชื้อราเป็นจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญอย่างมากในการย่อยสลาย โดยเฉพาะองค์ประกอบของพืชที่มีโครงสร้างซับซ้อนและย่อยสลายยาก เช่น เซลลูโลส แป้ง และลิกนิน ทั้งนี้เพราะเชื้อรามีลักษณะหลายประการที่เหมาะสมต่อการย่อยสลาย มีความหลากหลายของสายพันธุ์ และสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดีเจริญอยู่ในบริเวณนั้น ๆ

ในปัจจุบันความหลากหลายทางพันธุกรรมของจุลินทรีย์หรือสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ได้ถูกทำลายลงเนื่องจากมนุษย์ ระบบการพัฒนาการทางการเกษตรมีส่วนสำคัญต่อการดำรงชีพของจุลินทรีย์ให้อยู่รอด เช่น ระบบการเกษตรเชิงเดี่ยว การเผาทำลายป่า และการใช้สารเคมีในการเกษตร สาเหตุเหล่านี้ทำให้เกิดการสูญพันธุ์ของจุลินทรีย์โดยรู้เท่าไม่ถึงการณ์ อีกทั้งสภาพปัจจัยทางนิเวศวิทยา เช่น อุณหภูมิ ความชื้น ภูมิประเทศ ดิน และน้ำ ที่เปลี่ยนแปลงไป ทำให้สิ่งมีชีวิตไม่สามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมเหล่านี้ได้ โดยเฉพาะระบบการทำเกษตรที่เปลี่ยนแปลง ทำให้ระบบนิเวศที่เดิมเคยมีความหลากหลายมากกลับลดลงหรือสูญหาย และถูกทดแทนด้วยระบบนิเวศที่มีความหลากหลายต่ำ จุลินทรีย์บางชนิดจึงสูญพันธุ์ไป ประเด็นสำคัญของการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพ คือ ความหลากหลายทางชีวภาพเป็นคุณสมบัติของระบบที่ทำให้ระบบนั้น สามารถดำรงได้ภายใต้สภาพสิ่งแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงอยู่เสมอ ระบบนิเวศใดก็ตามที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง ระบบนิเวศนั้นย่อมมีความมั่นคงทางนิเวศสูง ในทางตรงกันข้าม ระบบนิเวศที่มีความหลากหลายทางชีวภาพต่ำระบบนิเวศนั้นก็จะมีความมั่นคงทางนิเวศต่ำ (Kump *et al*., 1999) ระบบนิเวศป่าเป็นในเขตร้อนเป็นระบบที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูงมีความสลับซับซ้อนมากที่สุดของสังคมสิ่งมีชีวิตในโลก ดังนั้นระบบนิเวศป่าเขตร้อนจึงมีความมั่นคงทางนิเวศสูงสุด จัดได้ว่าเป็นรากฐานของความมั่นคงทางนิเวศของโลก

เชื้อรามีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายเศษซากพืชให้เป็นดินที่อุดมสมบูรณ์เหมาะแก่การเพาะปลูกพืช เชื้อราที่ย่อยสลายไม้ในป่า มีบทบาทสำคัญในวัฏจักรของคาร์บอนและไนโตรเจนซึ่งช่วยให้ซากอินทรียวัตถุย่อยสลายกลับคืนสู่ดินตามธรรมชาติ ดังนั้นการศึกษาชนิดและความหลากหลายของเชื้อราบนซากใบพืชที่ร่วงหล่น ทำให้ทราบถึงชนิดและปริมาณของเชื้อรา มีรายงาน

ว่าราที่เจริญบนซากพืชบางชนิดสร้างเอนไซม์ และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิด เชื้อราหลายชนิดที่แยกได้อาจจะนำมาใช้ประโยชน์ทางการเกษตร การแพทย์ และอุตสาหกรรม (Rukachaisirikul *et al*., 2005) และศึกษาการเป็นปฏิปักษ์ของราจากซากพืชกับราสาเหตุโรคพืชบนอาหารวุ้น PDA ในห้องปฏิบัติการ เพื่อเป็นแนวทางในการนำไปพัฒนาใช้ควบคุมโรคพืชที่เกิดจากเชื้อราทางชีววิธี

เชื้อราเป็นองค์ประกอบที่มีชีวิตในระบบนิเวศที่มีความสำคัญอย่างมากในการย่อยสลายซากพืชซากสัตว์ อีกทั้งเส้นใยของรายังสามารถแทงเข้าไปข้างในของวัตถุได้ เป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัส ทำให้การย่อยสลายมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น โดยสิ่งที่ได้จากการย่อยสลายคือ คาร์บอนไดออกไซด์ กรดอินทรีย์ แร่ธาตุต่างๆเช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ซัลเฟอร์ และ ฮิวมัส ซึ่งเป็นการปลดปล่อยธาตุอาหาร และองค์ประกอบทางเคมีกลับคืนสู่ดินทำให้ดินอุดมสมบูรณ์และพืชนำกลับมาใช้ประโยชน์ได้อีกต่อไป (คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา, 2541) นอกจากนี้การยืดยาวของเส้นใยและการแตกกิ่งก้านสาขาเป็นกลไกที่ทำ ให้เกิดแรงดันทำให้เซลล์ของซากพืชแยกออกจากกันง่ายขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียซึ่งเจริญอยู่ที่ผิวสัมผัสเท่านั้น นอกจากนี้แล้วราเมือกที่มีสมบัติค่อนข้างเหนียวจะเป็นตัวเชื่อมยึดเม็ดดินให้จับตัวกันเป็นก้อนอย่างถาวร(aggregate) และเส้นใยของเชื้อราจะแผ่กระจายปกคลุมที่ผิวดินทำ ให้ดินมีความพรุนสามารถดูดซับน้ำได้มากขึ้น แล้วค่อยๆ ปล่อยลงสู่ลำธาร เป็นการยืดระยะเวลาการไหลของน้ำในลำธาร และทำให้เกิดน้ำไหลบ่าหน้าดินรวมทั้งการกัดชะหน้าดิน โดยน้ำฝนมีน้อยลง ส่งผลให้กระบวนการหมุนเวียนของน้ำและธาตุอาหารพืชมีประสิทธิภาพมากขึ้น ตามหลักของการจัดการลุ่มน้ำ จึงเห็นได้ว่าเชื้อราเป็นอีกหนึ่งจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญในระบบนิเวศ จึงได้ทำการศึกษาถึงความหลากหลายของเชื้อราในบริเวณพื้นที่ปกปักพันธุกรรมพืชเขื่อนรัชชประภา จ. สุราษฎร์ธานี เพื่อเป็นข้อมูลเพื่อใช้ประโยชน์ต่อไป นอกจากนั้นเชื้อราบางสายพันธุ์ยังมีความสามารถในการเป็นปฏิปักษ์ ต่อจุลินทรีย์ที่สามารถก่อโรคพืช ซึ่งจากการสังเกตพบว่าพืชเศรษฐกิจ เช่น ทุเรียนที่ปลูกในป่า มักไม่พบโรครากเน่าโคนเน่าในขณะที่ปลูกในแปลงเกษตรกรพบโรคค่อนข้างสูง สาเหตุประการหนึ่งอาจเนื่องจากว่า ในป่านั้นมีจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ ที่สามารถยับยั้งหรือลดปริมาณของเชื้อก่อโรคได้

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อสนองพระราชดำริโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดา ฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.) ในพื้นที่ปกปักพันธุกรรมพืชเขื่อนรัชชประภา การไฟฟ้าฝ่ายผลิตแห่งประเทศไทย
2. เพื่อทราบชนิดและความหลากหลายของเชื้อราที่ขึ้นอยู่ในดินและซากพืชต่าง ๆ ภายในพื้นที่ปกปักพันธุกรรมพืชเขื่อนรัชชประภา จ. สุราษฎร์ธานี
3. เพื่อหาสายพันธุ์ราที่มีคุณสมบัติสร้างสารยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชบางชนิด
4. เพื่อแยกเชื้อราที่พบให้บริสุทธิ์ เก็บไว้ใช้ประโยชน์ทางการเกษตรอื่น ๆ ต่อไป

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. ศึกษาเชื้อราที่อาศัยในดิน

1.1 เก็บตัวอย่าง การแยกเชื้อ และการศึกษาชนิดเชื้อราจากดิน

1.1.1 การเก็บตัวอย่างดิน ทำการกวาดบริเวณหน้าดินจากนั้นใช้พลั่วมือขุดลึกลงไปประมาณ 5-10 เซนติเมตร โดย 1 จุดขุด 5 ตำแหน่งนำมาผสมรวมกันในถุงเดียวกันให้ได้น้ำหนักประมาณ 500 กรัม ทำการเก็บตัวอย่างดิน เส้นทางละ 4 จุด จำนวน 5 เส้นทาง รวมตัวอย่างดินครั้งละ 20 ตัวอย่าง จำนวน 4 ครั้งเช่นเดียวกับตัวอย่างในเศษซากพืช

1.1.2 การศึกษาเชื้อราในตัวอย่างดิน

: การศึกษาเชื้อราในตัวอย่างดินด้วยวิธี Dilution pour plate

นำดินจำนวน 10 กรัม ผสมน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่อง เขย่าที่ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ทำการเจือจางที่ระดับความเข้มข้น 10^{-2}-10^{-5} หยดดินแขวนลอยปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในจานเลี้ยงเชื้อ แล้วจึงเทอาหาร glucose ammonium nitrate agar (GANA) และ Trichoderma selective medium (TSM) ที่ผสม streptomycin sulphate 500 mg/l ซึ่งอุ่นที่อุณหภูมิ 53-55 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3-7 วันนับจำนวนโคโลนีที่ปรากฏในจานเชื้อในแต่ละความเข้มข้น เลือกศึกษาเฉพาะที่ความเข้มข้นที่ทำให้มีจำนวนโคโลนีในแต่ละจานเลี้ยงเชื้ออยู่ระหว่าง 20 - 30 โคโลนี ใช้เข็มเขี่ยย้ายทุกโคโลนีลงในอาหาร PDA slant เพื่อเก็บเชื้อที่บริสุทธิ์ไว้จำแนกต่อไป พร้อมวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ความถี่ในการพบเชื้อราในตัวอย่างดินแต่ละตัวอย่างโดยคำนวณจากสูตร ดังนี้

$$\text{ความถี่ของเชื้อที่พบ (\%)} = \frac{\text{จำนวนจานเลี้ยงเชื้อที่พบเชื้อรา}}{\text{จำนวนจานเลี้ยงเชื้อทั้งหมดของแต่ละตัวอย่าง}} \times 100$$

: การศึกษาเชื้อราในตัวอย่างดินด้วยวิธี Baiting

วิธีนี้เป็นวิธีที่เหมาะสมในการแยกเชื้อรา *Chaetomium* spp. ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่สำคัญชนิดหนึ่งในการควบคุมจุลินทรีย์ก่อโรคพืช ทำการศึกษาโดยตักตัวอย่างดินใส่ในจานเลี้ยงเชื้อจานละ 10 กรัม จำนวน 5 จานเลี้ยงเชื้อต่อ 1 ตัวอย่าง ใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว พรมในดินเพื่อให้ความชื้น จากนั้นนำกระดาษกรองที่ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ที่นึ่งฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้ว วางบนดินจำนวน 10 ชิ้น ทิ้งไว้เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ตรวจผล โดยดูการสร้าง perithecium บนกระดาษกรองภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ Stereo ใช้เข็มเขี่ย เขี่ยเชื้อราที่เจริญบนกระดาษกรอง นำมาเลี้ยงบนอาหาร PDA เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ และเก็บเชื้อราไว้ใน PDA slant เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป พร้อมวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ความถี่ในการพบเชื้อราในตัวอย่างดินเช่นเดียวกับวิธี Dilution pour plate

2. **ศึกษาเชื้อราที่อาศัยบนเศษซากใบ**

2.1 การเก็บตัวอย่าง การแยกเชื้อ และศึกษาชนิดเชื้อราจากเศษซากใบ

2.1.1 ทำการเก็บตัวอย่างใบไม้ที่ร่วงหล่นใน พื้นที่ปกปักพันธุกรรมพืชเขื่อนรัชชประภา จ. สุราษฎร์ธานี ตามลักษณะการย่อยสลาย คือ ใบเก่าปานกลาง ตั้งแต่เดือน มกราคม เมษายน มิถุนายน สิงหาคม 2553 รวม 4 ครั้ง โดยแบ่งพื้นที่เป็น 5 เส้นทางกำหนดเก็บตัวอย่าง 4 จุด ต่อเส้นทาง สุ่มเก็บเส้นทางละ 200 กรัม นำตัวอย่างเศษซากใบที่ได้ไปแยกเชื้อที่ห้องปฏิบัติการ

2.1.2 การศึกษาเชื้อราบนเศษซากใบ

: การศึกษาเชื้อราบนเศษซากใบด้วยวิธี Dilution pour plate

นำตัวอย่างใบไม้ทั้ง 4 จุดใน 1 เส้นทางมาผสมรวมกัน ชั่งให้ได้ 10 กรัม ผสมกับน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปั่นด้วยเครื่องปั่น(blender) นาน 20 นาที ทำการเจือจางที่ระดับความเข้มข้น 10^{-2}-10^{-5} หยดสารแขวนลอยที่ได้ 1 มิลลิลิตรลงในจานเลี้ยงเชื้อ แล้วจึงเทอาหาร glucose ammonium nitrate agar (GANA) ที่ผสม streptomycin sulphate 500 mg/l อุ่นที่อุณหภูมิ 53-55 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3-7 วัน นับจำนวนโคโลนีที่ปรากฏในจานเลี้ยงเชื้อ ในแต่ละความเข้มข้น เลือกศึกษาเฉพาะที่ความเข้มข้นที่ทำให้มีจำนวนโคโลนีในแต่ละจานอยู่ระหว่าง 20-30 โคโลนี ใช้เข็มเขี่ยย้ายทุกโคโลนีลงในอาหาร PDA slant เพื่อเก็บเชื้อที่บริสุทธิ์ไว้จำแนกชนิดต่อไป พร้อมวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ความถี่ในการพบเชื้อราบนเศษซากใบเช่นเดียวกับในตัวอย่างดิน

: การศึกษาเชื้อราบนเศษซากใบด้วยวิธี Direct isolation

โดยนำเศษซากใบที่เก็บมาทุกจุดใน 5 เส้นทาง จำนวนทั้งหมด 20 ตัวอย่าง ตามลักษณะการย่อยสลาย คือ ใบเก่าปานกลาง มาตัดให้ได้ตัวอย่างละ 4 ชิ้น ใส่ในจานเลี้ยงเชื้อรองด้วยกระดาษทิชชูแบบหนา 3-4 ชิ้นและกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 แล้วพรมด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อเพื่อให้ความชื้นรอบจานเลี้ยงเชื้อ วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 25-32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-7 วัน ตรวจเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ Stereo และ Compound เมื่อพบ fruiting body หรือ ascostroma ของเชื้อราจึงใช้เข็มเขี่ยเขี่ยนำมาทำสไลด์กึ่งถาวรใน lactophenol บันทึกภาพ นำเชื้อราที่พบไปแยกให้ได้เป็นเชื้อบริสุทธิ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยวิธี hyphal tip isolation เก็บเส้นใยเชื้อราใน PDA slant เพื่อจัดจำแนกต่อไป โดยอาศัยหนังสือ key ต่างๆ พร้อมวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ความถี่ในการพบเชื้อราบนเศษซากใบเช่นเดียวกับในตัวอย่างดิน

ผลการทดลอง

1. **การศึกษาเชื้อราในตัวอย่างดิน**

1.1 การศึกษาเชื้อราในตัวอย่างดินด้วยวิธี Dilution pour plate

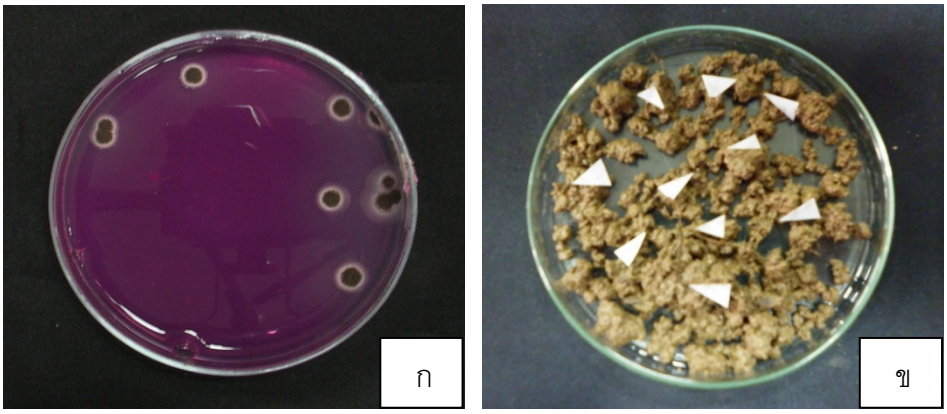
จากการศึกษาเชื้อราในตัวอย่างดินด้วยวิธี Dilution pour plate ดังแสดงในภาพ 1ก. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ GANA และ TSM ที่ผสม streptomycin sulphate ความเข้มข้น 500 mg/l ทั้ง 2 ชนิด พบเชื้อรา 3 สกุล (genus) คือ *Aspergillus* spp. จำนวน 8 ชนิด (species) *Penicillium* spp. จำนวน 4 ชนิดและ *Trichoderma* spp. จำนวน 3 ชนิด โดยทั่วไปเชื้อที่ได้จากการเลี้ยงด้วยวิธีนี้ ส่วนใหญ่เป็นเชื้อราที่เจริญมาจากสปอร์ที่มีการฟุ้งกระจายจึงมีปริมาณมาก ประกอบกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหมาะต่อการเจริญของเชื้อรานั้นๆ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ชนิดและเปอร์เซ็นต์ความถี่ของเชื้อราที่ตรวจพบจากตัวอย่างดินในพื้นที่ปกปักพันธุกรรมพืชเขื่อนรัชชประภา ในอาหาร GANA และ TSM ระหว่างเดือน มกราคม ถึงสิงหาคม 2553 ด้วยวิธี Dilution pour plate

ชนิดเชื้อรา	เปอร์เซ็นต์ความถี่ที่พบเชื้อราในแต่ละเดือน							
	มกราคม		เมษายน		มิถุนายน		สิงหาคม	
	GANA	TSM	GANA	TSM	GANA	TSM	GANA	TSM
Aspergillus flavus	-	36.67	66.67	85.00	15	41.67	-	-
Aspergillus fumigatus	25.00	-	-	-	-	-	-	-
Aspergillus japonicum	3.33	-	35.00	-	50.83	-	11.67	-
Aspergillus niger	33.33	1.67	61.67	20.00	30	3.33	30	21.67
Aspergillus sp. 1	20.00	21.67	33.33	20.00	10	3.33	28.33	15
Aspergillus sp. 2	-	-	11.67	3.33	1.67	-	-	30
Aspergillus sp. 3	-	-	23.33	8.33	-	-	28	-
Aspergillus sp. 4	-	-	-	-	1.67	-	-	-
Penicillium sp. 1	55.00	36.67	-	76.67	33.33	46.67	18.33	15
Penicillium sp. 2	-	-	76.67	23.33	36.67	15.00	8.33	11.67
Penicillium sp. 3	-	-	28.33	1.67	-	-	13.33	18.33
Penicillium sp. 4	-	-	13.33	3.33	-	-	-	-
Trichoderma sp.1	30.00	10.00	36.67	28.33	53.33	33.33	21.67	13.33
Trichoderma sp.2	-	-	-	-	33.33	20.00	26.67	16.67
Trichoderma sp.3	-	-	-	-	11.67	15.00	3.33	-
Unknown 1	11.67	-	-	-	-	-	-	-
Unknown 2	31.67	-	-	-	-	-	-	-
Unknown 3	1.67	-	-	-	-	-	-	-

2.2 การศึกษาเชื้อราในตัวอย่างดินด้วยวิธี Baiting

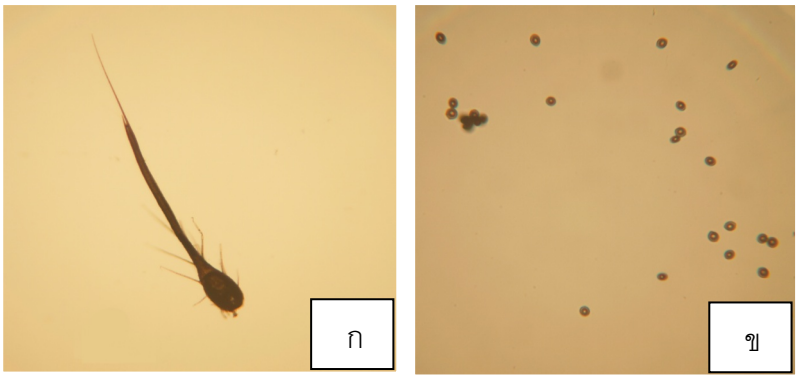
จากการศึกษาเชื้อราในตัวอย่างดินด้วยวิธี Baiting (ดังแสดงในภาพที่ ข.) ซึ่งเป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุดในการศึกษาหรือแยกเชื้อราในสกุล *Chaetomium* spp. ซึ่งเป็นอีกหนึ่งจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีบทบาทในการควบคุมจุลินทรีย์ก่อโรคพืชหลายชนิด ผลการศึกษาพบเชื้อ *Chaetomium* sp. จำนวนค่อนข้างน้อย และพบเพียง 4 ชนิด สามารถจำแนกชนิดได้ 3 ชนิด อีกหนึ่งชนิดยังไม่สามารถจำแนกได้ ดังแสดงในตารางที่ 2



ภาพที่ 1 การศึกษาเชื้อราในตัวอย่างดิน

ก. การศึกษาเชื้อราในตัวอย่างดินด้วย Dilution pour plate

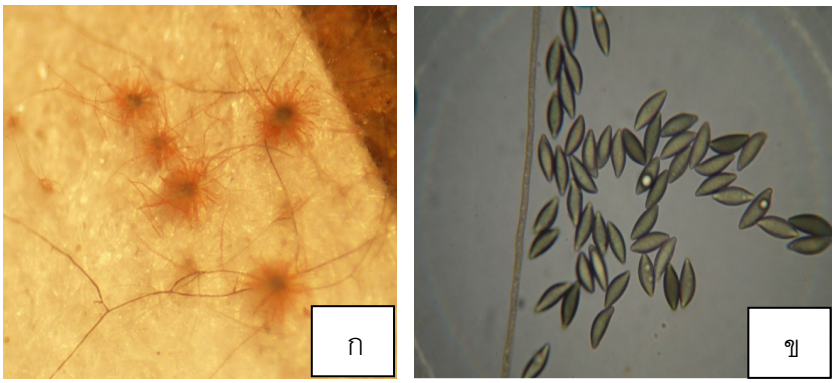
ข. การศึกษาเชื้อราในตัวอย่างดินด้วยวิธี Baiting



ภาพที่ 2 เพอริทีเชียมและสปอร์ของเชื้อรา *Chaetomium malaysiense*

ก. เพอริทีเชียม

ข. สปอร์



ภาพที่ 3 เพอริทีเชียมและสปอร์ของเชื้อรา *Chaetomium fusiforme*

ก. เพอริทีเชียม

ข. สปอร์

ตารางที่ 2 ชนิดและเปอร์เซ็นต์ความถี่ของเชื้อราที่ตรวจพบจากดินในพื้นที่ปกปักพันธุกรรมพืชเขื่อนรัชชประภาระหว่างเดือน มกราคม ถึงสิงหาคม 2553 ด้วยวิธี Baiting

ชนิดเชื้อรา	เปอร์เซ็นต์ความถี่ที่พบเชื้อราในแต่ละเดือน			
	มกราคม	เมษายน	มิถุนายน	สิงหาคม
Chaetomium malaysiense	1	1	5	1
Chaetomium fusiforme	-	1	-	-
Chaetomium homopilatum	-	-	1	-
Chaetomium sp.1	-	1	-	-

2. **ศึกษาเชื้อราที่อาศัยบนเศษซากใบ**

2.1 ศึกษาเชื้อราบนเศษซากใบด้วยวิธี Dilution pour plate

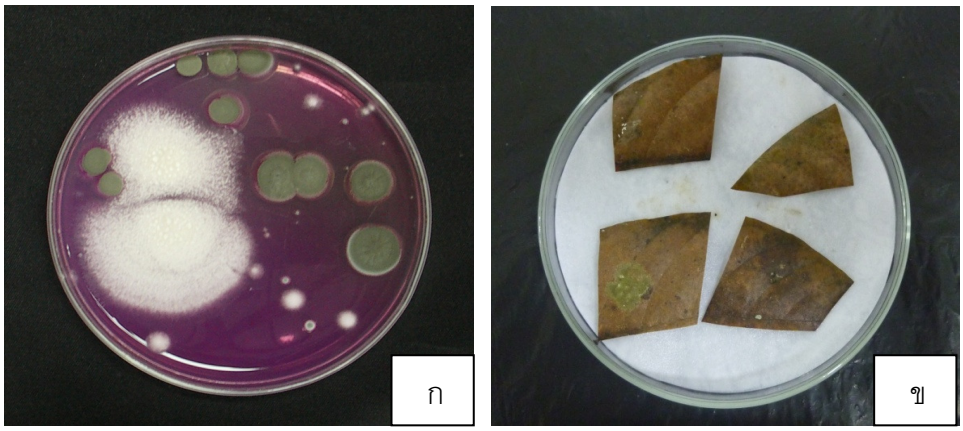
จากการศึกษาเชื้อราบนเศษซากใบด้วยวิธี Dilution pour plate บนอาหาร GANA ผสม streptomycin sulphate ความเข้มข้น 500 mg/l จำนวน 4 ครั้ง (มกราคม เมษายน มิถุนายน และสิงหาคม 2553) ดังแสดงในภาพที่ 2 ก. พบว่าเชื้อราที่พบส่วนใหญ่ คือ *Aspergillus* spp. จำนวน 10 ชนิด *Penicillium* spp. และจำนวน 5 ชนิด และ *Trichoderma* spp. จำนวน 4 ชนิด บางชนิดพบทุกครั้งที่สำรวจ เช่น *A. japonicum* ในขณะที่บางชนิดพบเฉพาะครั้งแรกที่สำรวจ เปอร์เซ็นต์เชื้อที่พบแตกต่างกันไปในแต่ละครั้ง ดังสรุปในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ชนิดและเปอร์เซ็นต์ความถี่ของเชื้อราที่ตรวจพบบนเศษซากใบในพื้นที่ปกปักษ์พันธุกรรมพืชเขื่อนรัชชประภา ในอาหาร GANA ระหว่างเดือน มกราคม ถึงสิงหาคม 2553 ด้วยวิธี Dilution pour plate

ชนิดเชื้อรา	เปอร์เซ็นต์ความถี่ที่พบเชื้อราในแต่ละเดือน			
	มกราคม	เมษายน	มิถุนายน	สิงหาคม
Aspergillus candidus	24	-	-	-
Aspergillus flavus	-	76	40	6.67
Aspergillus fumigatus	-	48	-	-
Aspergillus japonicum	20	28	32	20
Aspergillus niger	-	48	-	30
Aspergillus nireus	-	72	80	18.33
Aspergillus parasiticus	-	12	-	-
Aspergillus sclerotiorum	-	8	-	-
Aspergillus sp.1	-	8	-	6.67
Aspergillus sp. 2	20	-	-	-
Eupenicillium sp. 1	4	16	-	-
Eupenicillium sp. 2	8	-	-	-
Penicillium sp.1	80	16	64	18.33
Penicillium sp.2	4	20	-	13.33
Penicillium sp.3	-	-	-	11.67
Pestalotiopsis sp.	4	-	-	-
Trichoderma sp. 1	24	52	28	21.67
Trichoderma sp. 2	-	72	4	13.33
Trichoderma sp. 3	-	-	-	6.67
Trichoderma sp. 4	-	-		11.67
Unknown 1	36	-	-	-

2.2 ศึกษาเชื้อราบนเศษซากใบด้วยวิธี Direct isolation

จากการศึกษาเชื้อราบนเศษซากใบด้วยวิธี Direct isolation โดยนำตัวอย่างใบบ่มในจานชื้น(moist chamber) บ่มตัวอย่างไว้และตรวจ fruiting body หรือ ascostroma ของเชื้อราด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ Stereo และ Compound พร้อมบันทึกภาพ ผลการศึกษาพบเชื้อรา จำนวนมากถึง 228 ไอโซเลทโดยแบ่งเป็นเชื้อในกลุ่ม Ascomycetes จำนวน 14 สกุล Basidiomycota จำนวน 2 สกุล Deuteromycetes จำนวน 91 สกุล Oomycetes จำนวน 1 สกุล ดังสรุปในตารางที่ 4 และภาพที่ 5 ถึงภาพที่ 63 การที่พบเชื้อราจำนวนมากถึง 227 ไอโซเลท และหลากหลาย อาจเนื่องจากอาหารในที่นี้ก็คือใบพืช ซึ่งเป็นที่อาศัยตามธรรมชาติของเชื้อ เหมาะต่อการเจริญของเชื้อรานั้นๆ ในขณะที่การศึกษาด้วยวิธี Dilution pour plate ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ GANA ซึ่งเหมาะต่อการเจริญของเชื้อบางชนิด



ภาพที่ 4 การศึกษาเชื้อราบนเศษซากใบ

ก. ศึกษาด้วยวิธี Dilution pour plate

ข. ศึกษาด้วยวิธี Direct isolation

ตารางที่ 4 ชนิดและเปอร์เซ็นต์ความถี่ของเชื้อราที่ตรวจพบบนเศษซากใบในพื้นที่ปกปักพันธุกรรมพืชเขื่อนรัชชประภา ระหว่างเดือน มกราคม ถึงสิงหาคม 2553 ด้วยวิธี Direct isolation

ชนิดเชื้อรา	เปอร์เซ็นต์ความถี่ที่พบเชื้อราในแต่ละเดือน			
	มกราคม	เมษายน	มิถุนายน	สิงหาคม
Ascomycetes				
Apomelasmia sp.	-	-	1	-
Chaetomium sp.	-	1	-	1
Didymosphaeria oblitescens				4
Dothiorella spp.	-	1	2	-
Eriospora leucostoma	-	2	6	-
Hercospora coronata	-	-	-	2
Linodochium hyalinum	-	-	1	-
Memnoniella echinata	1	-	1	-
Mirandina corticola	-	-	-	3
Myriogonium maring	-	-	1	-
Hypoxylon spp.1	-	4	20	6
Hypoxylon spp.2	-	-	2	-
Hypoxylon spp.3	-	-	5	-
Hypoxylon spp.4	-	-	-	-
Polyscytalum spp.	3	-	-	-
Septonema fasciculare	-	-	1	-
Sphaleromyces clavisporus	-	-	1	-
Basidiomycotes				
Marasmius spp.	-	-	5	-
Mimema venturae	-	3	1	-
Deuteromycetes				
Acremoniula fagi	-	2	-	-
Acremoniula sp.	-	1	1	-
Acremonium butyri	-	-	1	-

ตารางที่ 4 (ต่อ)

ชนิดเชื้อรา	เปอร์เซ็นต์ความถี่ที่พบเชื้อราในแต่ละเดือน			
	มกราคม	เมษายน	มิถุนายน	สิงหาคม
Acremonium cerealis	-	-	-	5
Acremonium fusidioides	-	-	1	-
Acremonium kiliense	-	-	3	-
Acremonium luzulae	-	-	3	7
Acremonium murorum	-	-	6	-
Acremonium rhodosporium	-	-	-	1
Acremonium spp.	3	2	-	3
Acrodictys sp.				
Actinopelte spp.	-	2	-	-
Ampullifera foliicola	-	-	1	-
Anguillospora spp.	3	-	-	-
Arthrinium sp.	-	-	1	-
Anthrobotry sp.	1	-	-	-
Aspergillus spp.	-	6	-	4
Aspergillus niger	1	6	-	-
Aureobasidium sp.	-	-	-	1
Bactrodesmiclla sp.	-	-	1	-
Bactrodesmium longisporum	-	-	3	-
Beltrania africana	-	-	2	-
Beltrania escnbeckiae	-	-	-	3
Beltrania guerna	-	-	4	1
Beltrania malaiensis	-	-	1	3
Beltrania mangifera	-	-	4	10
Beltrania rhombica	-	1	5	10
Beltrania santapavi	-	-	2	-
Beltraniella humicola	-	2	4	-
Beltraniella odinae	-	-	5	-

ตารางที่ 4 (ต่อ)

ชนิดเชื้อรา	เปอร์เซ็นต์ความถี่ที่พบเชื้อราในแต่ละเดือน			
	มกราคม	เมษายน	มิถุนายน	สิงหาคม
Beltraniella pirozynskii	-	-	-	1
Beltraniella pirozynskii	-	-	-	1
Beltraniella spiralis	-	-	4	-
Beltraniella spp.	-	5	-	-
Boltraniopsis esenbeokiae	-	2	-	-
Botryodiplodia spp.	9	7	5	2
Botryotrichum anamorphs	-	4	-	-
Brachydesmiella sp.	-	-	1	-
Camposporium spp.	-	-	6	-
Capnobotrys neesii	-	-	3	-
Cercospora spp.	-	-	3	-
Cercospora feruginea	-	-	5	-
Cercospora vaginae	-	-	2	-
Cercospora uaginae	-	5	-	-
Cercospora spp.	-	5	7	-
Cercosporidium henningsii	-	-	2	-
Cercosporidium spp.	-	-	3	-
Circinotrichum fertile	-	1	2	-
Circinotrichum maculiforme	-	14	5	2
Circinotrichum spp.	1	8	-	-
Cladosporium britannicum	-	1	3	5
Cladosporium cladosporioides	-	-	-	3
Cladosporium cucumerinum	-	-	-	3
Cladosporium elatum	-	4	2	1
Cladosporium gallicola	-	6	-	-
Cladosporium nigrellum	-	8	-	-
Cladosporium tenuissimum	-	37	22	-

ตารางที่ 4 (ต่อ)

ชนิดเชื้อรา	เปอร์เซ็นต์ความถี่ที่พบเชื้อราในแต่ละเดือน			
	มกราคม	เมษายน	มิถุนายน	สิงหาคม
Cladosporium uredinicola	-	22	4	-
Cladosporium spp.	20	3	-	-
Codinaea assamica	-	-	6	1
Codinaea fertilis	-	-	2	3
Codinaea hughesii	-	-	6	8
Codinaea nughesii				3
Codinaea spp.	3	17	9	2
Colletotrichum gleosporioides	-	-	2	-
Colletotrichum spp.	23	17	23	35
Corynespora cassiicola	-	-	1	1
Corynespora proliferata	-	-	1	-
Corynespora spp.	11	5	3	-
Curvularia affinis	-	-	2	2
Curvularia deightonii	-	1	3	4
Curvularia eragostidis	-	2	-	-
Curvularia geniculata	-	13	2	3
Curvularia lunata	-	19	6	-
Curvularia palleseens	-	3	1	-
Curvularia uricirata	-	3	-	-
Curvularia spp.	7	3	-	-
Cylindrocladium scoparium	-	-	6	-
Cylindrocladium spp.	-	-	3	-
Cylindrotrichum sp.	-	1	-	-
Dactrodesmium spoilomeum	-	-	-	2
Dactylaria chrysosperma	-	2	-	-
Dactylaria hyaline	-	-	-	5
Dactylaria spp.	-	-	-	7

ตารางที่ 4 (ต่อ)

ชนิดเชื้อรา	เปอร์เซ็นต์ความถี่ที่พบเชื้อราในแต่ละเดือน			
	มกราคม	เมษายน	มิถุนายน	สิงหาคม
Dictyodesmium sp.	-	1	-	-
Dictyosporium spp.	-	2	-	-
Diplocladiella scalarides	-	2	-	-
Diplocladiella scalarides	-	2	-	-
Diplodia spp.	-	2	-	-
Ellisiosis gallesiae	-	-	3	11
Ellisiosis vaginata				3
Ellisiosis spp.	-	17	21	-
Endophragmia parva	-	-	1	-
Fusarium acuminatum	25	43	16	2
Fusarium semitectum	-	-	2	-
Fusarium spp.1	-	-	4	-
Fusarium sp.2	-	-	1	-
Gliomatrix spp.	4	-	-	-
Gonatophragmium mori	-	-	1	-
Gyrothrix circinata	-	-	1	-
Gyrothrix podosperma	-	4	7	-
Gyrothrix spp.	-	7	4	-
Hansfordia ovalispora	-	4	-	-
Hansfordia spp.	-	2	-	-
Hansfordia pulvinata	-	-	3	-
Harplographium mangiferae	-	2	6	-
Harplographium spp.	-	-	10	26
Helicoma mulleri	-	-	1	-
Helicosporium spp.	4	1	1	-
Helminthosporium sp.	-	1	1	-
Henicospora coronata	-	-	1	-

ตารางที่ 4 (ต่อ)

ชนิดเชื้อรา	เปอร์เซ็นต์ความถี่ที่พบเชื้อราในแต่ละเดือน			
	มกราคม	เมษายน	มิถุนายน	สิงหาคม
Heteroconium spp.	3	-	-	-
Humicola grisea	-	1	-	-
Humicola spp.	-	4	-	-
Idriella fertile	-	-	6	-
Idriella lunata	-	-	7	-
Idriella spp.	-	13	12	-
Lasiodiplodia theobromae	-	5	5	-
Lasiodiplodia spp.	-	17	29	-
Leptodiscella spp.	-	-	2	-
Menispora spp.	-	-	3	7
Molinia spp.	-	3	3	-
Monacrosporium sp.	-	-	-	1
Neottiosporella radicata	-	-	1	-
Neottiosporella sphaerica				
Nigrospora spp.	1	26	19	-
Paecilomyces sp.	-	-	1	-
Penicillium spp.	14	23	3	3
Periconia jabalpurensis	-	-	-	4
Periconia spp.	11	-	1	-
Pestalotiopsis disseminata	-	-	5	-
Pestalotiopsis sydowiana	-	16	1	-
Pestalotiopsis spp.1	12	35	19	-
Pestalotiopsis spp.2	-	-	3	-
Pestalotia spp.	-	26	-	-
Phoma medicaginis	-	-	-	3
Phomopsis spp.	-	4	-	-
Phyllosticta spp.	25	2	-	-

ตารางที่ 4 (ต่อ)

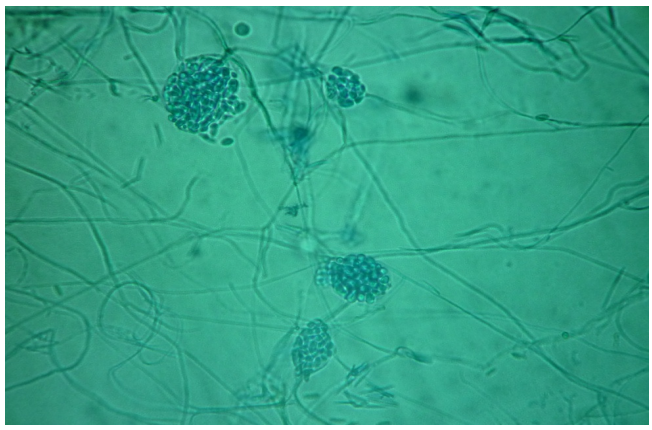
ชนิดเชื้อรา	เปอร์เซ็นต์ความถี่ที่พบเชื้อราในแต่ละเดือน			
	มกราคม	เมษายน	มิถุนายน	สิงหาคม
Pleurothecium recurvatum	-	-	3	-
Pseudobeltrania cedrelae	-	-	1	2
Pseudobeltrania penzigii	-	3	1	9
Pseudobeltrania sp.	-	-	1	-
Pycnidium spp.	-	5	-	-
Rhinocladiella spp.	-	1	-	4
Scolecobasidium compatum	-	-	5	-
Scolecobasidium constrictum	-	-	-	2
Scolecobasidiella spp.	-	2	-	-
Scolecobasidella avellanea	-	-	2	3
Speiropsis hyalospora	-	1	2	4
Speiropsis pedatospora	-	4	-	-
Speiropsis spp.	3	-	-	-
Spiropes sp.	-	-	1	-
Sporidesmium acutisporum	-	-	1	-
Sporidesmium bambusae	-	-	1	2
Sporidesmium cliscoreae	-	-	1	-
Sporidesmium coronatum	-	-	2	-
Sporidesmium ellisii	-	1	-	-
Sporidesmium flagellatum	-	-	1	1
Sporidesmium ghanaeuse	-	2	-	-
Sporidesmium harknessii	-	-	2	3
Sporidesmium jasminicola	-	-	1	-
Sporidesmium longirostratum	-	-	2	1
Sporidesmium nodipes	-	-	-	1
Sporidesmium parvum	-	-	2	-
Sporidesmium penzigii	-	-	3	-

ตารางที่ 4 (ต่อ)

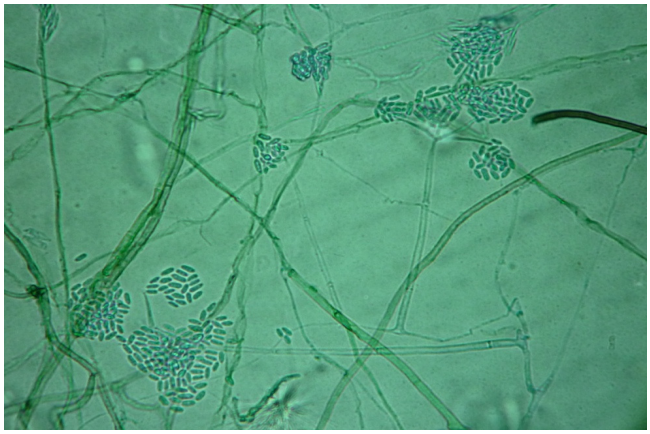
ชนิดเชื้อรา	เปอร์เซ็นต์ความถี่ที่พบเชื้อราในแต่ละเดือน			
	มกราคม	เมษายน	มิถุนายน	สิงหาคม
Sporidesmium rubi	-	-	5	-
Sporidesmium subulatum	-	-	1	-
Sporidesmium spp.1	-	-	8	-
Sporidesmium spp. 2	5	9	-	-
Sporidesmium spp. 3	10	-	-	-
Sporoschismopsis spp.	-	-	3	4
Stachybotrys charfarum	-	-	4	-
Stachybotrys oenanthes	-	5	4	-
Stachybotrys spp.1	3	-	2	-
Stachybotrys spp. 2	8	-	-	-
Stigmina cactivora	-	-	1	-
Stigmina kranzii	-	-	2	-
Stigmina spp.	-	4	-	-
Stigmella spp.	3	-	-	-
Stenella aegles	-	-	1	-
Taeniolella alta	-	-	1	-
Taeniolella pulvillus	-	-	1	-
Telraploa sp.				1
Tetraploa aristata	-	-	6	-
Tetraploa spp.	-	3	-	-
Tetraposporium asterinearum		-	4	-
Tetraposporium rarenelii	-	1	-	-
Thermomyces lanuginosus	-	3	1	-
Torula graminis	-	-	-	1
Torula herbarum	-	-	1	-
Torula spp.	-	-	7	-
Triscelophorus spp.	3	-	-	-

ตารางที่ 4 (ต่อ)

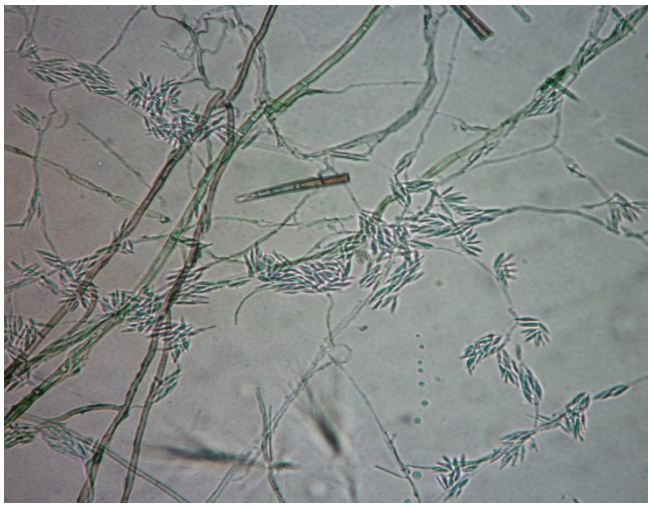
ชนิดเชื้อรา	เปอร์เซ็นต์ความถี่ที่พบเชื้อราในแต่ละเดือน			
	มกราคม	เมษายน	มิถุนายน	สิงหาคม
Tripospermum myrti	-	6	4	15
Triposporium sp.	1	-	-	-
Truncatella spp.	-	-	5	-
Trichoderma harzianum	-	1	-	-
Trichoderma reoviridae	-	5	-	-
Trichoderma spp.	3	-	-	-
Veronaea botryosa	-	-	2	-
Veronaea carlinae	-	25	18	-
Volutina sp.	-	-	1	-
Wiesneriomyces spp.	4	4	3	5
Wiesneriomyces javanicus	-	9	-	-
Zygosporium echinosporum	-	13	4	-
Zygosporium gibbum	-	2	3	6
Zygosporium masonii	-	13	9	2
Zygosporium sp.	-	1	-	-
Oomycetes				
Phytophthora sp.	-	1	-	-



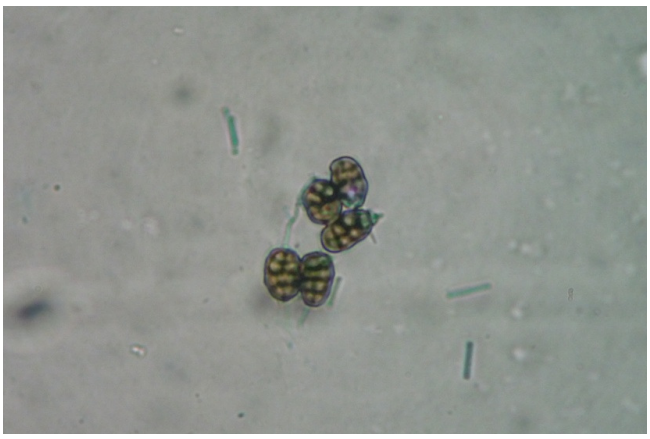
ภาพที่ 5 เส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา *Acremonium* sp. ได้จากการศึกษาบนเศษซากใบ



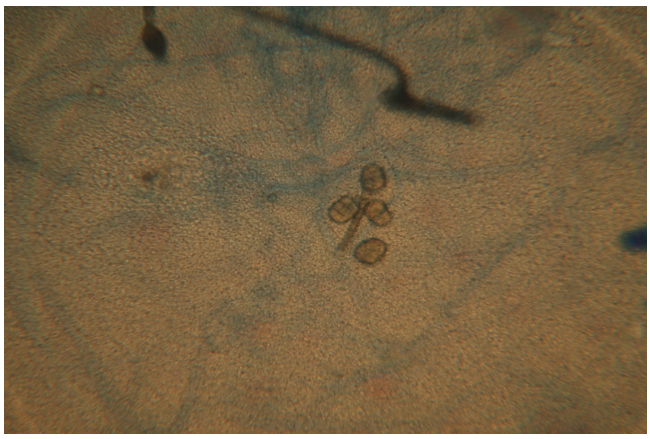
ภาพที่ 6 เส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา *Acremonium luzulae* ได้จากการศึกษาบนเศษซากใบ



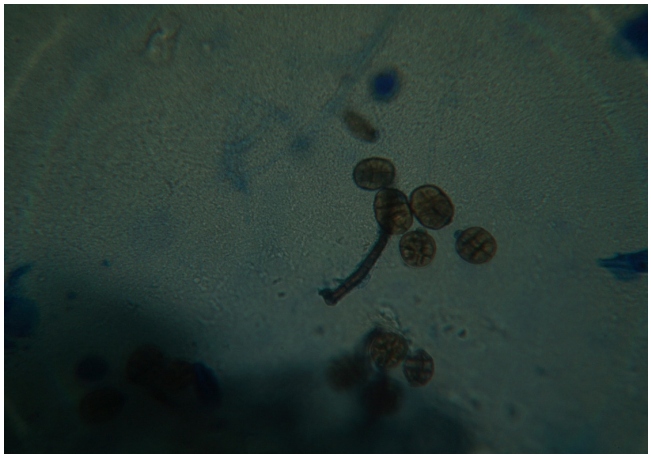
ภาพที่ 7 เส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา *Acremonium* sp. ได้จากการศึกษาบนเศษซากใบ



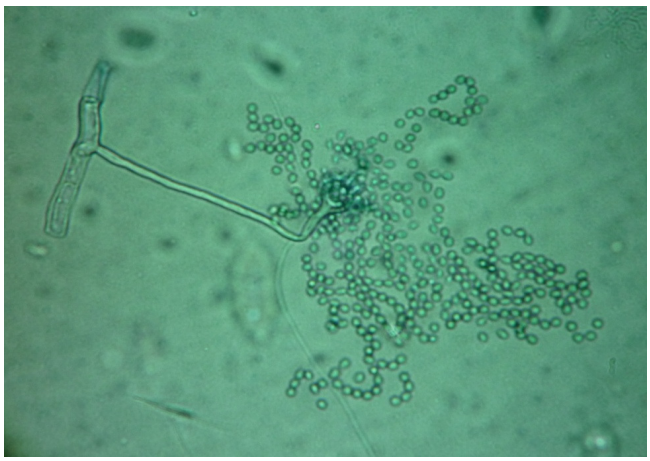
ภาพที่ 8 เส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา *Acrodictys* sp. ได้จากการศึกษาบนเศษซากใบ



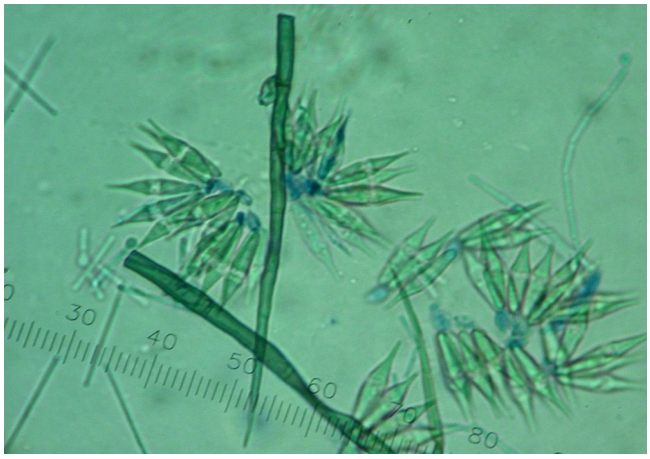
ภาพที่ 9 เส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา *Acrodictys* sp. ได้จากการศึกษาบนเศษซากใบ



ภาพที่ 10 เส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา *Acrodictys* sp. ได้จากการศึกษาบนเศษซากใบ

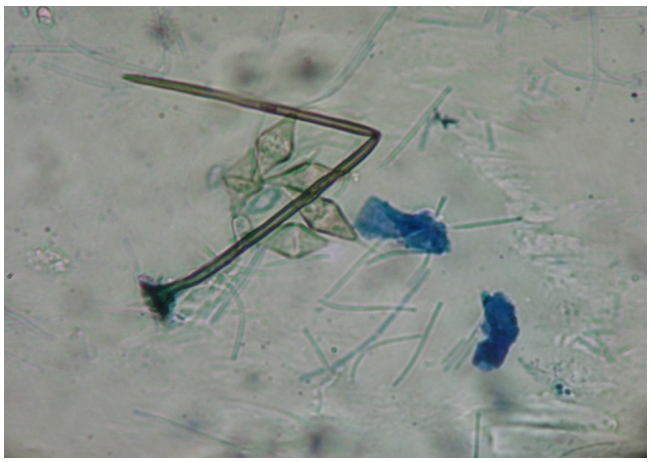


ภาพที่ 11 เส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา *Aspesgillus* sp. ได้จากการศึกษาบนเศษซากใบ

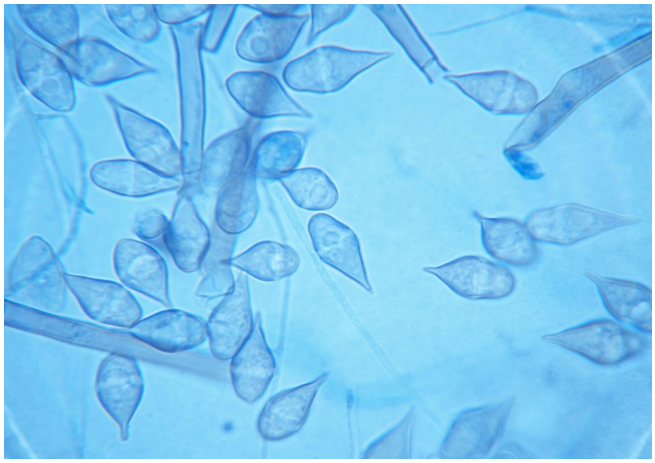


ภาพที่ 12 เส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา *Beltraniopsis esenbeckiae* ได้จากการศึกษาบนเศษซากใบ

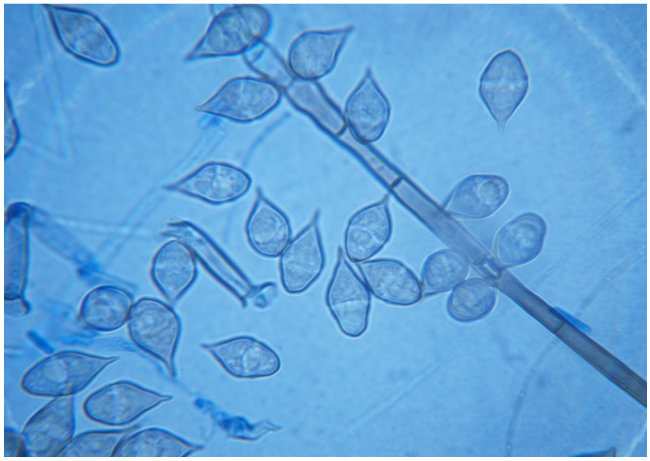
ภาพที่ 13 เส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา *Beltrania mangifera* ได้จากการศึกษาบนเศษซากใบ



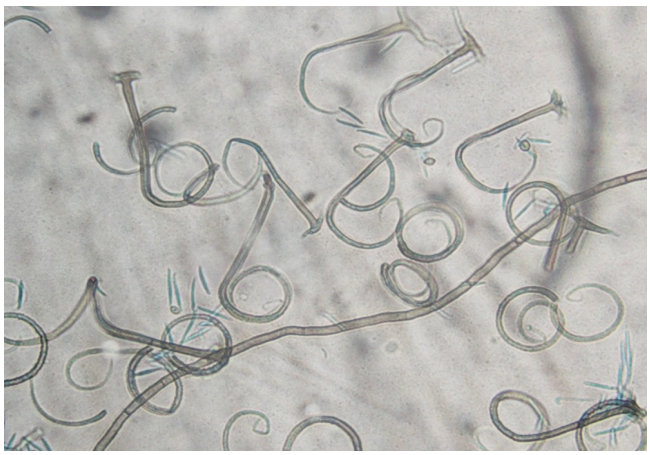
ภาพที่ 14 เส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา *Beltrania rhombica* ได้จากการศึกษาบนเศษซากใบ



ภาพที่ 15 เส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา *Beltraniella odinae* ได้จากการศึกษาบนเศษซากใบ

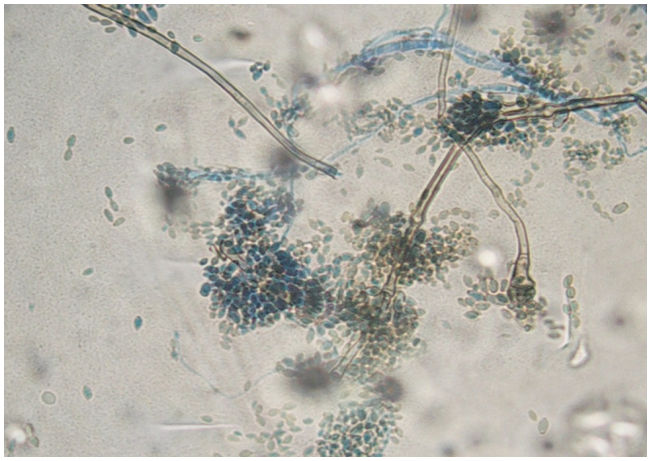


ภาพที่ 16 เส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา *Beltraniella* sp. ได้จากการศึกษาบนเศษซากใบ

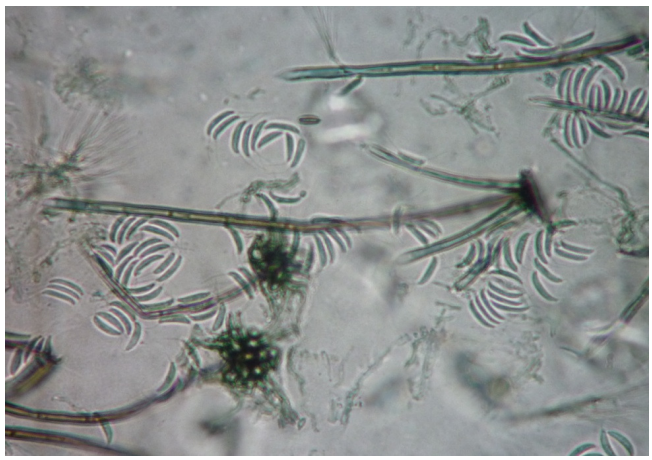


ภาพที่ 17 เส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา *Circinotrichum maculiforme* ได้จากการศึกษาบนเศษซากใบ

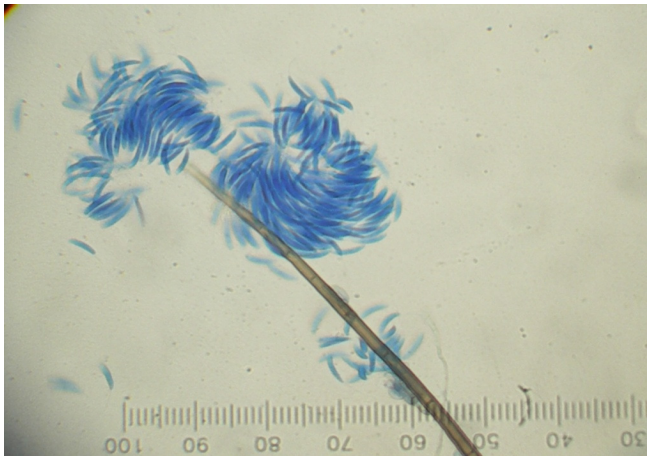
ภาพที่ 18 เส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา *Cladosporium cucumerinum* ได้จากการศึกษาบนเศษซากใบ



ภาพที่ 19 เส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา *Cladosporium* sp. ได้จากการศึกษาบนเศษซากใบ

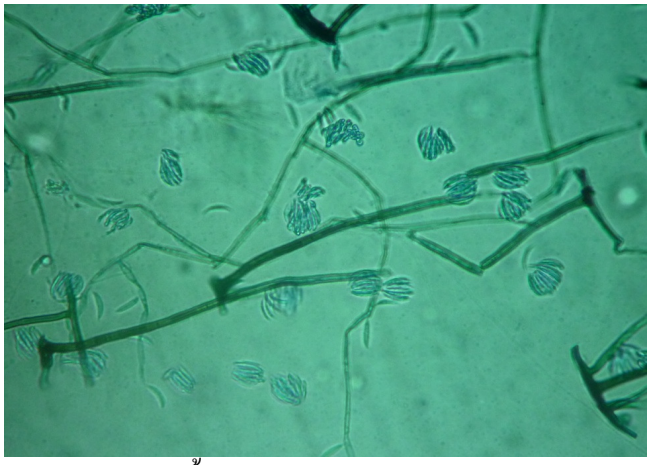


ภาพที่ 20 เส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา *Codinaea assamica* ได้จากการศึกษาบนเศษซากใบ

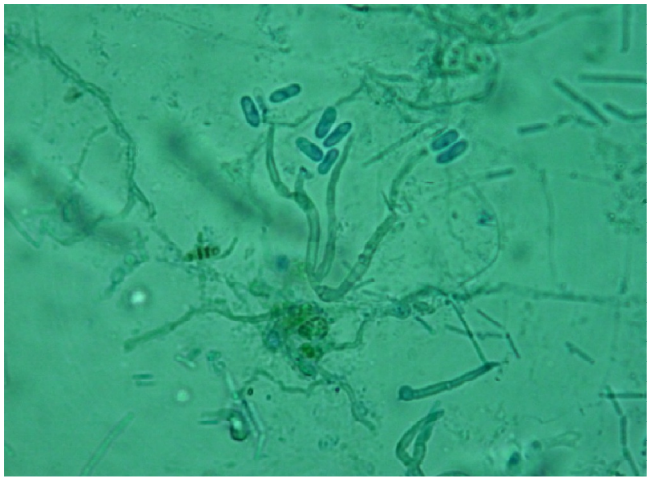


ภาพที่ 21 เส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา *Codinaea britannica* ได้จากการศึกษาบนเศษซากใบ

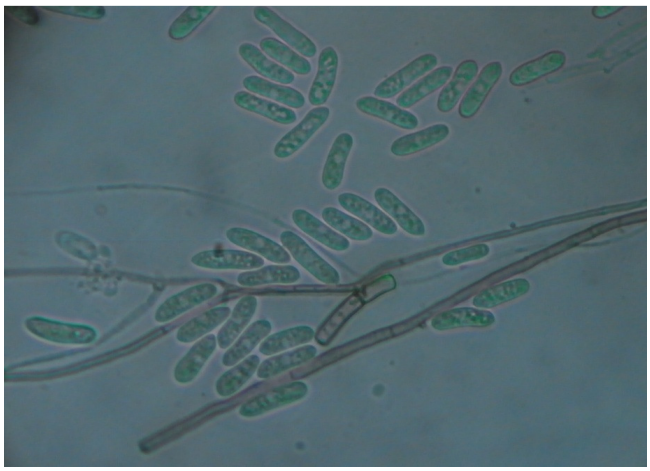
ภาพที่ 22 เส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา *Codinaea fertilis* ได้จากการศึกษาบนเศษซากใบ



ภาพที่ 23 เส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา *Codinaea hughesii* ได้จากการศึกษาบนเศษซากใบ

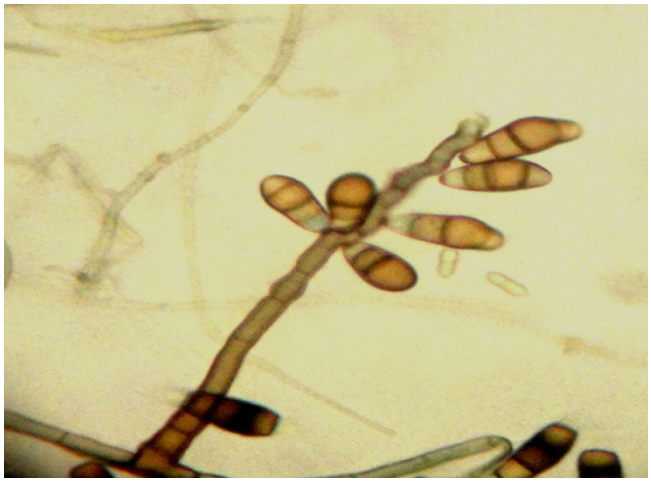


ภาพที่ 24 เส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา *Colletotrichum* sp.1 ได้จากการศึกษาบนเศษซากใบ

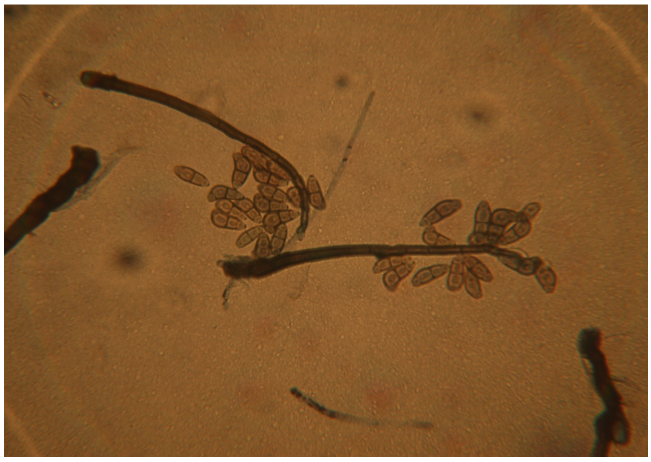


ภาพที่ 25 เส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา *Colletotrichum* sp.2 ได้จากการศึกษาบนเศษซากใบ

ภาพที่ 26 เส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา *Colletotrichum* sp.3 ได้จากการศึกษาบนเศษซากใบ



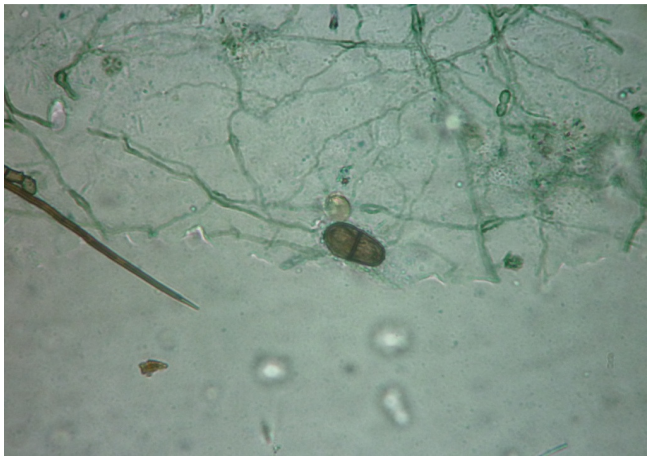
ภาพที่ 27 เส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา *Curvularia* sp.1 ได้จากการศึกษาบนเศษซากใบ



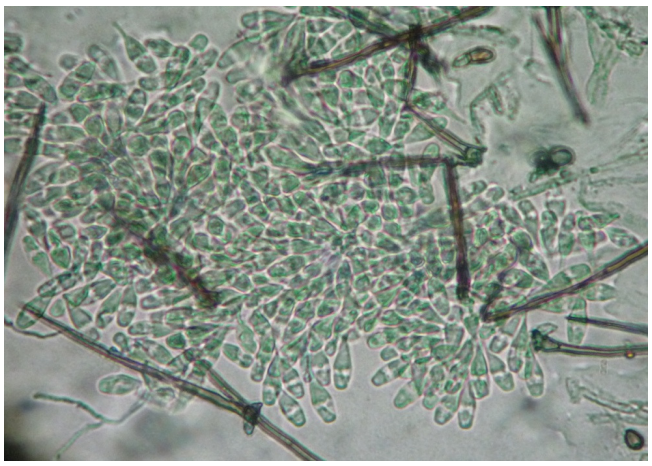
ภาพที่ 28 เส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา *Curvularia* sp.2 ได้จากการศึกษาบนเศษซากใบ

ภาพที่ 29 เส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา *Dactylaria hyalina* ได้จากการศึกษาบนเศษซากใบ

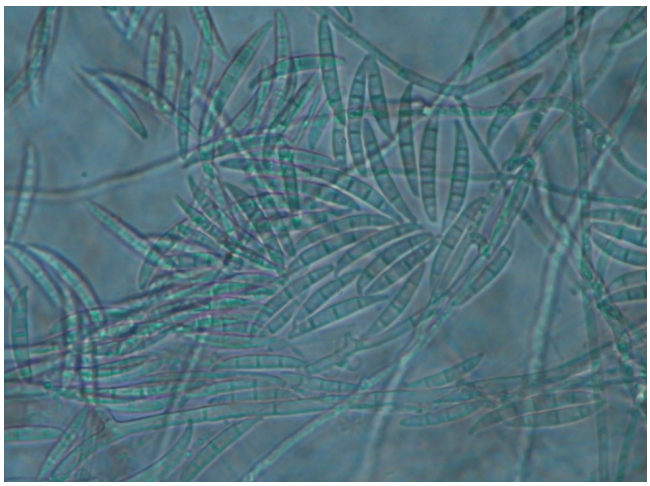
ภาพที่ 30 เส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา *Dactylaria junci* ได้จากการศึกษาบนเศษซากใบ



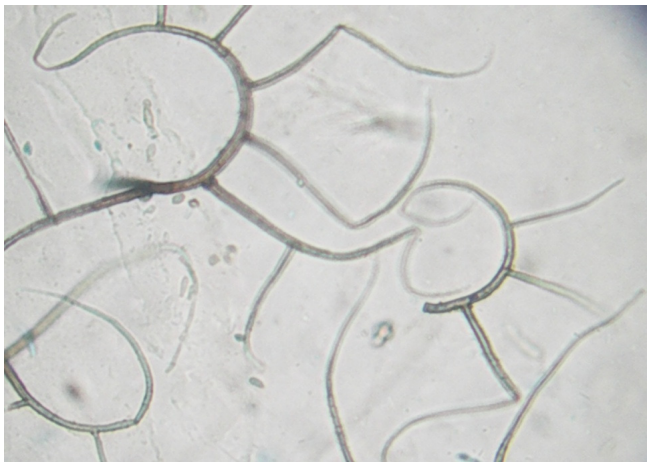
ภาพที่ 31 เส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา *Didymosphaeria oblitescens* ได้จากการศึกษาบนเศษซากใบ



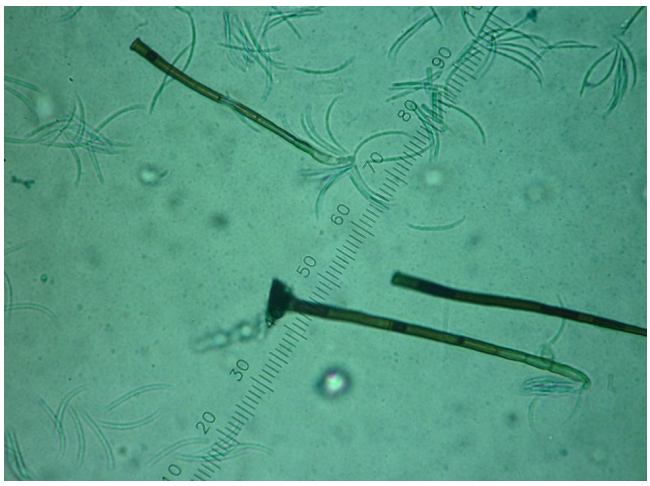
ภาพที่ 32 เส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา *Ellisopsis gallesiae* ได้จากการศึกษาบนเศษซากใบ



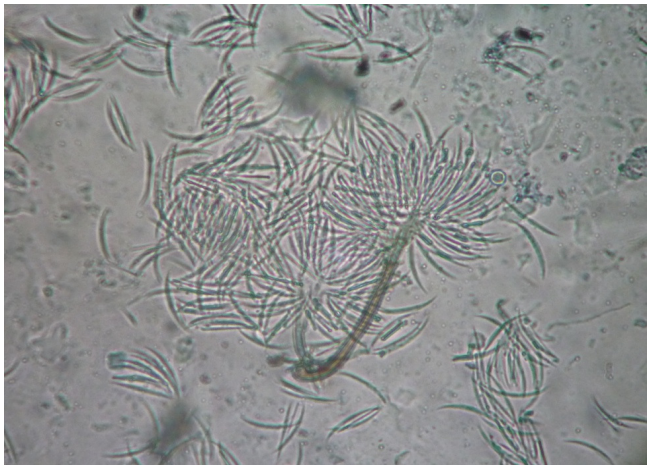
ภาพที่ 33 เส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา *Fusarium acuminatum* ได้จากการศึกษาบนเศษซากใบ



ภาพที่ 34 เส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา *Gyrothrix circinata* ได้จากการศึกษาบนเศษซากใบ

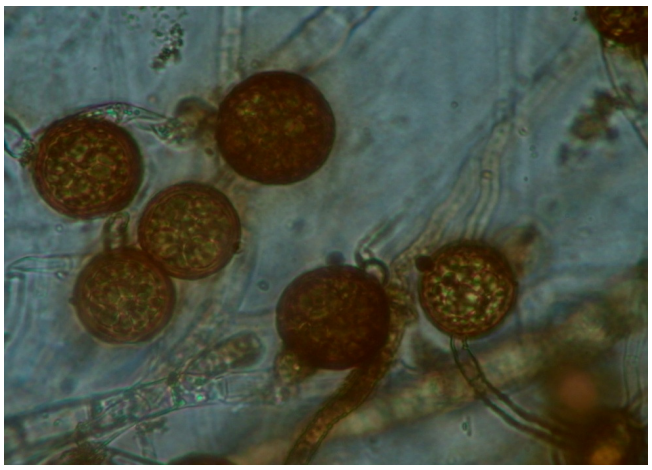


ภาพที่ 35 เส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา *Harphographium* sp.1 ได้จากการศึกษาบนเศษซากใบ

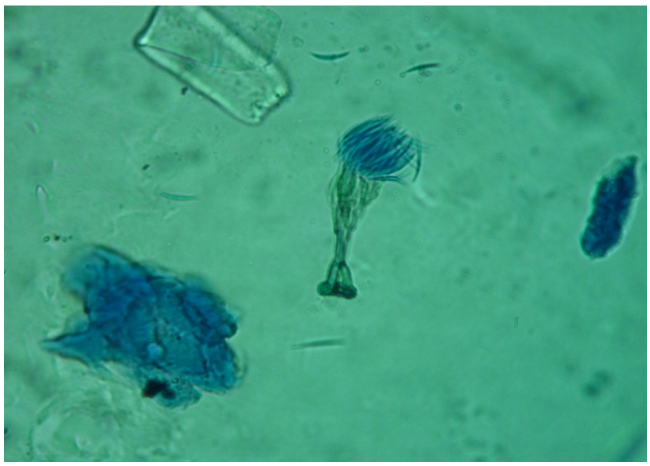


ภาพที่ 36 เส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา *Harphographium* sp.2 ได้จากการศึกษาบนเศษซากใบ

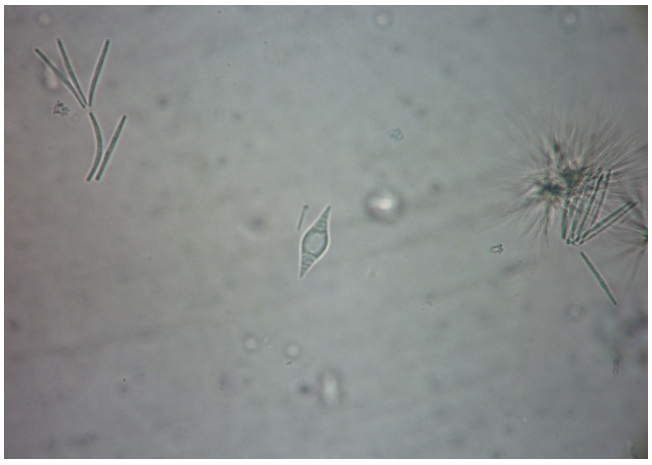
ภาพที่ 37 เส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา *Henicospora coronata* ได้จากการศึกษาบนเศษซากใบ



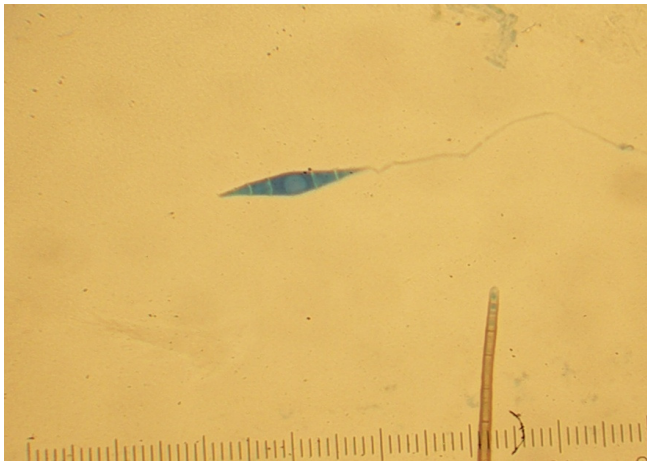
ภาพที่ 38 เส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา *Humicola fuscoatra* ได้จากการศึกษาบนเศษซากใบ



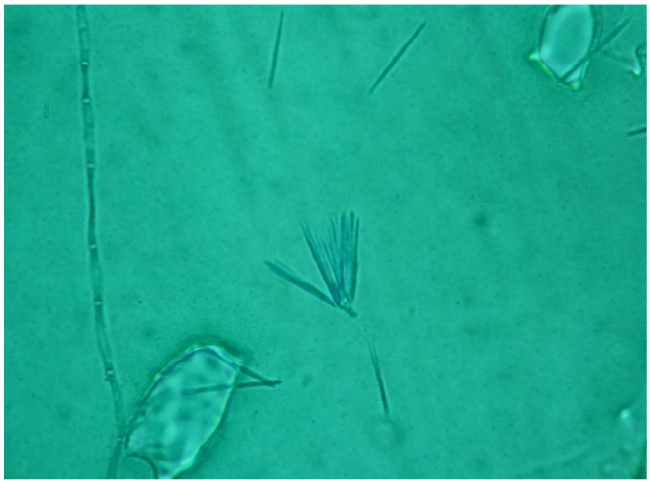
ภาพที่ 39 เส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา *Menispora* sp. ได้จากการศึกษาบนเศษซากใบ



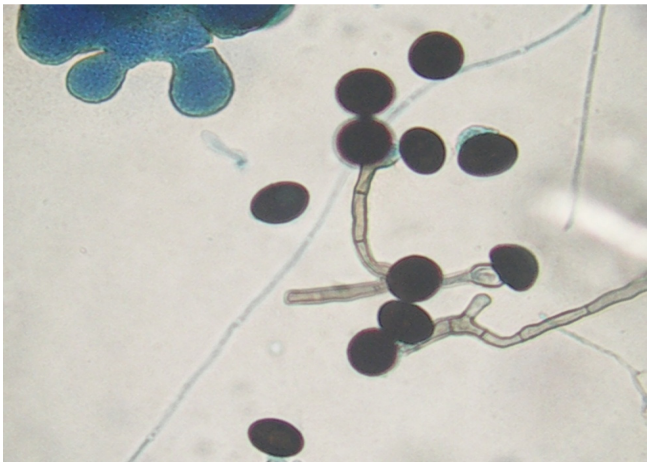
ภาพที่ 40 เส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา *Monacrosporium* sp. ได้จากการศึกษาบนเศษซากใบ



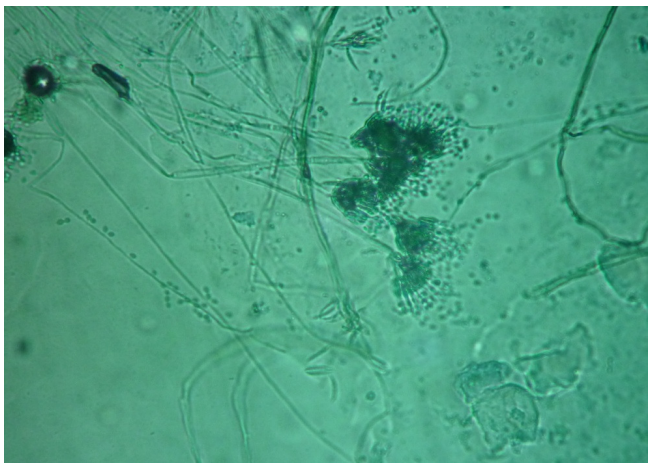
ภาพที่ 41 เส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา *Monacrosporium* sp. ได้จากการศึกษาบนเศษซากใบ



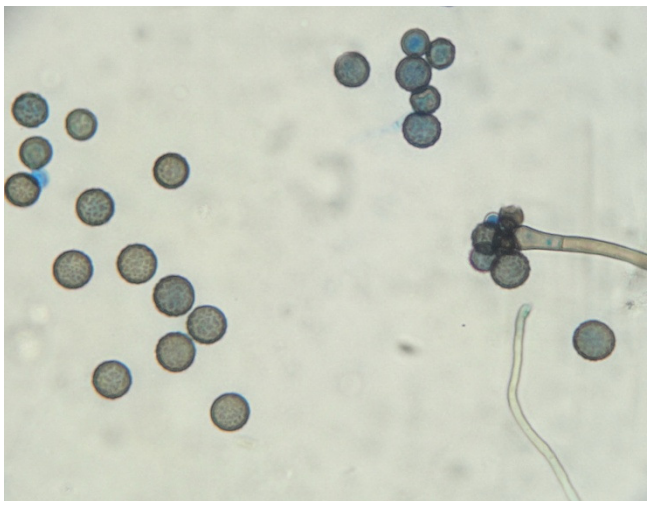
ภาพที่ 42 เส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา *Mirandina corticola* ได้จากการศึกษาบนเศษซากใบ



ภาพที่ 43 เส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา *Nigrospora sphaerica* ได้จากการศึกษาบนเศษซากใบ

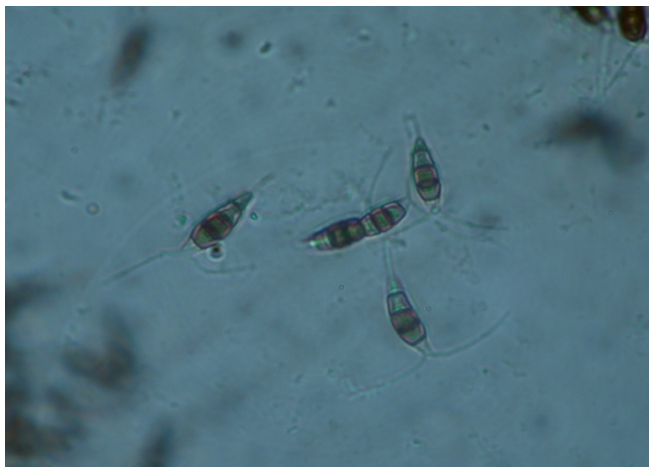


ภาพที่ 44 เส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา *Penicillium* sp. ได้จากการศึกษาบนเศษซากใบ



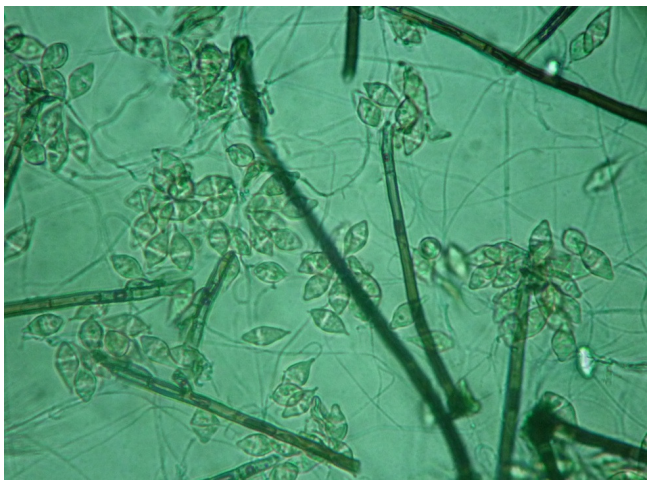
ภาพที่ 45 เส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา *Periconia* sp. ได้จากการศึกษาบนเศษซากใบ

ภาพที่ 46 เส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา *Pestalotiopsis disseminata* ได้จากการศึกษาบนเศษซากใบ

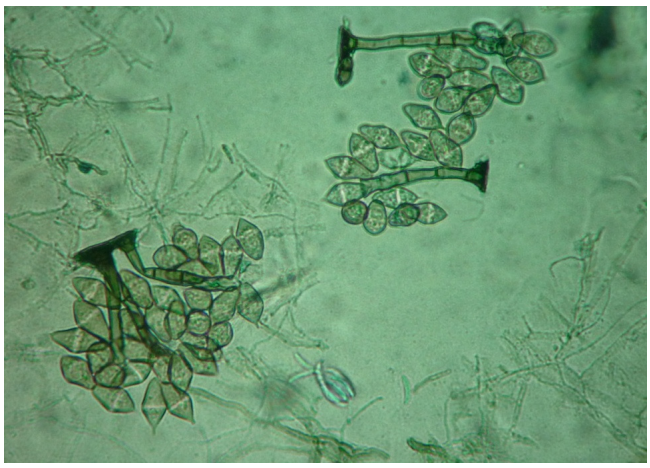


ภาพที่ 47 เส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา *Pestalotiopsis sydowiana* ได้จากการศึกษาบนเศษซากใบ

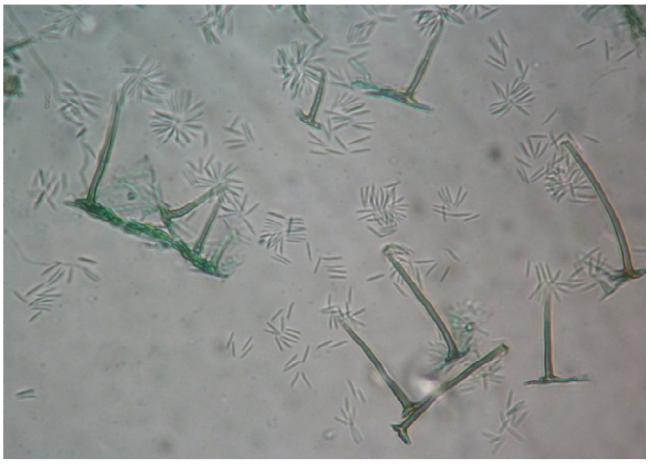
ภาพที่ 48 เส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา *Polyscytalum fecundissimum* ได้จากการศึกษาบนเศษซากใบ



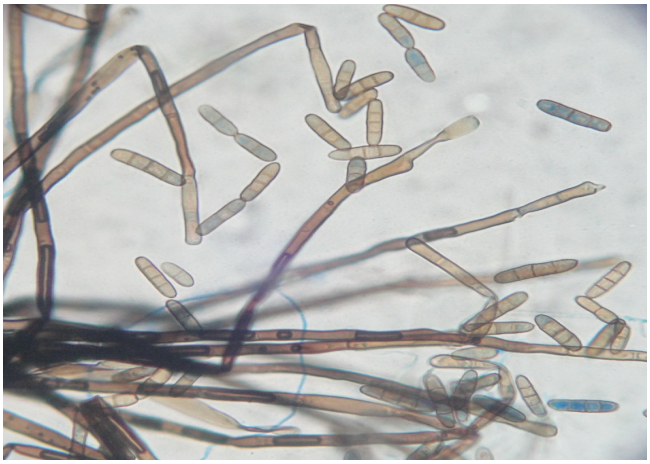
ภาพที่ 59 เส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา *Pseudobeltrania cedrelae* ได้จากการศึกษาบนเศษซากใบ



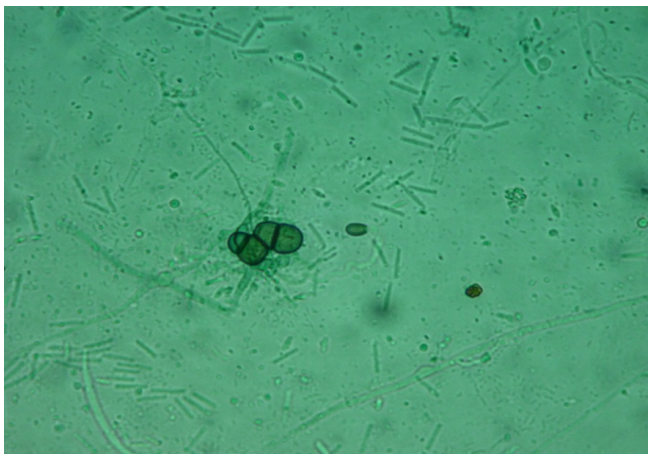
ภาพที่ 50 เส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา *Pseudobeltrania penzigii* ได้จากการศึกษาบนเศษซากใบ



ภาพที่ 51 เส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา *Rhinocladiella* sp. ได้จากการศึกษาบนเศษซากใบ



ภาพที่ 52 เส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา *Septonema secedens* ได้จากการศึกษาบนเศษซากใบ

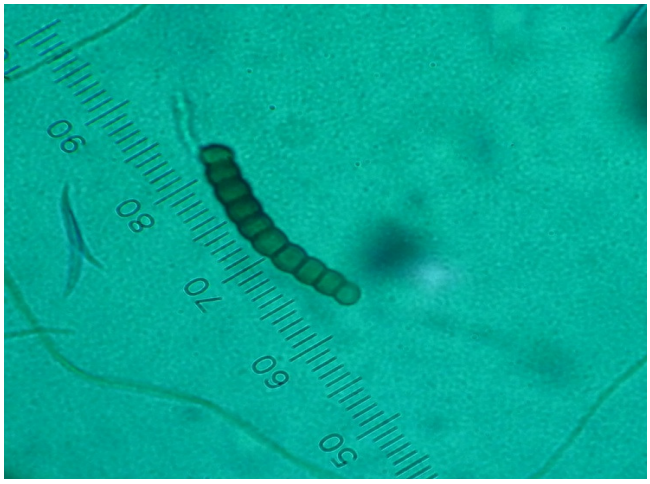


ภาพที่ 53 เส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา *Scolecobasidiell avellnea* ได้จากการศึกษาบนเศษซากใบ

ภาพที่ 54 เส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา *Sporidesmium harknesii* ได้จากการศึกษาบนเศษซากใบ

ภาพที่ 55 เส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา *Sporoschismopsis* sp. ได้จากการศึกษาบนเศษซากใบ

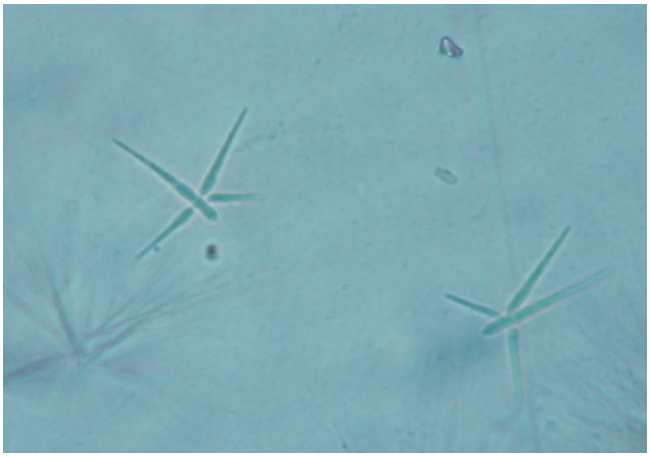
ภาพที่ 56 เส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา *Sporidesmium flagellatum* ได้จากการศึกษาบนเศษซากใบ



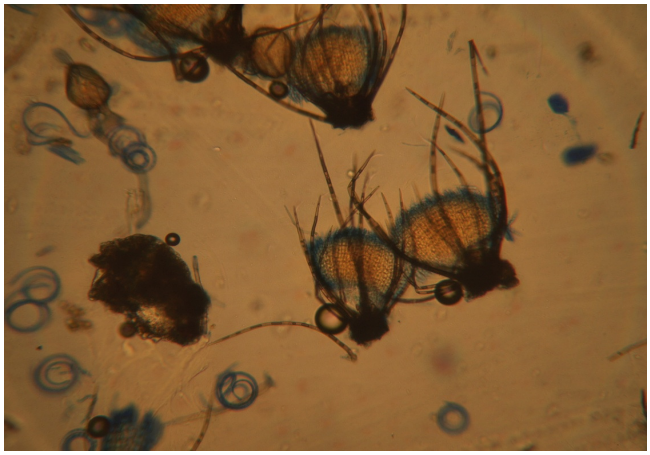
ภาพที่ 57 เส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา *Torula graminis* ได้จากการศึกษาบนเศษซากใบ

ภาพที่ 58 เส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา *Tripospermum myrti* ได้จากการศึกษาบนเศษซากใบ

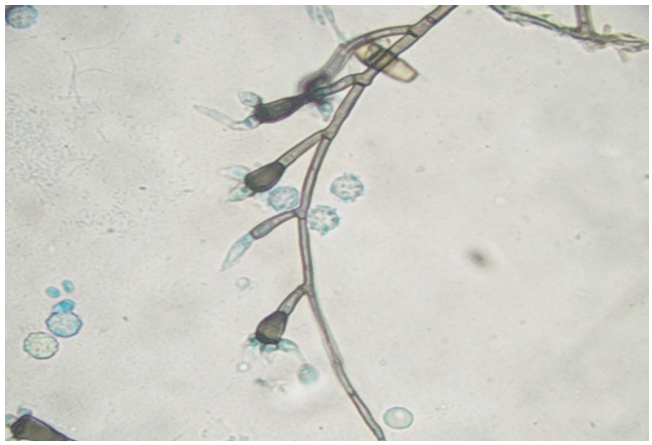
ภาพที่ 59 เส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา *Tripospermum* sp. ได้จากการศึกษาบนเศษซากใบ



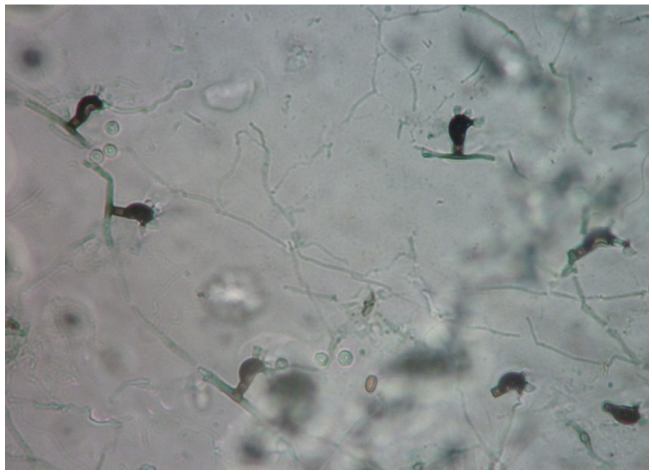
ภาพที่ 60 เส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา *Triscelophorus acuminatus* ได้จากการศึกษาบนเศษซากใบ



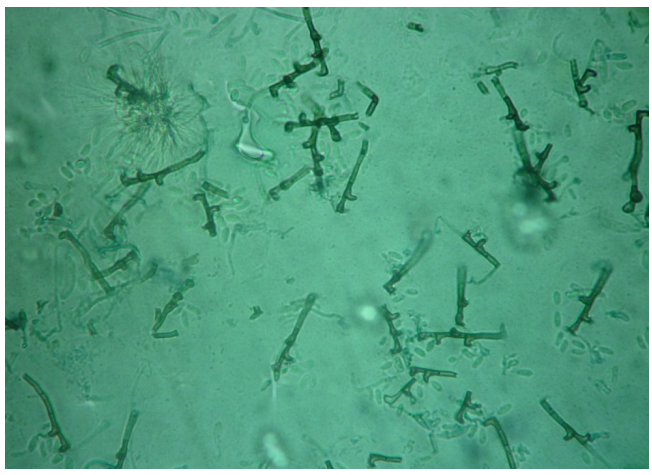
ภาพที่ 61 เส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา *Wiesneriomyces javanicus* ได้จากการศึกษาบนเศษใบ



ภาพที่ 62 เส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา *Zygosporium echinosporum* ได้จากการศึกษาบนเศษซากใบ



ภาพที่ 63 เส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา *Zygosporium gibbum* ได้จากการศึกษาบนเศษซากใบ



ภาพที่ 64 เส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา *Zygosporium masonii* ได้จากการศึกษาบนเศษซากใบ

สรุปผลและวิจารณ์

จากการศึกษาปริมาณเชื้อราในดินและเศษซากพืชบริเวณพื้นที่ปกปักพันธุกรรมพืชเขื่อนรัชชประภา จ.สุราษฎร์ธานี โดยเก็บตัวอย่างดินและเศษซากใบในพื้นที่แนวสำรวจ จำนวน 5 เส้นทางในเดือน มกราคม เมษายน มิถุนายน และสิงหาคม 2553 รวม 4 ครั้ง ผลการศึกษาพบว่าการแยกเชื้อราจากตัวอย่างดินด้วยวิธี Dilution pour plate ในอาหาร glucose ammonium nitrate agar GANA และ Trichoderma selective medium (TSM) โดยผสม streptomycin sulphate ความเข้มข้น 500 mg/l ในอาหารทั้ง 2 ชนิด พบเชื้อราจำนวน 22 ชนิด ใน 3 สกุล ได้แก่ *Aspergillus* spp. *Penicillium* spp. และ *Trichoderma* spp. โดยทั่วไปเชื้อที่ได้จากการเลี้ยงด้วยวิธีนี้ ส่วนใหญ่เป็นเชื้อราที่เจริญมาจากสปอร์ที่มีการฟุ้งกระจายจึงพบเชื้อปริมาณมาก ประกอบกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหมาะต่อการเจริญของเชื้อรานั้นๆ ส่วนการศึกษาเชื้อราในดินด้วยวิธี baiting ซึ่งเหมาะในการแยกเชื้อสกุล *Chaetomium* spp. นั้น สามารถแยกได้ *Chaetomium* spp. 4 ชนิด

สำหรับการแยกเชื้อราจากตัวอย่างเศษซากใบด้วยวิธี Dilution pour plate ด้วยอาหาร GANA ผสม streptomycin sulphate ความเข้มข้น 500 mg/l พบเชื้อราจำนวน 21 ชนิด คล้ายคลึงกับการศึกษาเชื้อราในดินด้วยวิธี และอาหารชนิดเดียวกัน เชื้อราที่พบได้แก่ *Aspergillus* spp. *Penicillium* spp. และ *Trichoderma* spp. แต่มีเพิ่มเติมคือ *Eupenicillium* sp. และ *Pestalotiopsis* sp. ในขณะที่การศึกษาเชื้อราบนเศษซากใบด้วยวิธี direct isolation โดยนำมาบ่มในจานเลี้ยงเชื้อให้ความชื้นเพื่อให้เชื้อราสร้าง fruiting body หรือ ascostroma พบเชื้อราจำนวน 227 ชนิด มีความหลากหลายสูง สามารถแบ่งกลุ่มเชื้อราได้เป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ Ascomycetes พบเชื้อรา 14 สกุล 17 ชนิดกลุ่ม Basidiomycetes พบเชื้อรา 2 สกุล 2 ชนิด กลุ่ม mitosporic ascomycetes พบเชื้อรา 90 สกุล 207 ชนิด และกลุ่ม Oomycetes จำนวนเชื้อราที่พบ 1 ชนิด พบเชื้อรามากที่สุดในช่วงเดือนมิถุนายน ตัวอย่างเชื้อราที่เป็นสายพันธุ์เด่น ได้แก่ *Aspergillus* spp., *Beltrania mangifera*, *Beltrania rhombica*, *Botryodiplodia* spp., *Circinotrichum maculiforme, Cladosporium tenuissimum*, *Cladosporium uredinicola, Colletotrichum* spp., *Corynespora* spp., *Curvularia lunata*, *Fusarium* acuminatum, *Haplographium* spp., *Zygosporium gibbum,*และ *Sporidesmium flagellatum* เป็นต้น การที่พบเชื้อราจำนวนมากและหลากหลาย อาจเนื่องจากอาหารในที่นี้ก็คือใบพืช ซึ่งเป็นที่อาศัยตามธรรมชาติของเชื้อ เหมาะต่อการเจริญของเชื้อรานั้นๆจึงพบเชื้อราจำนวนค่อนข้างมาก และการที่พบชนิดและปริมาณแตกต่างกันในแต่ละครั้งที่ศึกษา เนื่องมาจากอุณหภูมิ ความชื้น และปริมาณน้ำฝนที่แตกต่างกัน จึงทำให้ชนิดและปริมาณเชื้อราในแต่ละเดือนไม่เท่ากัน

บรรณานุกรม

คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา. 2541. ปฐพีวิทยาเบื้องต้น. ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

Kump, L. R., Kasting, J. F. and R. G., Crane. 1999. The earth system. *In* Geological Magazine; March 2000 No.2 p. 212-213.

Rukachaisirikul, V., Kaewbumrung, C., Phongpaichit, S. and Z., Hajiwangoh.2005. Eudesmane sesquiterpenes from the aquatic fungus *Beltrania rhombica*. Chem. Pharm. Bull. 53: 238-240.