ความหลากหลายของราบนซากใบพืชและการเป็นปฏิปักษ์ต่อการยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคพืช

Diversity of Leaf Litter Fungi and Antagonistic Effect to Inhibit Mycelial Growth of Plant Pathogenic Fungi

สุรีมาศ อัดทอง[1] พัชรวิภา ใจจักรคำ[1] และ อรอุมา เพียซ้าย[1,*]

Sureemart Atthong[1], Patcharavipa Chaijuckum[1] and Onuma Piasai[1,*]

[1] ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

[1] Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok 10900

รับเรื่อง: 3 พฤศจิกายน 2563 Received: 3 November 2020

ปรับแก้ไข: 7 ธันวาคม 2563 Revised: 7 December 2020

รับตีพิมพ์: 15 ธันวาคม 2563 Accepted: 15 December 2020

* Corresponding author: agromj@ku.ac.th

ABSTRACT: Fungal organisms are important players in the ecosystem. Fungal decomposers isolated from leaf litters may exhibit antagonistic interactions which can influence the growth of other microorganisms. Thus, the present study was aimed to obtaining information on the diversity of microfungi associated with leaf litter and to test the antagonistic activity against some plant pathogenic fungi *in vitro.* Sixteen samples of leaf litter were collected from eight provinces from August 2018 to June 2019. Moist chamber method was used for fungal isolation. Identification of the fungal isolates was based on morphological characteristics. Seventy-six isolates comprising 20 genera and 27 species of microfungi were found. *Aspergillus* spp. was the most common species, followed by *Colletotrichum* spp., *Fusarium* spp. and *Pestalotiopsis* spp. Six species of leaf litter fungi including *Beltrania rhombica*, *Chaetomium crispatum*, *Ellisiopsis gallesiae*, *Emericella variecolor*, *Robillarda roystoneae* and *Spegazzinia tessarthra* were selected for antagonistic activity tests as dual culture with 8 plant pathogenic fungi including *Colletotrichum gloeosporiosdes*, *Curvularia lunata*, *Fusarium solani*, *Phytophthora nicotianae*, *P. palmivora*, *P. parasitica*, *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*. The results revealed that *B. rhombica* isolated from rose apple leaf litter inhibited 74.37% on the mycelial growth of *P. parasitica* and also inhibited *P. palmivora* and *P. nicotianae* at 71.78% and 71.60%, respectively. Meanwhile, *C. crispatum* from mango leaf litter, *E. variecolor* from rose apple leaf litter and *R. roystoneae* from jack fruit leaf litter inhibited mycelial growth of *P. palmivora* at 71.41%, 71.78% and 72.11%, respectively.

Keywords: Microfungi, diversity, leaf litter, antagonistic fungi, plant pathogenic fungi

Agricultural Sci. J. (2020) Vol. 51(2): 107–121 ว. วิทย. กษ. (2563) 51(2): 107–121

บทคัดย่อ

ราเป็นจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญในระบบนิเวศ ราผู้ย่อยสลายที่เจริญบนซากใบพืชอาจมีบทบาทต่อการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายของชนิดราที่เจริญบนซากใบพืชและทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ต่อราสาเหตุโรคพืชในสภาพห้องปฏิบัติการ โดยเก็บตัวอย่างซากใบพืชที่ร่วงหล่น จำนวน 16 ตัวอย่าง จาก 8 จังหวัด ระหว่างเดือนสิงหาคม 2561 ถึง เดือนมิถุนายน 2562 แยกราโดยวิธี moist chamber และจัดจำแนกชนิดโดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยา พบราจำนวน 76 ไอโซเลท จำแนกเป็น 20 สกุล 27 ชนิด ราที่พบมากที่สุด คือ *Aspergillus* spp. รองลงมาคือ *Colletotrichum* spp., *Fusarium* spp. และ *Pestalotiopsis* spp. คัดเลือกราจากซากใบพืชจำนวน 6 ชนิด ได้แก่ *Beltrania rhombica*, *Chaetomium crispatum*, *Ellisiopsis gallesiae*, *Emericella variecolor*, *Robillarda roystoneae* และ *Spegazzinia tessarthra* นำมาทดสอบการเป็นปฏิปักษ์โดยวิธี dual culture ต่อราสาเหตุโรคพืช 8 ชนิด ได้แก่ *Colletotrichum gloeosporiosdes*, *Curvularia lunata*, *Fusarium solani*, *Phytophthora nicotianae*, *P. palmivora*, *P. parasitica*, *Rhizoctonia solani* และ *Sclerotium rolfsii* พบว่า รา *B. rhombica* ที่แยกได้จากใบชมพู่ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา *P. parasitica* ได้ ร้อยละ 74.37 และยังสามารถยับยั้งรา *P. palmivora* และ *P. nicotianae* ได้ร้อยละ 71.78 และ ร้อยละ 71.60 ตามลำดับ ในขณะที่ รา *C. crispatum* ที่แยกได้จากใบมะม่วง *E. variecolor* แยกได้จากใบชมพู่ และ *R. roystoneae* แยกได้จากใบขนุน มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา *P. palmivora* ได้ร้อยละ 71.41, 71.78 และ 72.11 ตามลำดับ

คำสำคัญ: รา, ความหลากหลาย, ซากใบพืช, รา ปฏิปักษ์, ราโรคพืช

บทนำ

ราที่เจริญบนซากใบพืช (Leaf litter fungi) จัดเป็นจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญในระบบนิเวศมีบทบาทเป็นผู้ย่อยสลายเศษซากพืชและอินทรียวัตถุต่าง ๆ ทำให้ดินมีความอุดมสมบูรณ์เหมาะแก่การเพาะปลูกพืช (Domsch *et al*., 1993; Duong *et al*., 2004; Song and Soytong, 2017) ความหลากหลายของชนิดและปริมาณของราที่พบบนซากใบพืช ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง ได้แก่ ชนิดพืช สภาพภูมิอากาศ รวมถึงวิธีการที่ใช้ในการแยกรา (Bills and Polishook, 1994) ราที่เจริญบนซากใบพืชหลายชนิดมีประสิทธิภาพในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและเอนไซม์หลายชนิด (Duong *et al*., 2004) ตัวอย่างราที่เจริญบนซากใบพืช เช่น รา *Volutella* sp. มีรายงานพบบนซากใบไผ่ สามารถย่อยสลายแป้งได้ รา *Candida albicans* และ *Memnoniella echinata* พบเจริญบนใบกล้วยและใบกล้วยไม้ สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้ (Domsch *et al*., 1993) ราจากซากใบพืชส่วนใหญ่เป็นราในกลุ่ม Hyphomycetes สร้างสปอร์เรียกว่า โคนิเดียม (Conidium) ที่มีลักษณะแตกต่างกัน Manoch *et al*. (2006) พบราจากซากใบพืชที่น่าสนใจหลายชนิด โดยรายงานว่า รา *Chaetomium cupreum*, *Gilmaniella humicola*, *Helicosporium* sp., *Memmaria echinobotryoides*, *Scytalidium lignicola*, *Trichoderma hamatum, T. harzianum*, *Volutella* sp. และ *Wiesneriomyces* sp. สร้างเอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase) ที่มีศักยภาพสามารถนำไปพัฒนาเป็นปุ๋ยชีวภาพได้ นอกจากนี้ Nikonov *et al*. (2007) รายงานว่า พบรา *Alternaria alternata* และ *Curvularia geniculata* มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์แลคแคส (Laccase) สามารถย่อยสลายลิกนิน และฮิวมัสให้เป็นดินที่อุดมสมบูรณ์เหมาะแก่การปลูกพืช นอกจากนี้ ราที่เจริญบนซากใบพืชบางชนิดยังมีความสามารถในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในพืช เช่น *Trichoderma harzianum*, *T. viride* และ *T. virens* โดยมีรายงานการนำมาใช้

ควบคุมราสาเหตุโรคพืชที่สำคัญหลายชนิด เช่น *Phytophthora* spp., *Pythium* spp. และ *Sclerotium rolfsii* (Kaewchai, 1997; Chamswarng *et al*., 2001) เป็นต้น ดังนั้น การศึกษาราที่เจริญบนซากใบพืชจะช่วยทำให้ได้ข้อมูลชนิดและรวบรวมสายพันธุ์รา ซึ่งเป็นทรัพยากรจุลินทรีย์ในธรรมชาติที่สำคัญอีกแหล่งหนึ่ง และการคัดเลือกสายพันธุ์ราเพื่อนำมาทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ต่อราสาเหตุโรคพืชจะเป็นข้อมูลในการศึกษาต่อยอดในการใช้ประโยชน์จากเชื้อราเพื่อควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีต่อไปในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างซากใบพืชจำนวน 16 ตัวอย่าง จากพืช 9 ชนิด ได้แก่ ขนุน ชมพู่ จำปี กระดังงา มะม่วง ปาล์ม ยาง น้อยหน่า และกล้วยไม้ จากสถานที่ต่าง ๆ รวม 8 จังหวัด ได้แก่ กรุงเทพมหานคร นครสวรรค์ บุรีรัมย์ ปทุมธานี พระนครศรีอยุธยา ราชบุรี ร้อยเอ็ด และสุราษฎร์ธานี ระหว่างเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2561 ถึงเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2562 บันทึกข้อมูลตัวอย่าง และนำมาแยกราในห้องปฏิบัติการ

การแยกและจำแนกชนิดรา

การแยกราด้วยวิธี moist chamber (Manoch *et al*., 2006) โดยนำตัวอย่างซากใบพืชวางในภาชนะใสที่มีฝาปิด ให้ความชื้น และนำไปวางในบริเวณที่มีแสงแดดส่อง บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 องศาเซลเซียส) สังเกตการเจริญของราภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo บันทึกลักษณะของราที่พบและแยกราให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ โดยใช้เข็มเขี่ยที่ลนไฟฆ่าเชื้อ ย้ายโครงสร้างของรานำไปเลี้ยงบนอาหาร half strength potato dextrose agar (1/2 PDA) ที่ผสมปฏิชีวนะสารสเตรปโตมัยซิน (Streptomycin) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3–5 วัน จากนั้น ใช้เข็มเขี่ยที่ลนไฟฆ่าเชื้อย้ายราไปเลี้ยงบนอาหาร PDA เพื่อให้ได้สายพันธุ์ราบริสุทธิ์ จัดจำแนกชนิดราโดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo และศึกษาการเจริญของราบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ ได้แก่ carnation leaf–piece agar (CLA) และ corn meal agar (CMA) หลังจากบ่มไว้เป็นเวลา 7–14 วัน วัดขนาดและบันทึกลักษณะของโคโลนี การสร้างเม็ดสี (Pigment) ศึกษาลักษณะโครงสร้างของส่วนขยายพันธุ์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound เปรียบเทียบข้อมูลกับเอกสารอ้างอิง (Ellis, 1971; 1976; Domsch *et al*., 1993; Seifert *et al*., 2011) คำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ความถี่ของราที่พบ (Frequency of occurrence percent, FO%) โดยใช้สูตร (จำนวนราแต่ละชนิดที่พบ/จำนวนชนิดราทั้งหมด) x 100 (Su–Han *et al*., 2019)

การทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ของราจากซากใบพืชในการยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคพืช

คัดเลือกราจากซากใบพืช โดยพิจารณาจากการเจริญอย่างรวดเร็วสามารถสร้างเส้นใยเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อภายในเวลา 5 วัน และเป็นราที่มีรายงานการสร้างเอนไซม์หรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เพื่อนำมาใช้ในการทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ต่อราสาเหตุโรคพืช 8 ชนิด (Table 1) โดยเลี้ยงราบนอาหาร PDA เป็นระยะเวลา 7 วัน จากนั้น ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะชิ้นวุ้นบริเวณปลายเส้นใยของราที่ใช้ทดสอบ ใช้เข็มเขี่ยที่ลนไฟแล้วย้ายชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยไปวางบนอาหาร PDA ให้ห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 เซนติเมตร ในลักษณะตรงข้ามกัน (Dual culture) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 14 วัน ทำการทดลอง 5 ซ้ำ สังเกตการเจริญของราและวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราสาเหตุโรคพืช หน่วยเป็นเซนติเมตร คำนวณค่าการยับยั้ง (% Inhibition) โดยใช้สูตร $[(A_0-A_i)/A_0] \times 100$ โดยให้ A_0 คือ เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของราสาเหตุโรคพืชในชุดควบคุม (Control) และ A_i คือ เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของราสาเหตุโรคพืชในจานอาหารทดสอบ (Piasai and Sudsanguan, 2018)

Table 1 Species of plant pathogenic fungi

Plant pathogenic fungi	Disease	Host
Colletotrichum gloeosporioides	Anthracnose	Mango (*Mangifera indica*)
Curvularia lunata	Dirty panicle	Rice (*Oryza sativa*)
Fusarium solani	Wilt	Cucumber (*Cucumis sativus*)
Phytophthora nicotianae	Root rot	Pineapple (*Ananas comosus*)
Phytophthora palmivora	Root rot	Durian (*Durio zibethinus*)
Phytophthora parasitica	Root rot	Orange (*Citrus reticulata*)
Rhizoctonia solani	Sheath blight	Rice (*Oryza sativa*)
Sclerotium rolfsii	Tuber rot	Potato (*Solanum tuberosum*)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (Analysis of variance, ANOVA) ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ Completely randomized design (CRD) และเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มข้อมูลโดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ผลการทดลองและวิจารณ์

ความหลากหลายของราบนซากใบพืช

พบราจำนวน 76 ไอโซเลท จำแนกได้ 20 สกุล (Genera) 27 ชนิด (Species) โดยมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแสดงใน Table 2 ราที่พบมากที่สุดได้แก่ *Aspergillus* spp. รองลงมาได้แก่ *Colletotrichum* spp., *Fusarium* spp., *Pestalotiopsis* spp., *Rhizopus stolonifer*, *Penicillium* spp., *Curvularia* spp., *Alternaria alternata* ส่วนราที่พบเพียง 1 ไอโซเลต ได้แก่ *Beltrania rhombica*, *Chaetomium crispatum*, *Cladosporium cladosporioides*, *Ellisiopsis gallesiae*, *Emericella variecolor*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Monodictys fluctuata*, *Nigrospora oryzae*, *Robillarda roystoneae* และ *Spegazzinia tessarthra* (Figure 1 และ Table 3)

Table 2 Morphological characteristics of leaf litter fungi cultivated on PDA at 14 days

No.	Leaf litter fungi	Colony		Conidia		
		Color	Diam (cm)	Color	Shape	Size (µm)
1	*Alternaria alternata*	gray	8.5–9.0	brown–dark brown	obclavate	9.27–15.23 × 20.63–59.31
2	*Aspergillus flavus*	green	5.5–6.5	colorless	globose	4.1–5.3
3	*A. japonicus*	brown–dark brown	6.5–7.5	pale brown	globose	2.8–3.9
4	*A. niger*	black	6.5–7.0	dark brown	globose	2.5–4.2
5	*A. terreus*	pale yellow–brown	3.8–4.2	pale yellow	globose	1.8–2.6
6	*Beltrania rhombica*	brown–black	8.5–9.0	colorless	biconic appendiculate	15.33–29.79 × 7.22–14.11
7	*Chaetomium crispatum*	brown–black	8.5–9.0	colorless	cylindical	9–12 × 6–9.5
8	*Cladosporium cladosporioides*	brown–green	5.0–6.0	colorless–brown	ellipsoid	2.49–5.26 × 3.47–11.53
9	*Colletotrichum gloeosporioides*	white–gray	8.5–9.0	colorless	clavate	3.48–5.72 × 13–16.73
10	*C. circinans*	white	9.0	colorless	fusiform	3.20–4.23 × 20.15–24.28
11	*Colletotrichum* sp.	brown–gray	9.0	colorless	clavate	3.19–4.95 × 9.74–13.6
12	*Curvularia lunata*	dark black	8.5–9.0	dark brown–black	ellipsoidal	18.23–30.14 × 8.98–15.11
13	*C. pallescens*	brown–green	8.5–9.0	brown	clavate–ovoid	17.23–31.14 × 7.98–12.11
14	*Ellisiopsis gallesiae*	white–gray	8.5–9.0	colorless–green	smooth, lageniform	17.23–26.14 × 7.98–4.53
15	*Emericella variecolor*	green	8.5–9.0	purple red	lobe	6.8–9.6 × 9.6–11.5
16	*Fusarium semitectum*	white	8.5–9.0	colorless	pyriform	2.39–4.2 × 9.75–17.69
17	*F. solani*	cream–pale yellow	8.5–9.0	colorless	cylinder	3.2–5.83 × 25.33–36.27
18	*F. oxysporum*	cream–purple	8.5–9.0	colorless	fusiform	3.23–4.46 × 35.76–60.13
19	*Lasiodiplodia theobromae*	dark black	8.5–9.0	colorless–black	obovoid	22–24 ×11–13
20	*Memnoniella echinata*	pale yellow	2.0–2.5	brown	globose	3.22–5.5
21	*Monodictys fluctuata*	gray–dark gray	8.5–9.0	brown–dark brown	irregular	20.67–41.99
22	*Nigrospora oryzae*	gray–brown	8.5–9.0	black	globose	11.92–13.83
23	*Penicillium* sp. 1	white–gray	2.5–3.5	colorless	globose	4.5–6.5 × 3–4
24	*Penicillium* sp. 2	white–green	3.5–3.0	colorless	globose	1.9–3.5
25	*Pestalotiopsis uvicola*	white–cream	8.5–9.0	brown	fusiform–ellipsoid	5.53–7.18 × 18.24–24.43
26	*P. clavata*	white–brown	8.5–9.0	brown	fusiform-ellipsoid	3.99–5.01 × 16.56–22.48
27	*Pithomyces maydicus*	brown–dark brown	8.5–9.0	brown–dark brown	obovoid	13.46–19.37 × 7.68–12.37
28	*Rhizopus stolonifer*	white–gray	9.0	brown	globose–obovoid	6–9.7 × 3.4–4.9
29	*Robillarda roystoneae*	white–pale brown	8.5–9.0	colorless	fusiform	2.17–3.43 × 9.88–13.61
30	*Spegazzinia tessarthra*	white–gray	8.5–9.0	brown	obovoid, oblong	4–8 × 12.54–18.56

Table 3 Occurrence of fungal species on different leaf letter collected from various locations using moist chamber method

No.	Leaf litter fungi	Class[1]	No. of leaf litter fungi and FO%						
			I[2]					II	
			L01[3]	L02	L03	L04	L05	L06	L10
1	*Alternaria alternata*	H	-	-	-	-	-	-	-
2	*Aspergillus flavus*	H	1 (1.28)	-	-	-	-	-	-
3	*A. japonicus*	H	-	-	-	-	-	-	-
4	*A. niger*	H	-	1 (1.28)	1 (1.28)	-	1 (1.28)	1 (1.28)	1 (1.28)
5	*A. terreus*	H	-	-	-	-	-	-	-
6	*Beltrania rhombica*	H	-	1 (1.28)	-	-	-	-	-
7	*Chaetomium crispatum*	A	-	-	-	-	-	-	-
8	*Cladosporium cladosporioides*	H	-	-	-	-	-	1 (1.28)	-
9	*Colletotrichum gloeosporioides*	C	1 (1.28)	1 (1.28)	-	1 (1.28)	1 (1.28)	1 (1.28)	1 (1.28)
10	*C. circinans*	C	-	-	-	-	-	-	-
11	*Colletotrichum* sp.	C	-	-	-	-	-	1 (1.28)	-
12	*Curvularia lunata*	H	-	-	-	-	1 (1.28)	-	-
13	*C. pallescens*	H	-	-	-	-	-	-	-
14	*Ellisiopsis gallesiae*	H	-	-	-	-	1 (1.28)	-	-
15	*Emericella variecolor*	A	-	-	-	-	-	-	-
16	*F. semitectum*	H	-	1 (1.28)	1 (1.28)	-	-	-	-
17	*Fusarium solani*	H	-	-	1 (1.28)	1 (1.28)	1 (1.28)	-	-
18	*F. oxysporum*	H	-	-	-	-	-	-	-
19	*Lasiodiplodia theobromae*	A	-	-	-	-	-	-	-
20	*Memnoniella echinata*	H	-	-	-	-	-	-	-
21	*Monodictys fluctuata*	H	-	-	-	-	-	-	-
22	*Nigrospora oryzae*	H	-	-	-	-	-	-	-
23	*Penicillium* sp. 1	H	-	-	-	-	-	-	-

III		IV	V	VI		VII		VIII	Overall (FO%)
L07	L08	L09	L11	L12	L13	L14	L15	L16	
-	-	1 (1.28)	1 (1.28)	-	-	-	1 (1.28)	-	3 (3.85)
-	-	-	-	-	-	-	-	-	1 (1.28)
-	-	-	1 (1.28)	-	-	-	-	-	1 (1.28)
1 (1.28)	1 (1.28)	-	1 (1.28)	-	-	1 (1.28)	1 (1.28)	1 (1.28)	11 (14.10)
-	-	-	1 (1.28)	-	-	-	-	-	1 (1.28)
-	-	-	-	-	-	-	-	-	1 (1.28)
-	-	-	-	-	-	1 (1.28)	-	-	1 (1.28)
-	-	-	-	-	-	-	-	-	1 (1.28)
-	1 (1.28)	-	1 (1.28)	1 (1.28)	-	1 (1.28)	1 (1.28)	-	11 (14.10)
-	-	-	-	-	-	-	-	1 (1.28)	1 (1.28)
-	-	-	-	-	-	-	-	-	1 (1.28)
-	-	-	1 (1.28)	-	-	-	-	-	2 (2.56)
-	-	-		1 (1.28)	1 (1.28)	-	-	-	2 (2.56)
-	-	-	-	-	-	-	-	-	1 (1.28)
-	-	-	-	-	-	-	1 (1.28)	-	1 (1.28)
-	-	1 (1.28)	1 (1.28)	-	1 (1.28)	1 (1.28)	-	-	6 (7.69)
-	-	-	-	-	-	1 (1.28)	-	-	4 (5.13)
-	-	1 (1.28)	-	-	-	-	-	-	1 (1.28)
-	-	-	-	-	1 (1.28)	-	-	-	1 (1.28)
-	-	-	-	-	-	-	1 (1.28)	-	1 (1.28)
-	-	-	-	-	-	-	1 (1.28)	-	1 (1.28)
-	-	1 (1.28)	-	-	-	-	-	-	1 (1.28)
1 (1.28)	-	-	1 (1.28)	-	-	-	-	-	2 (2.56)

Table 3 Continued.

No.	Leaf litter fungi	Class[1]	No. of leaf litter fungi and FO%						
			I[2]					II	
			L01[3]	L02	L03	L04	L05	L06	L10
24	*Penicillium* sp. 2	H	-	-	-	-	-	1 (1.28)	-
25	*Pestalotiopsis uvicola*	H	1 (1.28)	1 (1.28)	1 (1.28)	1 (1.28)	1 (1.28)	1 (1.28)	-
26	*P. clavata*	H	-	-	-	-	-	-	-
27	*Pithomyces maydicus*	H	-	-	-	-	-	-	-
28	*Rhizopus stolonifer*	Z	1 (1.28)	1 (1.28)	-	-	-	1 (1.28)	1 (1.28)
29	*Robillarda roystoneae*	H	-	-	-	-	-	-	1 (1.28)
30	*Spegazzinia tessarthra*	H	-	-	-	-	-	-	-
	Total of fungal isolate		4	6	4	3	6	7	4
	Overall FO%		5.13	7.69	5.13	3.85	7.69	8.97	5.13

[1] Class: A = Ascomycetes, C = Coelomycetes, H = Hyphomycetes and Z = Zygomycetes

[2] Province: I = Pathum Thani, II = Phra Nakhon Si Ayutthaya, III = Surat Thani, IV = Ratchaburi, V = Bangkok, VI = Roi Et, VII = Nakhon Sawan and VIII = Buriram

[3] Host: L01, L06, L08, L10 = jack fruit (*Artocarpus heterophyllus*), L02, L15 = rose apple (*Syzygium jambos*), L03 = ylang ylang (*Cananga odorata*), L04 = champace (*Michelia champaca*), L05, L07, L12, L14 = mango (*Mangifera indica*), L09 = orchid (*Dendrobium hybrid*), L11 = palm (*Phoenix roebelenii*), L13 = rubber (*Hevea brasiliensis*) and L16 = custard apple (*Annona squamosa*)

III		IV	V	VI		VII		VIII	Overall (FO%)
L07	L08	L09	L11	L12	L13	L14	L15	L16	
-	-	-	1 (1.28)	1 (1.28)	-	-	-	-	3 (3.85)
-	1 (1.28)	-	-	1 (1.28)	-	1 (1.28)	-	-	9 (11.54)
-	-	-	-	-	1 (1.28)	-	-	-	1 (1.28)
-	-	-	-	-	-	1 (1.28)	-	-	1 (1.28)
-	-	-	1 (1.28)	-	-	-	1 (1.28)	-	6 (7.69)
-	-	-	-	-	-	-	-	-	1 (1.28)
		-	-		1 (1.28)	-	-	-	1 (1.28)
2	3	4	10	4	5	7	7	2	78
2.56	3.85	5.13	12.86	5.13	6.41	8.97	8.97	2.56	100

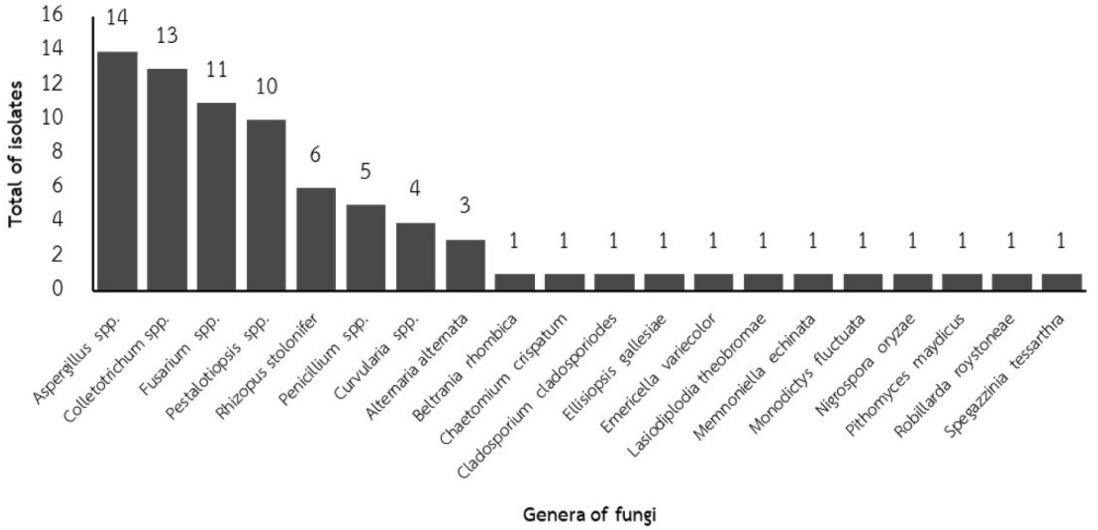

Figure 1 Total isolate of each genera of leaf litter fungi

ราที่พบส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่มรา Hyphomycetes (13 สกุล 18 ชนิด) รองลงมา ได้แก่ Coelomycetes (4 สกุล 6 ชนิด) Ascomycetes (2 สกุล 2 ชนิด) และ Zygomycetes (1 ชนิด) (Table 1) ผลการทดลองพบว่า กลุ่มของราที่พบจากการศึกษาครั้งนี้มีความสอดคล้องกับรายงานของ Manoch *et al*. (2006) ที่พบราบนซากใบพืช จำนวน 39 สกุล 44 ชนิด โดยพบราในกลุ่ม Hyphomycetes มากที่สุด จำนวน 26 สกุล 31 ชนิด รองลงมา คือ กลุ่ม Coelomycetes จำนวน 8 สกุล และรา Ascomcetes 5 สกุล Manoch *et al*. (2006) ยังได้รายงานพบรา *E. gallesiae* บนซากใบขนุน จังหวัดอ่างทอง รา *M. echinata* บนใบกล้วยและใบกล้วยไม้ และรา *B. rhombica* บนใบมะม่วง จังหวัดสงขลา ในขณะที่การศึกษาครั้งนี้พบรา *B. rhombica* บนใบชมพู่ และรา *E. gallesiae* บนใบมะม่วง ที่เก็บตัวอย่างจากจังหวัดปทุมธานี ส่วนรา *Memnoniella echinata* พบบนใบมะม่วง จากจังหวัดนครสวรรค์ นอกจากนี้ ผลการทดลองยังพบรา *C. cladosporioides* บนใบขนุน จากจังหวัดพระนครศรีอยุธยา ซึ่ง Tokumasu *et al*. (1997) เคยรายงานราชนิดนี้จากซากใบพืชที่เก็บตัวอย่างจากภาคเหนือของประเทศไทย ส่วนรา *S. tessarthra* พบบนใบยางพารา จังหวัดร้อยเอ็ด ซึ่งรา *S. tessarthra* เคยมีรายงานพบบนซากใบอ้อย จังหวัดเชียงใหม่ (Bhilabutra *et al*., 2010) ในต่างประเทศมีการรายงานความหลากหลายของรา *Cylindrosympodium* sp., *Dictyochaeta* sp., *Idriella* sp., *Pestalotiopsis* sp. และ *Phomopsis* sp. จากเศษซากต้นพืชตระกูลอบเชย (*Neolitsea dealbata*) ในป่าของประเทศออสเตรเลีย (Paulus *et al*., 2007) และรา *Memnoniella subsimplex* พบบนใบกล้วย (Photita *et al*., 2001) ดังนั้นจะเห็นได้ว่า ราที่เจริญบนซากใบพืชเป็นกลุ่มราที่มีความหลากหลายอีกกลุ่มหนึ่งในระบบนิเวศ ชนิดของราที่มีรายงานการสำรวจพบมีความใกล้เคียงกัน แต่จะต่างกันที่ชนิดของซากใบพืชและแหล่งที่พบ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Duong *et al*. (2004) ที่ได้รวบรวมชนิดของราที่พบบนซากใบพืชที่เคยมีรายงานมาก่อนโดยส่วนใหญ่เป็นรากลุ่ม Hyphomycetes และจากการศึกษาครั้งนี้พบชนิดของราที่เหมือนกันได้แก่ *Aspergillus* spp., *B. rhombica*, *C. cladosporioides*, *Colletotrichum* spp., *F. solani*, *Fusarium* spp. และ *Penicillium* spp.

จากผลการศึกษาข้างต้นได้ทำการคัดเลือกราที่น่าสนใจซึ่งเป็นราที่มีการเจริญอย่างรวดเร็วสามารถสร้างเส้นใยเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อภายในเวลา 5 วัน และมีรายงานการสร้างสารเอนไซม์หรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Domsch *et al*., 1993; Seifert *et al*., 2011) จำนวน 6 ชนิด ได้แก่ *B. rhombica* (Figures 2A–2C), *C. crispatum* (Figures 2D–2E), *E. gallesiae* (Figures 2F–2H), *E. variecolor* (Figures 2I–2J), *R. roystoneae* (Figures 2K–2M) และ *S. tessarthra* (Figures 2N–2O) เพื่อนำมาใช้ในการทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ต่อราสาเหตุโรคพืชในห้องปฏิบัติการ

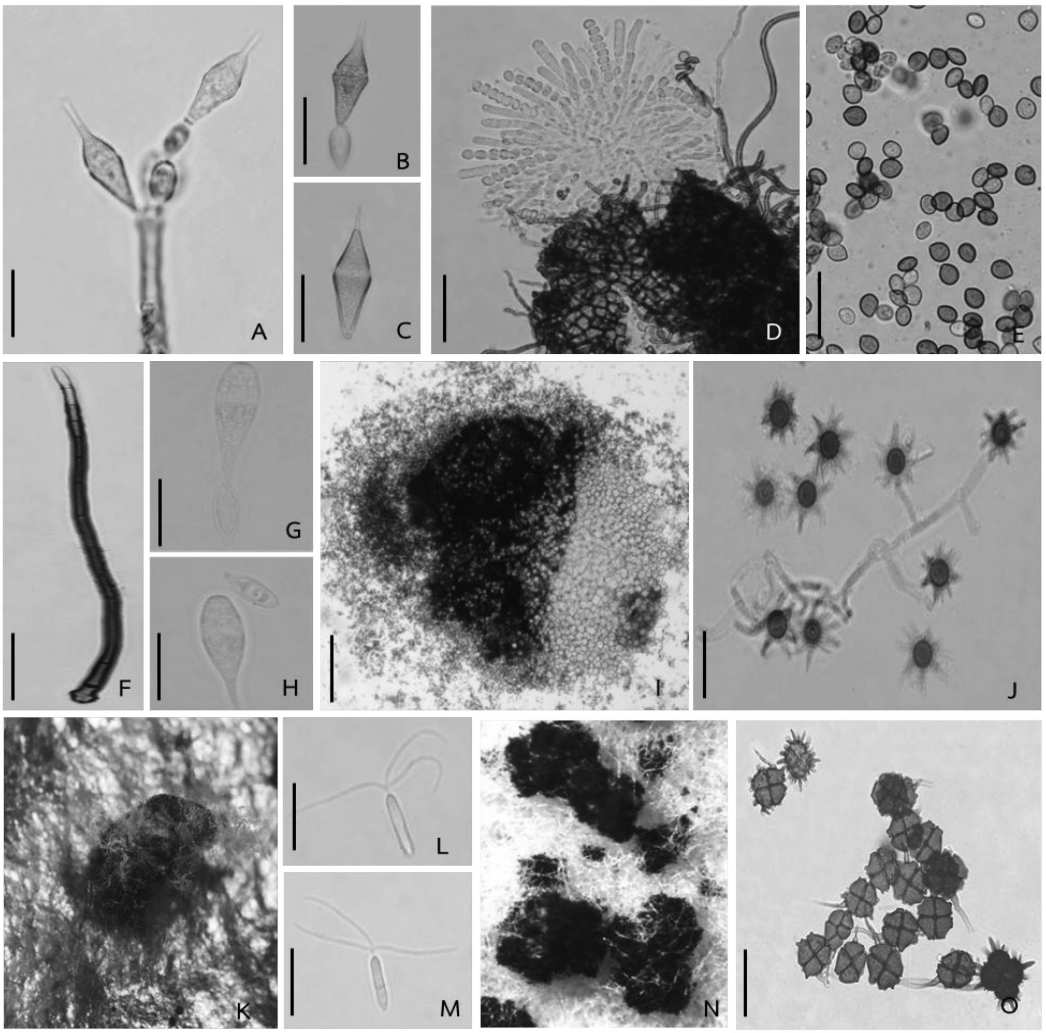

Figure 2 Microscopic characteristic of representative fungal isolate used for antagonistic activity tests. *Beltrania rhombica* (A–C); *Chaetomium crispatum* (D, E); *Ellisiopsis gallesiae* (F–H); *Emericella variecolor* (I, J); *Robillarda roystoneae* (K–M) และ *Spegazzinia tessarthra* (N, O) Scale bars: A–D, F, J = 10 µm; E, G–H, L–O = 5 µm; I = 20 µm

การทดสอบประสิทธิภาพของราในการยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคพืช

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของราที่แยกได้จากซากใบพืชในการยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคพืชโดยวิธี dual culture ในห้องปฏิบัติการ พบว่า รา *B. rhombica* ที่แยกได้จากใบชมพู่ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา *Phytophthora* spp. ได้แก่ *P. nicotianae*, *P. palmivora* และ *P. parasitica* ได้มากกว่า ร้อยละ 70 โดยมีค่าการยับยั้งรา *P. parasitica* สูงที่สุดร้อยละ 74.37 (Table 2) ทั้งนี้ มีรายงานพบว่า รา *B. rhombica* สามารถสร้างสารในกลุ่ม sesquiterpenes ได้แก่ (–)–β-eudesmol, (–)–pterocarpol, (–)–chrysanthemol, (–)–longilobol และ (–)–5– β–hydroxy eudesmol ที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* และรา *Candida albicans* ได้ (Rukachaisirikul *et al*., 2005) นอกจากนี้ รา *C. crispatum* ที่แยกได้จากใบมะม่วง *E. variecolor* แยกได้จากใบชมพู่ และ *R. roystoneae* แยกได้จากใบขนุน ยังมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา *P. palmivora* ได้ร้อยละ 71.41, 71.78 และ 72.11 ตามลำดับ สอดคล้องกับรายงานการศึกษาการใช้ประโยชน์จากรา *Chaetomium* spp. ในการยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคพืชหลายชนิด เช่น *P. palmivora* (Phung *et al*., 2015) *C. capsici* และ *Sclerotium rolfsii* (Sultana *et al*., 2012) เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบว่า รา *E. variecolor* และ *S. tessarthra* สามารถยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคพืชที่นำมาทดสอบได้โดยมีร้อยละค่าการยับยั้งระหว่าง 32.11–51.67 และ 30.37–43.15 ตามลำดับ และพบว่า ราจากเศษซากใบพืชทั้ง 6 ชนิด ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา *R. solani* และ *S. rolfsii* (Figure 3 และ Table 4)

Table 4 Efficacy of six isolates of leaf litter fungi to inhibit mycelial growth of eight plant pathogenic fungi in dual culture tests at 14 days

Plant pathogenic fungi	% Inhibition					
	B. rhombica	*C. crispatum*	*E. gallesiae*	*E. variecolor*	*R. roystoneae*	*S. tessarthra*
C. gloeosporioides	59.60 ± 0.17^{d}	32.04 ± 4.02^{d}	49.33 ± 0.11^{b}	32.11 ± 0.19^{d}	31.93 ± 0.06^{d}	30.37 ± 0.32^{e}
C. lunata	59.74 ± 0.28^{d}	38.33 ± 0.56^{c}	48.15 ± 1.70^{c}	32.52 ± 0.71^{d}	36.41 ± 2.66^{c}	30.78 ± 0.68^{e}
F. solani	65.15 ± 0.13^{c}	40.56 ± 0.56^{c}	46.56 ± 0.11^{d}	36.30 ± 0.32^{c}	33.89 ± 2.89^{cd}	36.48 ± 0.32^{d}
P. nicotianae	71.60 ± 0.06^{b}	46.34 ± 1.25^{b}	50.04 ± 0.17^{b}	50.96 ± 0.06^{b}	52.63 ± 2.73^{b}	38.52 ± 0.64^{b}
P. palmivora	71.78 ± 0.11^{b}	71.41 ± 0.28^{a}	71.78 ± 0.11^{a}	50.41 ± 0.39^{b}	72.11 ± 0.11^{a}	43.15 ± 0.32^{a}
P. parasitica	74.37 ± 1.86^{a}	46.85 ± 0.85^{b}	50.37 ± 0.64^{b}	51.67 ± 0.56^{a}	50.59 ± 0.50^{b}	37.59 ± 0.32^{c}
R. solani	0.00 ± 0.00^{e}	0.00 ± 0.00^{e}	0.00 ± 0.00^{e}	0.00 ± 0.00^{e}	0.00 ± 0.00^{e}	0.00 ± 0.00^{f}
S. rolfsii	0.00 ± 0.00^{e}	0.00 ± 0.00^{e}	0.00 ± 0.00^{e}	0.00 ± 0.00^{e}	0.00 ± 0.00^{e}	0.00 ± 0.00^{f}
F-test	*	*	*	*	*	*
C.V. (%)	0.63	0.70	0.65	0.67	0.73	0.64

Means within a column under each factor, means followed by a same letter are not significantly difference at the 95% level by DMRT

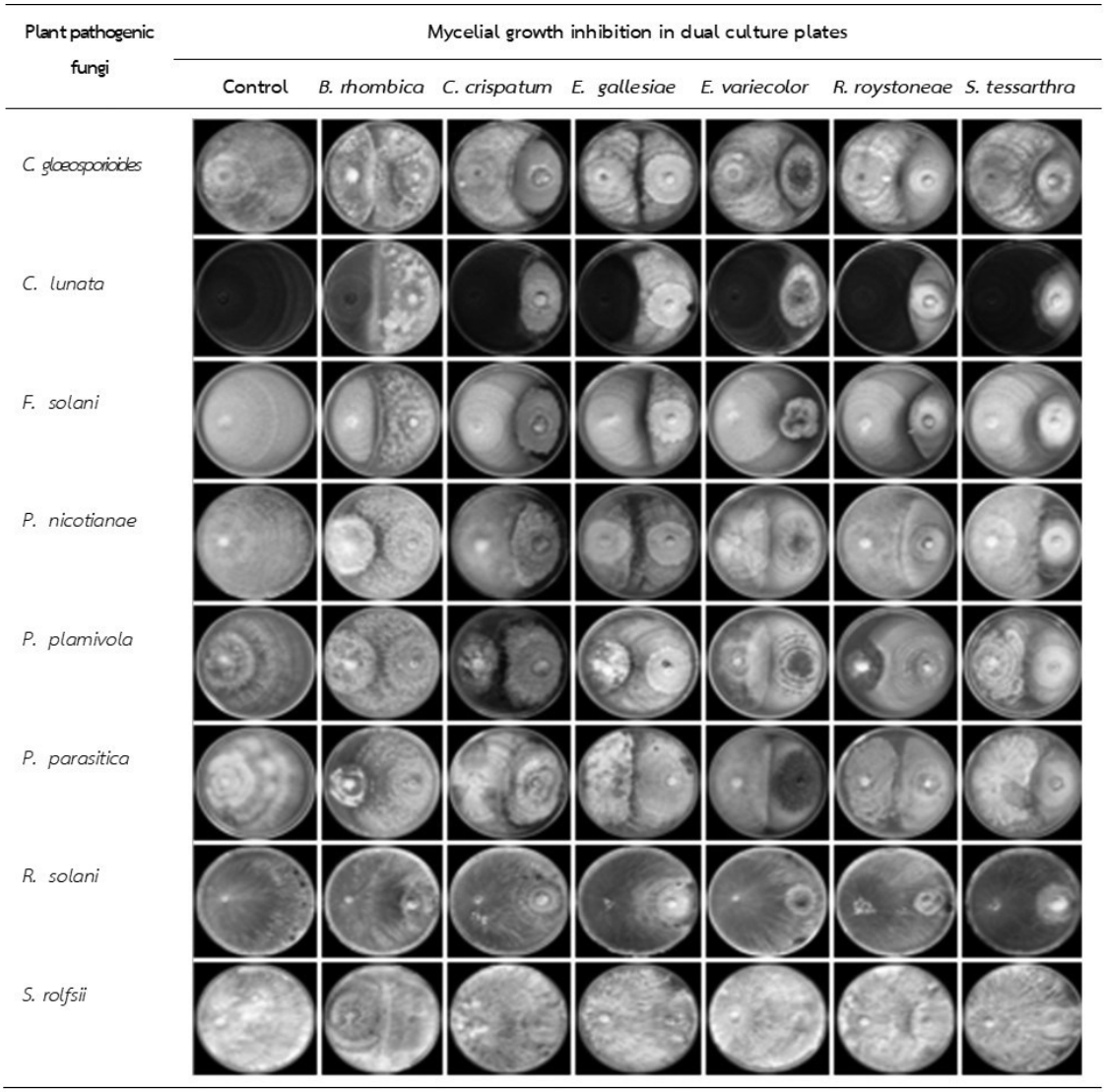

Figure 3 Antagonistic activity tests of six isolates of leaf litter fungi (right) against eight species of plant pathogenic fungi (left) cultivated as dual culture on PDA at 14 days

สรุป

พบราจากซากใบพืชจำนวน 76 ไอโซเลท จำแนกได้ 20 สกุล 27 ชนิด ราที่พบมากที่สุด คือ *Aspergillus* spp. รองลงมาคือ *Colletotrichum* spp., *Fusarium* spp. และ *Pestalotiopsis* spp. ผลการทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ต่อราสาเหตุโรคพืช พบว่า รา *B. rhombica* ที่แยกได้จากใบชมพู่ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา *P. parasitica*, *P. palmivora* และ *P. nicotianae* ได้ ร้อยละ 74.37, 71.78 และ 71.60 ตามลำดับ ในขณะที่ รา *C. crispatum* ที่แยกได้จากใบมะม่วง *E. variecolor* แยกได้จากใบชมพู่ และ *R. roystoneae* แยกได้จากใบขนุน มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา *P. palmivora* ได้ร้อยละ 71.41, 71.78 และ 72.11 ตามลำดับ ดังนั้น รา *B. rhombica*, *C. crispatum*, *E. variecolor* และ *R. roystoneae* ที่แยกได้จากซากใบพืชชนิดต่าง ๆ จากการศึกษาในครั้งนี้จึงเป็นราที่น่าสนใจในการนำมาศึกษาวิจัยต่อยอดเพื่อนำมาใช้ควบคุมโรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora* spp. โดยชีววิธีต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

Bhilabutra, W., E.H.C. Mckenzie, K.D. Hyde and S. Lumyong. 2010. Fungi on the grasses, *Thysanolaena latifolia* and *Saccharum spontaneum*, in northern Thailand. Mycosphere 1(4): 301–314.

Bills, G.F. and J.D. Polishook. 1994. Abundance and diversity of microfungi in leaf litter of a lowland rain forest in Costa Rica. Mycologia. 86: 187–198.

Chamswarng, J., W. Intanoo and T. Kumchang. 2001. Efficacy of various formulations of *Trichoderma harzianum* for controlling stem rot of yard long bean caused by *Sclerotium rolfsii*. *In* Proc. the 39th Kasetsart University Annual Conference, 5–7 February 2001. p.585. (in Thai)

Domsch, K.H., W. Gams and T.H. Anderson. 1993. Compendium of Soil Fungi. 1st and 2nd edition. Academic Press, London, UK.

Duong, L.M., S. Lumyong and K.D. Hyde. 2004. Terrestrial lignicolous fungi. pp. 163–171. *In* E.B.G. Jones, M. Tanticharoen and K.D. Hyde, eds. Thai Fungal Diversity. BIOTEC, Thailand.

Ellis, M.B. 1971. Dematiaceous Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England. 608 pp.

Ellis, M.B. 1976. More Dematiaceous Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England. 507 pp.

Kaewchai, S. 1997. Application of *Trichoderma* spp. for plant disease control. Princess of Naradhiwas University J. 3: 108–123. (in Thai)

Manoch, L., J. Kokaew, O. Jeamjitt and T. Dethoup. 2006. Leaf litter fungi and studies on antagonistic effect against plant pathogenic fungi *in vitro*. *In* Proc. the 44th Kasetsart University Annual Conference, 30 February – 2 January 2006. p.828. (in Thai)

Nikonov, L.N., Y.S. Osledkin and V.L. Safronova. 2007. The search of producers of laccase among filamentous fungi fungi from the all-Russia research institute for agricultural microbiology culture collection. pp. 198–199. *In* Proc. the XV Congress of European Mycologists. September 16–21, 2007. Petersburg, Russia.

Paulus, B.C., J. Kanowski, P.A. Gadek and K.D. Hyde. 2007. Diversity and distribution of saprobic microfungi in leaf litter of an Australian tropical rainforest. Mycol. Res. 110: 1441–1454.

Phung, M.C., W. Pongnak, K. Soytong and P. Supatta. 2015. Biological control of *Phytophthora palmivora* causing root rot of pomelo using *Chaetomium* spp. Mycobiology 43(1): 63–70.

Photita, W., S. Lumyong, P. Lumyong and K.D. Hyde. 2001. Endophytic fungi of wild banana (*Musa acuminata*) at Doi Suthep Pui National Park, Thailand. Mycol. Res. 105: 1508–1513.

Piasai, O. and M. Sudsanguan. 2018. Morphological study of *Gelasinospora* from dung and antagonistic effect against plant pathogenic fungi. Agr. Nat. Resour. 52: 407–411.

Rukachaisirikul, V., C. Kaewbumrung, S. Phongpaichi and Z. Hajiwangoh. 2005. Eudesmane sesquiterpenes from the aquatic fungus *Beltrania rhombica*. Chem. Pharm. Bull. 53(2): 238–240.

Seifert, K.A., G. Morgan-Jones, W. Gams and B. Kendrick. 2011. The Genera of Hyphomycetes. CBS Biodiversity Series 9. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands.

Song, J.J. and K. Soytong. 2017. *Chaetomium* spp. as biological fertilizer for plant growth. Int. J. Adv. Agr. Sci. Tech. 13(6): 941–951.

Su–Han, N.H., P. Songkumarn, S. Nuankaew, N. Boonyuen and O. Piasai. 2019. Diversity of sporulating rice endophytic fungi associated with Thai rice cultivars (*Oryza sativa* L.) cultivated in Suphanburi and Chainat provinces, Thailand. Curr. Res. Environ. Appl. Mycol. 9(1): 1–14.

Sultana, J.N., Z. Perven, H. Rahman and M.S. lslam. 2012. *In–vitro* evaluation of different strains of *Trichoderma harzianum* and *Chaetomium globosum* as biological control agents seedling mortality of chill. Bangladesh Res. Pub. J. 6(3): 305–310.

Tokumasu, S., K. Tubaki and L. Manoch. 1997. Microfungal communities on decaying pine needles in Thailand. pp. 93–106. *In* K.K. Janardhanan, K.R. Natarajan and D.L. Hawksworth, eds. Tropical Mycology. Science Publishers Inc, USA.