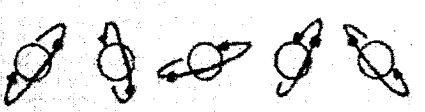
ภาคผนวก

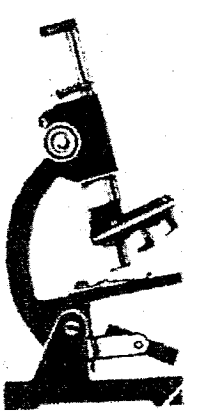
KASETSART JOURNAL
NATURAL SCIENCE

SSN 0075-5192

/olume 43 Number 5

ttp://www.rdi.ku.ac.th
ttp://kasetsartjournal.ku.ac.th/





The Publication of Kasetsart University

Published with the Financial Support of the Commission on Higher Education

Kasetsart J. (Nat. Sci.) 43 : 34 - 40 (2009)

Coprophilous Ascomycetes from Phu Luang Wildlife Sanctuary and Khao Yai National Park in Thailand

Onuma Piasai* and Leka Manoch

ABSTRACT

The diversity and distribution were studied in samples of dung fungi collected from four species of wildlife and domestic animals (barking deer, buffalo, cow and elephant) in the Khao Yai National Park, Nakhon Ratchasima province and the Phu Luang Wildlife Sanctuary, Loei province. Different isolation methods, such as the moist chamber, Warcup's direct plating, soil plate, dilution plate and heat and alcohol treatments were used. Identification of the fungal isolates was based on the morphological characteristics of colony growth on agar media, fruiting bodies and spore ornamentation using stereo, light and scanning electron microscopes. Forty-nine isolates of coprophilous Ascomycetes, comprising 16 genera and 20 species were found, including *Ascobolus*, *Cercophora*, *Chaetomium*, *Coprotus*, *Emericella*, *Eurotium*, *Eupenicillium*, *Gelasinospora*, *Hamigera*, *Neosartorya*, *Podospora*, *Saccobolus*, *Sordaria*, *Sporormiella*, *Talaromyces* and *Xylaria*. The isolation of *Podospora setosa* provided a new record of coprophilous Ascomycetes for Thailand.

Key words: diversity, distribution, taxonomy, coprophilous fungi, Ascomycetes

INTRODUCTION

Coprophilous Ascomycetes are commonly found on the dung of many herbivorous animals (Bell, 1983; 2005). Studies on the secondary metabolites of some coprophilous Ascomycetes, with potent antifungal and antibacterial activities, have been reported, such as *Podospora communis* and *P. pleiospora* (Che *et al.*, 2004; Kuwahara and Enomoto, 2005; Weber *et al.*, 2005). The diversity, distribution and decomposition of coprophilous Ascomycetes have been recorded in many countries (Nyberg and Persson, 2002; Elshafie, 2005; Masunga *et al.*, 2006; Richardson, 2001; 2008). In Thailand, Manoch *et al.* (1999) reported 19 coprophilous Ascomycetes from 12 dung samples from the Huay Kha Khang Wild Life Sanctuary, Uthai Thani province. Somrithipol (2004) summarized approximately 26 genera, including 36 species of coprophilous ascomycetes from the Khao Yai National Park, Nakhon Ratchasima province. Jeamjitt *et al.* (2007) recorded 12 genera and 15 species of coprophilous Ascomycetes, including *Ascobolus*, *Ascodesmis*, *Cercophora*, *Chaetomium*, *Emericella*, *Gelasinospora*, *Podosordaria*, *Podospora*, *Saccobolus*, *Sordaria*, *Sporormiella* and *Zopfiella* from the Huay Kha Khang Wild Life Sanctuary and the Khao Yai National Park in Thailand. It is very important to study coprophilous Ascomycetes in Thailand because these fungi are poorly known and only significant records have been detailed. Hence, more investigations on coprophilous Ascomycetes

Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand.
* Corresponding author, e-mail: agromj@ku.ac.th

need to be carried out in this tropical region for the discovery of new taxa.

The objectives of this research were to study: 1) the morphology of Ascomycetes found on various dung samples; and 2) the diversity and distribution of Ascomycetes associated with different dung types from the Khao Yai National Park, Nakhon Ratchasima province and the Phu Luang Wildlife Sanctuary, Loei province.

MATERIALS AND METHODS

Fifty-six dung samples from four animals (barking deer, buffalo, cow and elephant) were collected from the Khao Yai National Park, Nakhon Ratchasima province and the Phu Luang Wildlife Sanctuary, Loei province in Thailand. All samples were placed in a moist chamber near a window, where they were incubated for 2-7 d at 28°C. A direct isolation method was carried out from the dung surface under a stereomicroscope (SZ-PT Olympus). The ascomata were transferred directly onto water agar (WA), squashed to release the ascospores, which were incubated for 48 h. If the ascospores did not germinate, a fine needle was used to transfer the fruiting body with the remaining ascospores from WA, which were then placed in a test tube containing 60-80°C distilled water, 65% ethyl alcohol and 3% KOH for 30, 15 and 3-5 min respectively. The treated ascospores were spread on WA in a Petri dish and incubated for 12-24 h. A hyphal tip from a single spore was transferred to a slant of potato dextrose agar (PDA) and kept as pure culture in the Kasetsart University Fungal Collection (KUFC). Dry specimens of dung samples were kept in the herbarium at Kasetsart University (KUH). The soil plate, dilution plate, heat, alcohol treatments and Gochenaur's glucose ammonium nitrate agar (Gochenaur, 1964) (NH_4NO_3 1 g, K_2HPO_4 1 g, $MgSO_4.7H_2O$ 0.5 g, rose bengal 0.03 g, yeast extract 1 g, glucose 5 g, agar 15 g, streptomycin solution 4 ml, distilled water 1 l) as well as 2% malt extract agar were used to isolate the dung fungi. Macroscopic features were studied, including colony growth pattern, color and texture on different agar media. Microscopic characters were observed on a slide preparation using sterile distilled water, with lactophenol as the mounting medium and examined under a light microscope (Olympus BH-2 with Normaski Interference Contrast). Camera lucida drawings were employed. Photomicrographs of fungal structures were taken under stereo, light and scanning electron microscopes.

For the procedure for SEM photomicrographs (Sharples and Moss, 2000), ripened ascomata and ascospores of Eurotiales and Sphaeriales from dry culture agar media were transferred with a fine needle and placed onto double-stick Scotch tape on aluminum stubs. The specimens were coated with gold for 5-7 min and examined under a JEOL JSM 6400 scanning electron microscope (Manoch *et al.*, 2007).

RESULTS AND DISCUSSION

Using various methods, 49 isolates of coprophilous Ascomycetes were found from the 56 dung samples of four animal species from the Khao Yai National Park, Nakhon Ratchasima province and the Phu Luang Wildlife Sanctuary, Loei province. Sixteen genera and 20 species of coprophilous Ascomycetes were recorded, including 8 Pyrenomycetes (40%), 8 Plectomycetes (40%) and 4 Discomycetes (20 %) (Table 1). The moist chamber method yielded the highest number of coprophilous Ascomycetes (6 spp.), followed by the alcohol treatment (5 spp.), heat treatment (5 spp.), soil plate method (3 spp.) and dilution plate method (1 spp.). The results indicated that deer dung yielded the highest number of fungal species (14 spp.), followed by elephant (11 spp.), cow (5 spp.) and buffalo (3 spp.). All taxa were cultivated on PDA. The pure cultures were provided for maintenance in the culture collection at the Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kasetsart

University, Bangkok (KPFC) for further study.

Thirty-one isolates of coprophilous Ascomycetes comprising 12 genera and 14 species were found, comprised of: *Ascobolus albidus*, *Chaetomium globosum*, *Emericella nidulans*, *Eupenicillium parvum*, *Eupenicillium* sp., *Eurotium amstelodami*, *Hamigera avellanea*, *Neosartorya fischeri*, *Saccobolus glaber* (Figures 1E-F), *Sordaria fimicola* (Figure 1H), *Sporormiella minima*, *Talaromyces bacillisporus*, *T. flavus* and *Xylaria* from barking deer, elephant, cow and buffalo dung from the Khao Yai National Park. Dung samples from barking deer and elephant from the Phu Luang Wildlife Sanctuary showed fifteen isolates comprising 12 genera and 15 species, namely: *Cercophora* sp. (Figure 1G), *Coprotus* sp.1 (Figure 1A-B), *Coprotus* sp.2 (Figure 1C-D), *Chaetomium globosum* (Figure 2C-D), *Eupenicillium parvum*, *Eupenicillium* sp. *Eurotium amstelodami*, *Gelasinospora indica* (Figure 2G-H), *Gelasinospora* sp. (Figure 2E-F), *Hamigera avellanea*, *Neosartorya fischeri*, *Podospora setosa* (Figure 2A-B), *Sordaria fimicola*, *Sporormiella minima* and *Talaromyces flavus* (Table 1).

Table 1 Occurrence (%) of coprophilous ascomycetes species on different dung types (the number of samples is indicated in brackets #).

Fungal species	Number of fungal isolates						Total isolate
	Khao Yai National park				Phu Luang Wildlife sanctuary		
	Barking deer (12)#	Elephant (10)#	Cow (9)#	Buffalo (8)#	Barking deer (10)#	Elephant (7)#	
*Ascobolus albidus**	-	1	-	-	-	-	**1**
Cercophora sp.***	-	-	-	-	-	1	**1**
Coprotus sp.1*	-	-	-	-	1	-	**1**
Coprotus sp.2*	-	-	-	-	-	1	**1**
*Chaetomium globosum****	2	-	1	-	1	1	**5**
*Emericella nidulans***	1	-	-	-	-	-	**1**
*Eupenicillium parvum***	1	-	-	-	1	-	**2**
Eupenicillium sp. **	1	-	-	1	2	-	**4**
*Eurotium amstelodami***	1	-	-	-	-	1	**2**
*Gelasinospora indica****	-	-	-	-	1	-	**1**
Gelasinospora sp.***	-	-	-	-	1	-	**1**
*Hamigera avellanea***	1	2	-	-	1	-	**4**
*Neosartorya fischeri***	-	-	1	1	1	-	**3**
*Podospora setosa****	-	-	-	-	-	1	**1**
*Saccobolus glaber**	-	1	-	-	-	-	**1**
*Sordaria fimicola****	1		2	-	1	1	**5**
*Sporormiella minima****	3	1	2	-	1	-	**7**
*Talaromyces bacillisporus***	1	2	-	-	-	-	**3**
*T. flavus***	2	-	-	1	1	-	**4**
Xylaria sp. ***	-	-	1	-	-	-	**1**
Total isolates	**14**	**7**	**7**	**3**	**12**	**6**	**49**
% Occurrence	**28.57**	**14.29**	**14.29**	**6.12**	**24.49**	**12.24**	**100**

* Class Discomycetes, ** Class Plectomycetes, *** Class Pyrenomycetes.

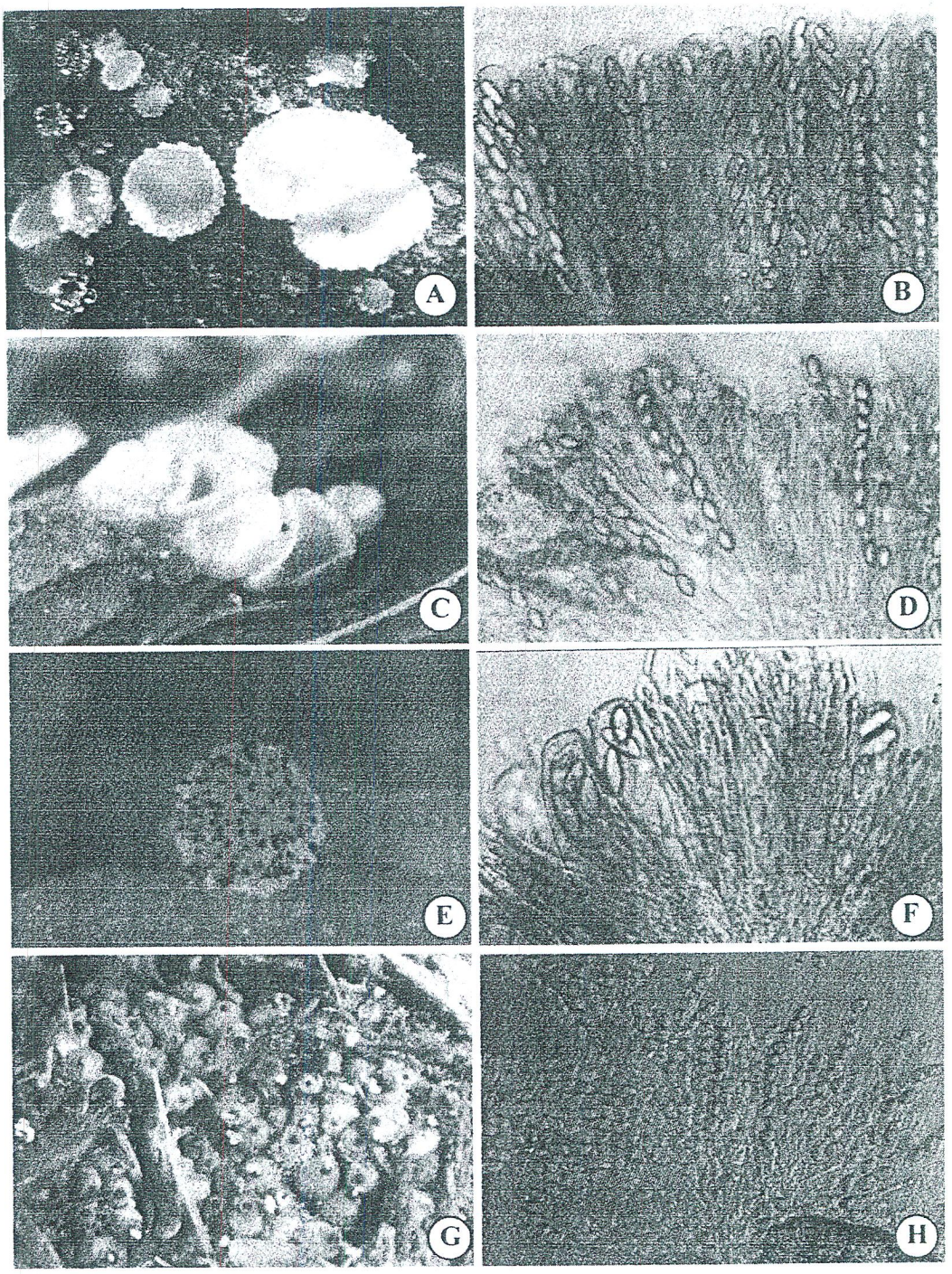


Figure 1 Light and stereo photomicrographs of ascomata, asci and ascospores: A-B. *Coprotus* sp.1; C-D. *Coprotus* sp.2; E-F. *Saccobolus glaber*; G. *Cercophora* sp.; and H. *Sordaria fimicola*.

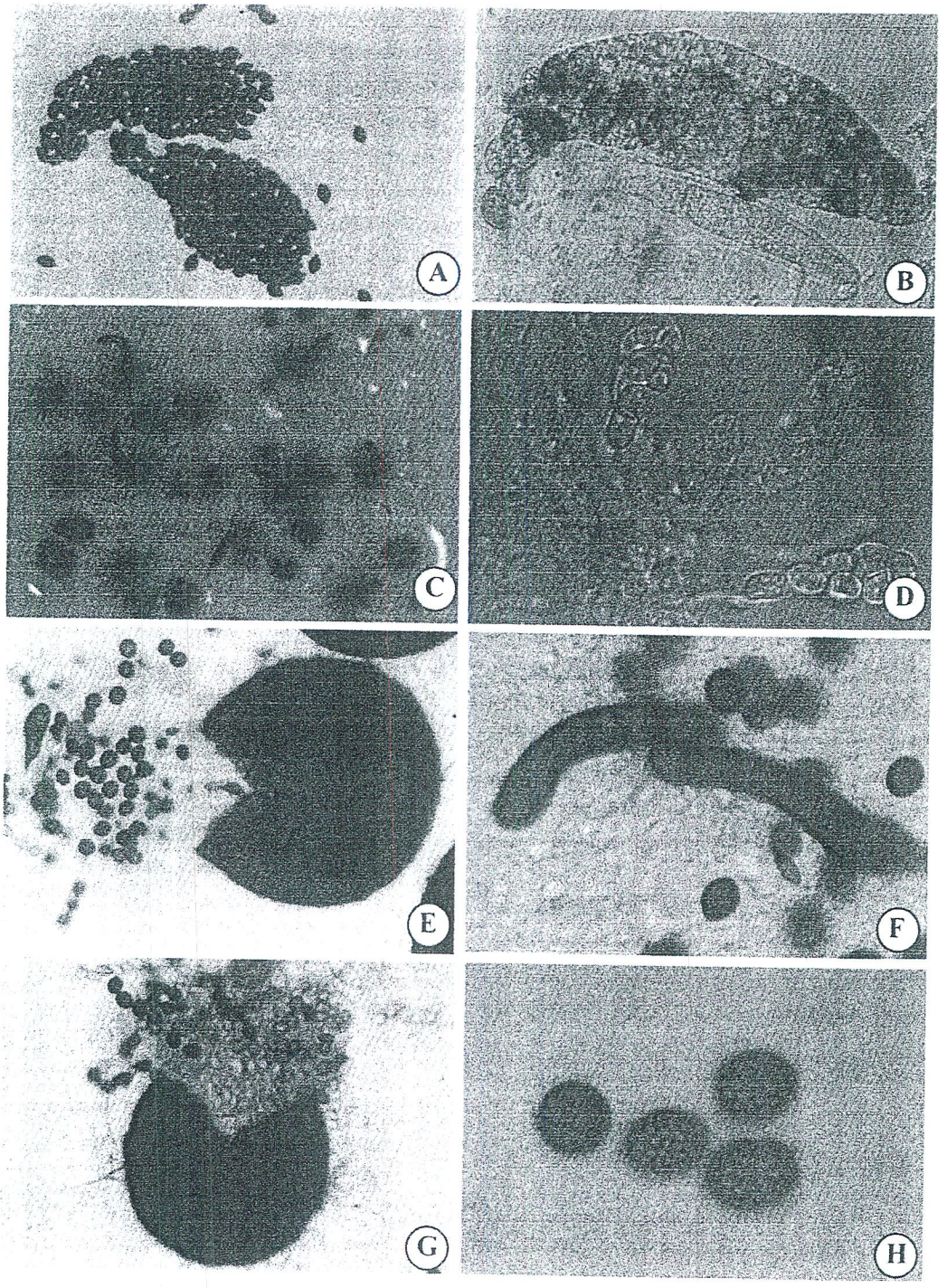


Figure 2 Light and stereo photomicrographs of ascomata, asci and ascospores: A-B. *Podospora setosa*; C-D. *Chaetomium globosum*; E-F. *Gelasinospora* sp.; and G-H. *Gelasinospora indica*.

Observation of the dung samples from the different locations indicated that some species occurred on only one type of dung sample, including *Ascobolus albidus*, *Cercophora* sp., *Coprotus* sp.1, *Coprotus* sp.2, *Emericella nidulans*, *Gelasinospora indica*, *Gelasinospora* sp., *Podospora setosa*, *Saccobolus glaber* and *Xylaria* sp. (Table 1). Moreover, the data showed that fungal species, such as *Chaetomium globosum*, *Eupenicillium parvum*, *Eupenicillium* sp., *Eurotium amstelodami*, *Hamigera avellanea*, *Neosartorya fischeri*, *Sordaria fimicola*, *Sporormiella minima*, *Talaromyces bacillisporus* and *T. flavus* were common and occurred in both locations. *Sporormiella minima* was the most abundant species, with seven isolates found from dung samples, followed by *Sordaria fimicola* (five isolates) and *Chaetomium globosum* (five isolates).

Podospora setosa was found on elephant dung from the Phu Luang Wildlife Sanctuary collected in the cold season. From the collections in the present study, *P. setosa* represented a new record for Thailand. Goff and Begueret (2004) studied the ribosomal protein of *Podospora setosa* that were compared by electrophoretical and immunological methods.

Van Geel *et al.* (2007) reported that the ascospores of the coprophilous *Sordaria*, *Sporormiella* and *Podospora* were very useful in the multidisciplinary paleoecological examination of a fossil vegetation buried under Dawson tephra (25,300 ^{14}C years BP) in northwestern Canada.

CONCLUSIONS

Sixteen genera and 20 species of coprophilous Ascomycetes were recorded from the Khao Yai National Park, Nakhon Ratchasima province and the Phu Luang Wildlife Sanctuary, Loei province. All taxa could be cultivated in pure culture. Among them, *Ascobolus albidus*, *Cercophora* sp., *Coprotus* sp.1, *Coprotus* sp.2, *Emericella nidulans*, *Gelasinospora indica*, *Gelasinospora* sp., *Podospora setosa*, *Saccobolus glaber* and *Xylaria* sp. were found on only one type of dung. The most common species were *Sporormiella minima*, *Sordaria fimicola* and *Chaetomium globosum*. The diversity of coprophilous fungi depended on the type and number of dung samples, habitats, collecting sites and isolation techniques. *Podospora setosa* represented a new record for Thailand of coprophilous Ascomycetes.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to express their appreciation to the Thailand Research Fund (TRF) for financial support of this research.

LITERATURE CITED

Bell, A. 1983. **Dung Fungi an Illustrated Guide to Coprophilous Fungi in New Zealand.** Victoria Univ. Press: Wellington. 88 pp.

____2005. **An Illustrated Guide to the Coprophilous Ascomycetes of Australia.** CBS: Biodiversity Series 3. 173 pp.

Che, Y., J.B. Gloer, J.A. Scott and D. Malloch. 2004. Communiols A-D: new mono- and bis-tetrahydrofuran derivatives from the coprophilous fungus *Podospora communis*. **Tetrahedron Letters** 45: 6891-6894.

Elshafie, A.E. 2005. Coprophilous mycobiota of Oman. **Mycotaxon** 93: 355-357.

Gochenaur, S. 1964. A modification of the immersion tube method for isolating soil fungi. **Mycologia** 56: 921-923.

Goff, L.V. and J. Begueret. 2004. Immunological comparison of individual ribosomal proteins in six species of the genus *Podospora*. **Molecular and General Genetics** 193: 143-148.

Jeamjitt, O., L. Manoch, N. Visarathanonth, C. Chamswarng, R. Watling, G.P. Sharples and A. Kijjoa. 2007. Coprophilous ascomycetes in Thailand. **Mycotaxon** 100: 115-136.

Kuwahara, S. and M. Enomoto. 2005. Enantioselective synthesis and stereochemical revision of communiols A-G. **Tetrahedron Lett.** 46: 6297-6300.

Manoch, L., C. Chana and P. Athipunyakom. 1999. Diversity of coprophilous fungi in Thailand, pp. 675-688. *In* **Proceedings of the International Conference on Asean Network on Microbial Research.** Chiang Mai. Thailand. Nov. 29-Dec. 1, 1999.

Manoch, L., O. Jeamjitt, T. Dethoup, J. Kokaew, A. Eamvijarn, P. Poochinya and Y. Paopun. 2007. Morphological study of some noteworthy fungi from soil and plant. **Journal of Microscopy Society of Thailand** 21(1): 158-159.

Masunga, G.S., O. Andersen, J.E. Taylor and S.S. Dhillion. 2006. Elephant dung decomposition and coprophilous fungi in two habitats of semi-arid Botswana. **Mycol. Res.** 110: 1214-1226.

Nyberg, A. and I.L. Persson. 2002. Habitat differences of coprophilous fungi on moose dung. **Mycol. Res.** 106(11): 1360-1366.

Richardson, M.J. 2001. Diversity and occurrence of coprophilous fungi. **Mycol. Res.** 105: 387-402.

_____2008. Records of coprophilous fungi from the Lesser Antilles and Puerto Rico. **Caribbean Journal of Science** 44(2): 206-214.

Sharples, G.P. and S.T. Moss. 2000. Techniques for the study of fungal ultrastructure: theory and practice. *In* **Electron Microscopy Workshop. Scientific and Technological Research Equipment Certre (STREC).** Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand.

Somrithipol, S. 2004. Coprophilous fungi, pp. 119-128. *In* E.B.G. Jones, M. Tanticharoen and K.D. Hyde, (eds.). **Thai Fungal Diversity.** BIOTEC. Thailand.

Van Geel, B., G.D. Zazula and C.E. Schweger. 2007. Spore of coprophilous fungi from under the Dawson tephra (25,300 ^{14}C years BP), Yukon Territory, northwestern Canada. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology** 252: 481-485.

Weber, R.W.S., A. Meffert, H. Anke and O. Sterner. 2005. Production of sordarin and related metabolites by the coprophilous fungus *Podospora pleiospora* in submerged culture and in its natural substrate. **Mycol. Res.** 109(5): 619-626.

Abstracts

THE 35th CONGRESS on SCIENCE and TECHNOLOGY of THAILAND (STT 35)

การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 35 (วทท 35)

วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีเพื่ออนาคตที่ดีขึ้น

SCIENCE AND TECHNOLOGY FOR A BETTER FUTURE

To Celebrate the 35th Anniversary of Faculty of Science, Burapha University
To Celebrate the 30th Anniversary of Ministry of Science and Technology

October 15 - 17, 2009

Venue : The Tide Resort (Bangsaen Beach), Chonburi, Thailand.

15-17 ตุลาคม 2552 ณ เดอะ ไทด์ รีสอร์ท (หาดบางแสน) จังหวัดชลบุรี

WWW.STT35.SCISOC.OR.TH

ความหลากหลายของราในมูลสัตว์จากเกาะแสมสารและอุทยานแห่งชาติหมู่เกาะอ่างทอง

DIVERSITY OF MICROFUNGI FROM ANIMAL EXCREMENT AT KO SAMAESARN AND MU KO ANGTHONG NATIONAL PARK

อรอุมา เพียซ้าย และ เลขา มาโนช

Onuma Piasai and Leka Manoch

Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok, 10900
e-mail: agromj@ku.ac.th

บทคัดย่อ: เก็บตัวอย่างมูลหมูป่า และ มูลเก้งรวม 10 ตัวอย่าง จากเกาะแสมสาร จ . ชลบุรี วันที่ 21-23 พฤศจิกายน 2551 มูลควาย มูลค่างแว่น และมูลนก รวม 20 ตัวอย่าง จากเกาะพะลวย และเกาะวัวตาหลับ ในพื้นที่เขตอุทยานแห่งชาติหมู่เกาะอ่างทอง จ . สุราษฎร์ธานี วันที่ 20-27 เมษายน 2552 นำมาแยกราโดยวิธีการต่างๆ ได้แก่ soil plate, soil dilution plate, alcohol & heat treatment, moist chamber บนอาหาร Gochenaur's glucose ammonium nitrate agar พบรามูลสัตว์จากเกาะแสมสาร 47 สายพันธุ์ จำแนกได้ 15 สกุล 17 ชนิด ได้แก่ *Ascodesmis macrospora, Aspergillus clavatus, A. fumigatus, A. niger, Chaetomium globosum, Cladosporium cladosporioides, Eupenicillium parvum, Myrothecium verrucaria, Neosartorya fischeri, Paecilomyces lilacinus, Phialophora* sp., *Sporormiella minima, Sordaria fimicola, Scytalidium lignicola, Talaromyces flavus, Thielavia terricola* และ *Trichoderma hamatum* และพบรามูลสัตว์จากอุทยานแห่งชาติหมู่เกาะอ่างทอง 43 สายพันธุ์ จำแนกเป็น 16 สกุล 20 ชนิด ได้แก่ *Aspergillus flavus, A. fumigatus, A. terreus, Chaetomium cupreum, C. globosum, Chaetomium* sp., *Cladosporium cladosporioides, Cunninghamella elegans, Eupenicillium parvum, Mucor* spp., *Myrothecium verrucaria, Neosartorya fischeri, Paecilomyces lilacinus, Phialophora* sp., *Rhizopus stolonifer, Sporormiella minima, Sordaria fimicola, Scytalidium lignicola, Talaromyces flavus* และ *Thielavia terricola*

Abstract: Ten dung samples of barking deer and wild boar from Ko Samaesarn, Chonburi Province on November 21-23, 2008 and twenty dung samples of buffalo, dusky langur and bird from Ko Phaluay and Ko Wua Talap located at Mu Ko Angthong National Park, Surat Thani Province on April 20-27, 2009 were collected. Various methods for isolating microfungi including soil plate, soil dilution plate, alcohol & heat treatment, moist chamber and Gochenaur's glucose ammonium nitrate agar were used. Forty-seven isolates of microfungi were recorded from Ko Samaesarn, comprising 15 genera 17 species including *Ascodesmis macrospora, Aspergillus clavatus, A. fumigatus, A. niger, Chaetomium globosum, Cladosporium cladosporioides, Eupenicillium parvum, Myrothecium verrucaria, Neosartorya fischeri, Paecilomyces lilacinus, Phialophora* sp., *Sporormiella minima, Sordaria fimicola, Scytalidium lignicola, Talaromyces flavus, Thielavia terricola* and *Trichoderma hamatum*. Forty-three isolates of microfungi were found from Mu Ko Angthong National Park, comprising 16 genera, 20 species including *Aspergillus flavus, A. fumigatus, A. terreus, Chaetomium cupreum, C. globosum, Chaetomium* sp., *Cladosporium cladosporioides, Cunninghamella elegans, Eupenicillium parvum, Mucor* spp., *Myrothecium verrucaria, Neosartorya fischeri, Paecilomyces lilacinus, Phialophora* sp., *Rhizopus*

stolonifer, *Sporormiella minima*, *Sordaria fimicola*, *Scytalidium lignicola*, *Talaromyces flavus* and *Thielavia terricola*.

Introduction: Microfungi are commonly found on soil, plant and dung of many herbivorous animals (Bell 1983, 2005;). The studies on secondary metabolites of some fungi from animal feces with potent antifungal and antibacterial activities have been reported, such as *Podospora communis* and *P. pleiospora* (Kuwahara and Enomoto, 2005; Weber *et al.*, 2005). Diversity, distribution and decomposition of coprophilous fungi from animal dung samples were recorded in many countries (Elshafie 2005; Masunga *et al.*, 2006; Richardson 2008). In Thailand, Manoch *et al.* (1999) reported 19 coprophilous fungi from 12 dung samples from Huay Kha Khang Wild Life Sanctuary, Uthai Thani Province. Jeamjitt *et al.* (2007) recorded 12 genera and 15 species of coprophilous ascomycetes, including *Ascobolus*, *Ascodesmis*, *Cercophora*, *Chaetomium*, *Emericella*, *Gelasinospora*, *Podosordaria*, *Podospora*, *Saccobolus*, *Sordaria*, *Sporormiella* and *Zopfiella* from Huay Kha Khang Wild Life Sanctuary and Khao Yai National Park. It is very important to study microfungi from animal dung in Thailand, because these fungi were poorly known with the only significant records. Hence, more investigations on fungi need to be carried out in this tropical region for the discovery of new taxa. The objective of this research was to study diversity and distribution of microfungi associated with various animal dung at Ko Samaesarn, Chonburi Province and Mu Ko Angthong National Park, Surat Thani Province.

Methodology: Ten dung samples of barking deer and wild boar from Ko Samaesarn, Chonburi Province on November 21-23, 2008 and twenty dung samples of buffalo, dusky langur and birds from Ko Phaluay and Ko Wua Talap located at Mu Ko Angthong National Park, Surat Thani Province on April 20-27, 2009 were collected. Each excrement sample was placed in a moist chamber and positioned near a window. They were incubated for 2-7 days at 28 °C. Direct isolation was from the dung surface under a stereomicroscope. The ascomata were transferred directly onto water agar (WA), squashed to release the ascospores, and incubated for 48 hours. If the ascospores did not germinate, a fine needle was used to transfer the fruiting body with the remaining ascospores from WA and placed in a test tube containing 10 ml, 60-80 °C hot water, 65% ethyl alcohol, and 3% KOH for 30, 15 and 3-5 minutes respectively. The treated ascospores were spread on WA in a Petri dish and incubated for 12-24 hours. A hyphal tip from a single spore was transferred to a slant of potato dextrose agar (PDA) for all species and is kept as a pure culture at Kasetsart University Fungal Collection (KUFC). Dry specimens of dung samples are kept in a herbarium at Kasetsart University (KUH). The soil plate, dilution plate, heat, alcohol treatments and Gochenaur's glucose ammonium nitrate agar (Gochenaur, 1964) (NH_4NO_3 1 g, K_2HPO_4 1 g, $MgSO_4.7H_2O$ 0.5 g, rose bengal 0.03 g, yeast extract 1 g, glucose 5 g, agar 15 g, streptomycin solution 4 ml, distilled water 1 litre) as well as 2% malt extract agar were used to isolate the dung fungi. Identification was based on morphological characteristics such as colony growth patterns, color, texture on different agar media and spore ornamentation. Examination was by light and scanning electron microscopes. Coprophilous fungi were identified using the keys of Bell (1983, 2005), Lundqvist (1972), Richardson and Watling (1997) and Seifert *et al.* (1983).

Results, Discussion and Conclusion: Ninety isolates of microfungi comprising 18 genera 27 species were found from thirty dung samples including 36 isolates of Ascomycetes (8 genera 10 species), 50 isolates of Hyphomycetes (7 genera 13 species), and 4 isolates of Zygomycetes (3 genera 4 species) (Table 1). The soil plate method yielded the highest

number of microfungi (22 spp.), followed by the heat treatment(14 spp.), dilution plate method (11 spp.), alcohol treatment (10 spp.) and moist chamber method (3 spp.).

Table 1 Occurrence (%) of microfungi on different dung types (the number of samples indicated in the brackets [#])

Fungal species	Number of fungal isolates					Total isolate
	Ko Samaesarn		Mu Ko Angthong			
	barking deer (7)[#]	wild boar (3)[#]	buffalo (5)[#]	dusky langur (8)[#]	bird (7)[#]	
*Ascodesmis macrospora**	-	1	-	-	-	1
*Aspergillus clavatus***	1	-	-	-	-	1
*Aspergillus flavus***	-	-	-	2	3	5
*Aspergillus fumigatus***	-	5	2	1	-	8
*Aspergillus niger***	4	-	-	-	-	4
*Aspergillus terreus***	-	-	-	1	1	2
*Chaetomium cupreum**	-	-	1	-	-	1
*Chaetomium globosum**	4	-	-	1	-	5
Chaetomium sp. *	-	-	1	-	-	1
*Cladosporium cladosporioides***	-	4	-	1	3	8
*Cunninghamella elegans****	-	-	-	1	-	1
*Eupenicillium parvum**	2	-	1	1	-	4
Mucor spp. ***	-	-	1	-	1	2
*Myrothecium verrucaria***	-	3	1	-	-	4
*Neosartorya fischeri**	1	2	2	-	-	5
*Paecilomyces lilacinus***	2	3	1	1	3	10
Phialophora spp. **	1	-	1	1	-	3
*Rhizopus stolonifer****	-	-	-	-	1	1
*Sporormiella minima**	2	-	-	2	-	4
*Sordaria fimicola**	3	-	2	-	-	5
*Scytalidium lignicola***	1	-	-	1	1	3
*Talaromyces flavus**	-	2	-	2	1	5
*Thielavia terricola**	-	4	1	-	-	5
*Trichoderma hamatum***	-	2	-	-	-	2
Total isolate	21	26	14	15	14	90
% Occurrence	23	29	15.5	17	15.5	100

Remark: * Class Ascomycetes. ** Class Hyphomycetes . *** Class Zygomycetes

The results indicated that dusky langur dung yielded the highest number of fungal species (12 spp.), followed by buffalo(11 spp.), barking deer (10 spp.), wild boar (9 spp.) and bird (8 spp.). Moreover, wild boar dung yielded the highest number of fungal isolate (26 isolates), followed by barking deer (21 isolates), dusky langur (15 isolates), buffalo (14 isolates) and bird (14 isolates) (Table 1). All taxa were cultivated on PDA and CMA. The pure cultures are

being maintained in a culture collection at the Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok (KPFC) for further study.

Forty-seven isolates of microfungi were recorded from Ko Samaesarn, comprising 15 genera 17 species including *Ascodesmis macrospora, Aspergillus clavatus, A. fumigatus, A. niger, Chaetomium globosum, Cladosporium cladosporioides, Eupenicillium parvum, Myrothecium verrucaria, Neosartorya fischeri, Paecilomyces lilacinus, Phialophora sp., Sporormiella minima, Sordaria fimicola, Scytalidium lignicola, Talaromyces flavus, Thielavia terricola* and *Trichoderma hamatum*, whilst 43 isolates of microfungi were found from Mu Ko Angthong National Park, comprising 16 genera, 20 species including *Aspergillus flavus, A. fumigatus, A. terreus, Chaetomium cupreum, C. globosum, Chaetomium sp., Cladosporium cladosporioides, Cunninghamella elegans, Eupenicillium parvum, Mucor spp., Myrothecium verrucaria, Neosartorya fischeri, Paecilomyces lilacinus, Phialophora sp., Rhizopus stolonifer, Sporormiella minima, Sordaria fimicola, Scytalidium lignicola, Talaromyces flavus* and *Thielavia terricola.*

Observation on dung samples at various locations indicated that some species occurred on only one type of dung sample, including *Ascodesmis macrospora, Chaetomium cupreum, Chaetomium* sp., *Cunninghamella elegans* and *Rhizopus stolonifer* (Table 1). Moreovere, the data showed that fungal species, such as *Aspergillus fumigatus, Chaetomium globosum, Cladosporium cladosporioides, Eupenicillium parvum, Myrothecium verrucaria, Neosartorya fischeri, Paecilomyces lilacinus, Phialophora* sp., *Sporormiella minima, Sordaria fimicola, Scytalidium lignicola, Talaromyces flavus , Thielavia terricola* and *Trichoderma hamatum* were common and occurred in both locations.

It is interesting to note that *Ascodesmis macrospore, Chaetomium cupreum, C. globosum, Chaetomium* sp., *Sporormiella minima* and *Sordaria fimicola* were true coprophilous ascomycetes. van Geel *et al.* (2007) reported that ascospores of the coprophilous *Sordaria, Sporormiella* and *Podospora* were very useful in multidisciplinary paleoecological examination of a fossil vegetation buried under Dawson tephra (25,300 ^{14}C years BP) in Northwestern Canada.

Paecilomyces lilacinus was the most abundant species whereas 10 isolates were found from all dung samples, followed by *Aspergillus fumigatus* (8 isolates) and *Cladosporium cladosporioides* (8 isolates). Fiedler and Sosnowska (2007) reported that *Paecilomyces lilacinus* could control greenhouse pests such as greenhouse whitefly (*Trialeurodes vaporariorum*), glasshouse red spider mite (*Tetranychus urticae*), the cotton aphid (*Aphis gossypii*) and western flower thrips (*Frankliniella occidentalis*) in Republic of Poland.

References:

1. Bell A. 1983. Dung fungi an illustrated guide to coprophilous fungi in New Zealand. Victoria Univ. Press: Wellington. 88 p.

2. Bell A. 2005. An illustrated guide to the coprophilous Ascomycetes of Australia. CBS: Biodiversity Series 3. 173 p.

3. Elshafie AE. 2005. Coprophilous mycobiota of Oman. Mycotaxon 93: 355-357.

4. Fiedler, Z. and D. Sosnowska. 2007. Nematophagous fungus *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson is also a biological agent for control of greenhouse insects and mite pests. BioControl 52(4): 547-558.

5. Gochenaur S. 1964. A modification of the immersion tube method for isolating soil fungi. Mycologia 56: 921-923.

6. Jeamjitt , O., L. Manoch, N. Visarathanonth, C. Chamswarng, R. Watling, G. P. Sharples and A. Kijjoa. 2007. Coprophilous ascomycetes in Thailand. Mycotaxon 100: 115-136.

7. Kuwahara S. and M. Enomoto. 2005. Enantioselective synthesis and stereochemical revision of communiols A-G. Tetrahedron Letters. 46: 6297-6300.

8. Lundqvist, N. 1972. Nordic Sordariaceae s. lat. In Symbolae Botanicae Upsaliensee, 20(1) University of Uppsala, Sweden.

9. Manoch L, Chana C, Athipunyakom P. 1999. Diversity of coprophilous fungi in Thailand. pp. 675-688. *In* Abstracts of International Conference on Asean Network on Microbial Research. Chiang Mai. Thailand. Nov. 29-Dec. 1, 1999.

10. Masunga, G.S., O. Andersen, J.E. Taylor and S.S. Dhillion. 2006. Elephant dung decomposition and coprophilous fungi in two habitats of semi-arid Botswana. Mycological Research 110: 1214-1226.

11. Richardson, M.J. 2008. Records of coprophilous fungi from the Lesser Antilles and Puerto Rico. Caribbean Journal of Science. 44(2): 206-214.

12. Richardson, M.J. and R. Watling. 1997. Key to Fungi on Dung. W.J. Byford. (ed.). Bull. Brit. Mycol. Soc. 2: 18-46.

13. Seifert, K.A., B. Kendrick and G. Murase. 1983. A Key to Hyphomycetes on Dung. Department of Biology, University of Waterloo, Ontalio.

14. van Geel, B., G.D. Zazula and C.E. Schweger. 2007. Spore of coprophilous fungi from under the Dawson tephra (25,300 ^{14}C years BP), Yukon Territory, northwestern Canada. Palaeogeography, Palaeo-climatology, Palaeoecology 252: 481-485.

15. Weber, R.W.S., A. Meffert, H. Anke and O. Sterner. 2005. Production of sordarin and related metabolites by the coprophilous fungus *Podospora pleiospora* in submerged culture and in its natural substrate. Mycological Research 109 (5): 619-626.

Keywords: diversity, microfungi, animal excrement, Ko Samaesarn, Mu Ko Angthong National Park

Acknowledgment: This research is supported by the Thailand Research Fund (TRF) and Plant Genetic Conservation Project Under The Royal initiative of Her Royal Highness Princess Maha Chakri Sirindhorn.

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ
สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี
(อพ. สธ.)

เอกสารประชุมวิชาการ
ทรัพยากรไทย : ผันสู่วิถีใหม่ในฐานไทย
(ภาคบรรยาย ภาคโปสเตอร์)

20-23 ตุลาคม 2552
การประชุมวิชาการประจำปี ครั้งที่ 4 ชมรมคณะปฏิบัติงานวิทยาการ อพ.สธ.
ณ ห้องประชุมวิชาการ ศูนย์อนุรักษ์และพัฒนาทรัพยากรภาคตะวันออก
สวนสัตว์เปิดเขาเขียว ตำบลบางพระ อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี

ISBN : 978-974-9958-28-5

การประชุมวิชาการ ทรัพยากรไทย: ผันสู่วิถีใหม่ในฐานไทย (ภาคโปสเตอร์ หน้า 538-545)

ความหลากหลายของรามูลสัตว์ ราโรคพืช และราบนขอนไม้ผุ จากอุทยานแห่งชาติหมู่เกาะอ่างทอง

DIVERSITY OF COPROPHILOUS, PLANT PATHOGENIC AND WOOD DECAY FUNGI FROM MU KO ANGTHONG NATIONAL PARK

อรอุมา เพียซ้าย และ เลขา มาโนช

Onuma Piasai and Leka Manoch

ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok 10900

บทคัดย่อ

เก็บตัวอย่างมูลควาย มูลค่างแว่น และมูลนก ตัวอย่างใบพืชเป็นโรค และกิ่งไม้ รวม 47 ตัวอย่าง จากเกาะพะลวย และเกาะวัวตาหลับ ในพื้นที่เขตอุทยานแห่งชาติหมู่เกาะอ่างทอง จ. สุราษฎร์ธานี วันที่ 20-27 เมษายน 2552 นำมาแยกราโดยวิธีการต่างๆ ได้แก่ soil plate, soil dilution plate, alcohol & heat treatment, moist chamber บนอาหาร Gochenaur's glucose ammonium nitrate agar พบราจากมูลสัตว์ 43 สายพันธุ์ (isolate) จำแนกเป็น 16 สกุล 20 ชนิด ตัวอย่างเช่น *Chaetomium cupreum, C. globosum, Chaetomium sp., Neosartorya fischeri, , Phialophora* sp., *Sporormiella minima, Sordaria fimocola, Scytalidium lignicola, Talaromyces flavus* และ *Thielavia terricola* ศึกษาราจากตัวอย่างพืชเป็นโรค ได้แก่ กล้วย มะม่วงหิมพานต์ มะม่วง โพธิ์ สบู่ดำ และ สาบเสือ พบรา 10 สายพันธุ์ จำแนกเป็น 5 สกุล 5 ชนิดได้แก่ *Cercospora* sp., *Colletotrichum gloeosporioides, Fusarium oxysporum, Pestalotiopsis* sp. และ *Phyllachora* sp. และจากการศึกษาราที่เจริญบนกิ่งไม้ และขอนไม้ พบราใน Class Ascomycetes ได้แก่ *Xylaria, Hypoxylon* และ *Daldinia* และราใน Class Basidiomycetes ได้แก่ *Ganoderma, Hexagonia, Lycoperdon, Marasmius, Microporus, Pycnoporus* และ *Shizophyllum*

Abstract

Forty-seven samples including dung samples of buffalo, Dusky Langur and birds; plant diseases and decaying twigs were collected from Ko Phaluay and Ko Wua Talap located at Mu Ko Angthong National Park, Surat Thani Province on April 20-27, 2009. Various methods for isolating microfungi including soil plate, soil dilution plate, alcohol & heat treatment, moist chamber and Gochenaur's glucose ammonium nitrate agar were used. Forty-three isolates of microfungi isolated from dung comprising 16 genera, 20 species, such as *Chaetomium cupreum, C. globosum, Chaetomium* sp., *Neosartorya fischeri, , Phialophora* sp., *Sporormiella minima, Sordaria fimocola, Scytalidium lignicola, Talaromyces flavus* and *Thielavia terricola.* Ten isolates comprising 5 genera, 5 species were isolated from diseased banana, cashew nut, mango, bodhi tree, physic nut and bitter

bush including *Cercospora* sp., *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum*, *Pestalotiopsis* sp. and *Phyllachora* sp. Ascomycetes found on decaying twig and logs were *Xylaria*, *Hypoxylon* and *Daldinia* whereas Basidiomycetes such as *Ganoderma*, *Hexagonia*, *Lycoperdon*, *Marasmius*, *Microporus*, *Pycnoporus* and *Shizophyllum* were recorded from decaying twigs and logs.

คำสำคัญ: ความหลากหลาย, รามูลสัตว์, ราโรคพืช, ราบนขอนไม้ผุ, อุทยานแห่งชาติหมู่เกาะอ่างทอง, จังหวัดสุราษฎร์ธานี
Keywords: Diversity, Coprophilous fungi, Plant pathogenic fungi, wood decay fungi, Mu Ko Angthong National Park, Surat Thani Province, Hyphomycetes, Ascomycetes, Basidiomycetes,

*ติดต่อนักวิจัย: อรอุมา เพียซ้าย (อีเมล์ : agromj@ku.ac.th)
*Corresponding author: Onuma Piasai (Email : agromj@ku.ac.th)

บทนำ

รามูลสัตว์ (coprophilous fungi) เป็นรากลุ่มหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายอินทรีย์วัตถุในธรรมชาติ สปอร์ของรากลุ่มนี้มีความทนทานต่อกระบวนการย่อยอาหารในกระเพาะสัตว์ และสามารถงอกได้ใหม่เมื่อสัตว์ถ่ายมูลออกมา (Bell, 2005) รามูลสัตว์หลายชนิดสร้างสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของราและแบคทีเรียบางชนิด (Huang and Kaneko, 1996; Hein *et al.*, 1998) ราที่พบจากมูลสัตว์และมีรายงานพบในดินเช่น *Chaetomium cupreum*, *C. globosum*, *Sordaria fimicola*, *Arthrobrotrys oligospora*, *Paecilomyces lilacinus* และ *Trichoderma harzianum* ได้มีรายงานการนำมาใช้ควบคุมโรคพืชทางชีววิธี (จิระเดช และคณะ, 2545; Jeamjitt *et al.*, 2006 b, Soytong, 2004; Watanabe, 1991) van Brummelen (1967, 1969, 1977) ได้รายงานการศึกษารามูลสัตว์ในประเทศไทยโดยพบรา coprophilous ascomycetes ได้แก่ *Ascobolus siamensis* sp. nov., *A. demangei*, *Saccobolus minimus*, *S. thaxteri*, *S. truncatus*, *S. succineus* sp. nov. และ *Leptokalpion albicans* gen. nov. Manoch *et al.* (1999) รายงานรา 19 ชนิดจากมูลสัตว์ 12 ตัวอย่าง ในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง จังหวัดอุทัยธานี และอุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ จังหวัดนครราชสีมา นอกจากราที่พบจากมูลสัตว์ยังมีราอีกหลายชนิดในธรรมชาติที่น่าสนใจ โดยเฉพาะราที่เป็นสาเหตุโรคพืช และราที่ย่อยสลายใบ กิ่ง และลำต้น

งานวิจัยนี้เป็นการสนองพระราชดำริโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชฯ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายและการแพร่กระจายของราบนมูลสัตว์และส่วนต่างๆของพืช เพื่ออนุรักษ์สายพันธุ์เชื้อราที่หายากและเป็นประโยชน์ และเพื่อค้นหาราสายพันธุ์ใหม่ที่ไม่เคยมีรายงานมาก่อน หรือราที่มีประสิทธิภาพสูงที่สามารถนำมาใช้ให้ประโยชน์ทางการเกษตร การแพทย์ และอุตสาหกรรมต่อไปในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

<u>สำรวจและเก็บตัวอย่าง</u> เก็บตัวอย่างมูลสัตว์ได้แก่ มูลควาย 5 ตัวอย่าง มูลค่างแว่น 8 ตัวอย่าง มูลนก 7 ตัวอย่าง ใบพืชเป็นโรค 6 ตัวอย่าง ได้แก่ กล้วย

มะม่วงหิมพานต์ มะม่วง โพธิ์ สบู่ดำ และ สาบเสือ กิ่งไม้และขอนไม้ 14 ตัวอย่าง รวม 47 ตัวอย่าง จาก บริเวณเกาะพะลวย และเกาะวัวตาหลับ ในพื้นที่เขต อุทยานแห่งชาติหมู่เกาะอ่างทอง จ. สุราษฎร์ธานี วันที่ 20-27 เมษายน 2552 นำมาแยกราในห้อง ปฏิบัติการที่ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ โดยวิธีการต่างๆ ดังนี้

1. Moist Chamber Method (Bell, 2005; อรอุมา และคณะ 2551) นำมูลสัตว์วางบนจานเลี้ยงเชื้อ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 ซม. ที่อบฆ่าเชื้อ วางจาน เลี้ยงเชื้อในกล่องพลาสติกใสที่มีฝาปิด วางกระดาษ ทิชชูภายในกล่องและหยดน้ำกลั่นลงบนกระดาษ บ่ม เชื้อไว้บริเวณที่มีแสงแดดส่องถึงที่อุณหภูมิ 28 °C เป็น เวลา 2-3 วัน นำมาตรวจดูเชื้อรา ใต้กล้องจุลทรรศน์ แบบ stereo ใช้เข็มเขี่ย ย้ายสปอร์หรือ fruiting body ของเชื้อราวางบนสไลด์ ตรวจสอบดูโครงสร้างภายใต้ กล้อง จุลทรรศน์ แบบ compound จำแนก ชนิดของ เชื้อรา และบันทึกภาพ และใช้เข็มเขี่ย ย้ายเชื้อรา มา เลี้ยงบนอาหาร 1/2 potato dextrose agar (PDA) (มันฝรั่ง 100 กรัม, dextrose 10 กรัม, วุ้น 15 กรัม, น้ำกลั่น 1 ลิตร ที่ผสม streptomycin เก็บสายพันธุ์ บริสุทธิ์เชื้อราเพื่อนำมาศึกษาต่อไป

2. Soil dilution plate method (Barron, 1968; เลขา และคณะ 2551) ชั่งมูล 10 กรัม ใส่ในน้ำกลั่นที่ นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 90 มล. (หรือใช้ 0.15% water agar) เขย่าให้เข้ากัน ใช้ pipette ดูดสารละลายดินเข้มข้น 10^{-1} ปริมาตร 10 มล. ใส่ขวดน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อ 90 มล. ดูดสารละลายความเข้มข้น 10^{-2} มา 10 มล. ใส่ ในขวดน้ำกลั่นปริมาตร 90 มล. ทำเป็น series ไปจน ได้สารละลายปริมาตร 10^{-4} และ 10^{-5} ใช้ pipette ดูดสารละลายแต่ละความเข้มข้นของอนุภาคมูลใส่ลง ในจานเลี้ยงเชื้อจานละ 1 มล. เทอาหาร glucose ammonium nitrate agar (GAN) ที่มีส่วนประกอบ ของ rose bengal และ streptomycin (Gochenaur, 1964) หรือใช้ 3%malt extract agar + streptomycin นำไปบ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็น เวลา 3-5 วัน ใช้เข็มเขี่ยย้ายโคโลนีของรามาเลี้ยงใน slant PDA เพื่อเก็บเป็นเชื้อบริสุทธิ์ไว้ใช้ศึกษาต่อไป

3. Soil plate method (Warcup, 1950; เลขา และ คณะ 2551) ใช้ microspatula ตักมูลประมาณ 0.0005-0.015 กรัม ใส่ในจานเลี้ยงเชื้อ แล้วเททับด้วย อาหารวุ้น GAN แล้วดำเนินการทดลองเช่นเดียวกับ ข้อ 2

4. Alcohol treatment method (Warcup and Baker, 1963; เลขา และคณะ 2551) ชั่งมูล 0.3 กรัม ใส่ใน หลอดทดสอบที่อบฆ่าเชื้อ เติม ethyl alcohol 65 % ลงไป ประมาณ 2 ใน 3 ของหลอด เขย่าให้ เข้ากัน ตั้ง ทิ้งไว้ 10-15 นาที ริน alcohol ทิ้ง ใช้ microspatula ตักมูลใส่ในจานเลี้ยงเชื้อ เททับด้วยอาหารวุ้น GAN ดำเนินการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2

5. Heat treatment method (Warcup and Baker, 1963) ชั่งมูล 0.3 กรัม ใส่ในหลอดทดสอบที่อบฆ่าเชื้อ แล้ว ใส่น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วนำไปใส่ใน water bath ที่ อุณหภูมิ 60-80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-15 นาที รินน้ำทิ้ง ใช้ microspatula ตักมูลใส่ในจานเลี้ยงเชื้อ เททับด้วยอาหารวุ้น GAN ดำเนินการทดลอง เช่นเดียวกับข้อ 2

6. Tissue transplanting method (เลขา และคณะ 2547) ตัดชิ้นส่วนบริเวณรอยต่อระหว่างเนื้อเยื่อที่ดี กับเนื้อเยื่อที่เป็นโรคออก เป็นชิ้นเล็กๆ ขนาด 5x5 มิลลิเมตร ด้วยใบมีดที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้วนำชิ้นส่วน เหล่านี้มาฆ่าเชื้อภายนอก (surface disinfection)

ด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อ 10% Clorox (1.25% sodium hypochlorite) เป็นเวลา 5 นาที ในจานเลี้ยงเชื้อ รินน้ำยาฆ่าเชื้อออกโดยไม่ต้องเปิดฝาจานเลี้ยงเชื้อ จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง แล้วซับให้แห้งด้วยกระดาษซับนึ่งฆ่าเชื้อ วางชิ้นส่วนพืชบนอาหาร PDA ในจานเลี้ยงเชื้อบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2-7 วัน จากนั้นใช้เข็มเขี่ยตัดปลายเส้นใยเพื่อย้ายเชื้อไปเลี้ยงในอาหาร slant PDA

ศึกษาการเจริญของราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เลี้ยงราบนอาหาร PDA และ cornmeal agar (CMA) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-14 วัน บันทึกลักษณะการเจริญ สี การสร้างสปอร์ ศึกษารูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาเปรียบเทียบกับงานวิจัยที่เคยมีรายงานไว้

ศึกษาการจำแนกชนิด เตรียมสไลด์ตัวอย่างรา โดยใช้เข็มเขี่ยลนไฟฆ่าเชื้อ เขี่ยเส้นใยและสปอร์ของราวางบนแผ่นสไลด์ที่หยดน้ำและปิดทับด้วย cover slip นำไปส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์และถ่ายภาพราจากกล้องจุลทรรศน์แบบ stereo, compound และ scanning electron microscope (SEM) วาดภาพโครงสร้างราโดย camera lucida drawing

การเก็บรักษาสายพันธุ์ราบริสุทธิ์ นำเชื้อบริสุทธิ์ (pure culture) ของราที่จำแนกชนิดเรียบร้อยแล้วมาทำการเก็บรักษาด้วยวิธีต่าง ๆ ได้แก่ deep freeze ที่อุณหภูมิ -135 องศาเซลเซียส, soil culture, water culture, liquid paraffin และบน slant PDA เก็บรักษาในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ที่ห้องปฏิบัติการเชื้อรา ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

พบราจากมูลสัตว์รวม 43 สายพันธุ์ (isolate) จำแนกเป็น 16 สกุล 20 ชนิด ได้แก่ *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. terreus*, *Chaetomium cupreum*, *C. globosum*, *Chaetomium* sp., *Cladosporium cladosporioides*, *Cunninghamella elegans*, *Eupenicillium parvum*, *Mucor* spp., *Myrothecium verrucaria*, *Neosartorya fischeri*, *Paecilomyces lilacinus*, *Phialophora* sp., *Rhizopus stolonifer*, *Sporormiella minima*, *Sordaria fimocola*, *Scytalidium lignicola*, *Talaromyces flavus* และ *Thielavia terricola* (ตารางที่ 1)

รามูลสัตว์ที่น่าสนใจได้แก่ *Sporormiella minima* จากมูลค่างแว่น และ *Sordaria fimicola* จากมูลควาย van Geel *et al.* (2007) ได้รายงานการศึกษา ascospores ของรา coprophilous *Sordaria*, *Sporormiella* และ *Podospora* เพื่อใช้ในการบ่งบอกอายุของฟอสซิล และนิเวศวิทยาของพืชและสัตว์โบราณในประเทศแคนาดา รา *Paecilomyces lilacinus* พบในมูลสัตว์ทั้ง 3 ชนิด มีรายงานการใช้ในการควบคุมไส้เดือนฝอยศัตรูพืช และแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี ได้แก่ แมลงวันขาวเรือนกระจก (*Trialeurodes vaporariorum*) ไรสองจุด (*Tetranychus urticae*) เพลี้ยอ่อนฝ้าย (*Aphis gossypii*) เพลี้ยไฟ (*Frankliniella occidentalis*) ในประเทศโปแลนด์ (Fiedler and Sosnowska, 2007)

ตารางที่ 1 ราที่พบบนมูลสัตว์ 3 ชนิดแยกได้โดยวิธีต่างๆ

No	Fungal species	dung type	method *
1	*Aspergillus flavus*	ค่างแว่น , นก	ms, sp
2	*A. fumigatus*	ควาย	sp, dp
3	*A. terreus*	ค่างแว่น , นก	ms, dp
4	*Chaetomium cupreum*	ควาย	ht
5	*C. globosum*	ค่างแว่น	sp
6	*Chaetomium* sp.	ควาย	alc
7	*Cladosporium cladosporioides*	ควาย , นก	sp, dp
8	*Cunninghamella elegans*	ค่างแว่น	sp
9	*Eupenicillium parvum*	ควาย , ค่างแว่น	ht, alc
10	*Mucor* spp.	ควาย , นก	sp, dp
11	*Myrothecium verrucaria*	ควาย	sp
12	*Neosartorya fischeri*	ควาย	ht
13	*Paecilomyces lilacinus*	ควาย,ค่างแว่น, นก	sp, dp
14	*Phialophora* sp.	ควาย, ค่างแว่น	dp
15	*Rhizopus stolonifer*	นก	sp
16	*Sporormiella minima*	ค่างแว่น	ht, alc
17	*Sordaria fimicola*	ควาย	ms, alc
18	*Scytalidium lignicola*	ค่างแว่น , นก	sp, ht
19	*Talaromyces flavus*	ควาย , นก	ht, alc
20	*Thielavia terricola*	ควาย	sp

* วิธีการ: soil plate method (sp), dilution plate method (dp)
heat treatment method (ht), alcohol treatment method (alc)

Jeamjitt *et al.* (2006 a; 2007) ศึกษารามูลสัตว์ในประเทศไทย และพบราที่น่าสนใจ ได้แก่ *Ascobolus albidus*, *Ascodesmis sphaerospora*, *Cercophora silvatica*, *Gelasinospora brevispora*, *Nodulisporium gregarium*, *Oidiodendron griseum*, *Pithomyces karoo*, *Podosordaria leporine*, *Sporormiella minima* และ *Zopfiella latipes*

ศึกษาราจากตัวอย่างพืชเป็นโรค ได้แก่ กล้วย มะม่วง หิมพานต์ มะม่วง โพธิ์ สบู่ดำ และ สาบเสือ พบรา 10 สายพันธุ์ จำแนกเป็น 5 สกุล 5 ชนิดได้แก่ *Cercospora* sp., *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum*, *Pestalotiopsis* sp. และ *Phyllachora* sp. (ตารางที่ 2) ผลการทดลองนี้ได้สอดคล้องกับงานวิจัยโดย เลขา และคณะ (2547) ซึ่งได้พบรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสบนผลทับทิม มะม่วงเขียวเสวย ส้มเขียวหวาน กล้วยน้ำว้า แตงโม และมะละกอ รา *Fusarium oxysporum* บนผลส้มเขียวหวาน และฝรั่ง รา *Pestalotiopsis* spp. บนผลฝรั่งอ่อนเขียว และชมพู่

ตารางที่ 2 ราที่แยกได้จากพืชเป็นโรคโดยวิธีการ tissue transplanting method

No	Fungal species	host plant
1	*Cercospora* sp.	สาบเสือ (*Eupotorium odortum* L.)
2	*Colletotrichum gloeosporioides*	มะม่วง (*Mangifera indica* L.)
		สบู่ดำ (*Jatropha curcas* L.)
3	*Fusarium oxysporum*	กล้วย (*Musa sapientum* L.)
4	*Pestalotiopsis* sp.	มะม่วงหิมพานต์ (*Anacardium occidentale* L.)
5	*Phyllachora* sp.	โพธิ์ (*Ficus religiosa* L.)

จากการศึกษาราที่เจริญบนกิ่งไม้ที่ร่วงหล่นและขอนไม้ผุ พบราใน Class Ascomycetes ได้แก่ *Xylaria*, *Hypoxylon* และ *Daldinia* พบราจำพวกเห็ดใน Class Basidiomycetes ได้แก่ *Ganoderma*, *Hexagonia*, *Lycoperdon*, *Marasmius*, *Microporus*, *Pycnoporus* และ *Shizophyllum*

สรุป

พบราจากมูลสัตว์ 43 สายพันธุ์ จำแนกเป็น 16 สกุล 20 ชนิด ได้แก่ *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. terreus*, *Chaetomium cupreum*, *C. globosum*, *Chaetomium* sp.,*Cladosporium cladosporioides*, *Cunninghamella elegans*, *Eupenicillium parvum*, *Mucor* spp., *Myrothecium verrucaria*, *Neosartorya fischeri*, *Paecilomyces lilacinus*, *Phialophora* sp., *Rhizopus stolonifer*, *Sporormiella minima*, *Sordaria fimocola*, *Scytalidium lignicola*, *Talaromyces flavus* และ *Thielavia terricola* พบราสาเหตุโรคพืช 10 สายพันธุ์ จำแนกเป็น 5 สกุล 5 ชนิดได้แก่ *Cercospora* sp., *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum*, *Pestalotiopsis* sp. และ *Phyllachora* sp. และราที่เจริญบนกิ่งไม้ และขอนไม้ พบราใน Class Ascomycetes ได้แก่ *Xylaria*, *Hypoxylon*, *Daldinia* และราใน Class Basidiomycetes ได้แก่ *Ganoderma*, *Hexagonia*, *Lycoperdon*, *Marasmius*, *Microporus*, *Pycnoporus* และ *Shizophyllum* โดยเก็บรักษาสายพันธุ์ราไว้ใน Kasetsart University Fungal Collection (KUFC) ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ และโครงการพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ ประจำปี 2551 เรื่อง "ความหลากหลายของรา coprophilous ascomycetes และการนำไปใช้ประโยชน์ทางการเกษตร" โดยความร่วมมือระหว่างสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษากับสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ผู้วิจัยขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้

เอกสารอ้างอิง

1. จิระเดช แจ่มสว่าง วรรณวิไล อินทนู พัชรา โพธิ์งาม สินชัย ชาตะศิริ. 2545. การพัฒนาชุดตัวตรวจสำหรับจำแนกสปีชีส์ของเชื้อรา *Trichoderma harzianum*. หน้า 165-172. ใน เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 40 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สาขาพืช กรุงเทพฯ,
2. เลขา มาโนช พรพิมล อธิปัญญาคม กัญญา เจริญไทย คนึงนิจ บุศราคำ อรอุมา เจียมจิตต์ ธิดา เดชฮวบ จิตรา เกาะแก้ว และผจงจิต ภูจิญญาณ์. 2547. เชื้อราโรคพืชบนผลไม้ พืชผัก และราดินบริเวณจอมปลวก. หน้า 544-552. ใน เรื่องเต็มการประชุมวิชาการ ครั้งที่ 42 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สาขาพืช กรุงเทพฯ.
3. เลขา มาโนช อรอุมา เจียมจิตต์ ธิดา เดชฮวบ จิตรา เกาะแก้ว อำนาจ เอี่ยมวิจารณ์ ผจงจิต ภูจิญญาณ์. 2551. ความหลากหลายของราบนวัสดุต่างๆ และราที่มีความสำคัญต่อสุขภาพ. หน้า 686-693. ใน เรื่องเต็มการประชุมวิชาการ ครั้งที่ 45 มหาวิทยาลัย เกษตร ศาสตร์ สาขาพืช กรุงเทพฯ.
4. อรอุมา เจียมจิตต์ เลขา มาโนช นิพนธ์ วิสารทานนท์ จิระเดช แจ่มสว่าง และ สันติ พิกุลกลิ่น. 2551. ราบนมูลสัตว์และการเป็นปฏิปักษ์ของรา *Sordaria fimicola* ต่อราสาเหตุโรคพืชในห้องปฏิบัติการ . หน้า 593-600. ใน เรื่องเต็มการประชุมวิชาการ ครั้งที่ 45 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สาขาพืช กรุงเทพฯ.

5. Barron, G.L. 1968. The genera of Hyphomycetes from soil. The William & Wilkins Company. 364 p.
6. Bell, A. 2005. An illustrated guide to the coprophilous Ascomycetes of Australia. CBS: Biodiversity Series 3. 173 pp.
7. Fiedler, Z. and D. Sosnowska. 2007. Nematophagous fungus *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson is also a biological agent for control of greenhouse insects and mite pests. BioControl 52(4): 547-558.
8. Gochenaur, S. 1964. A modification of the immersion tube method for isolating soil fungi. Mycologia 56: 921-923.
9. Hein, S.M., J.B. Gloer, J.A. Scott, and D. Malloch. 1998. Arugosin F: a new antifungal metabolite from the coprophilous fungus Ascodesmis sphaerospora. J. Nat. Prod. 61: 1566-1567.
10. Huang, L. H. and T. Kaneko. 1996. Pyrenomycetes and Loculoascomycetes as sources of secondary metabolites. Journal of Industrial Microbiology 17: 402-416.
11. Jeamjitt, O., L. Manoch, N. Visarathanonth and C. Chamsawarng. 2006a. Diversity and distribution of Hyphomycetes from dung in Thailand. Kasetsart Journal (Natural Sciences) 40: 890-901.
12. Jeamjitt, O., L. Manoch, N. Visarathanonth, C. Chamsawarng, R. Watling and G.P. Sharples. 2006b. Morphological study and distribution of *Sordaria fimicola* from dung and antagonistic effect against plant pathogenic fungi in vitro. Thai Journal of Agricultural Science 39(1-2): 93-101.
13. Jeamjitt, O., L. Manoch, N. Visarathanonth, C. Chamsawarng, R. Watling, G.P. Sharples and A. Kijjoa. 2007. Coprophilous ascomycetes in Thailand. Mycotaxon 100: 115-136.
14. Manoch L, Chana C, Athipunyakom P. 1999. Diversity of coprophilous fungi in Thailand. pp. 675-688. *In* Abstracts of International Conference on Asean Network on Microbial Research. Chiang Mai. Thailand. Nov. 29-Dec. 1, 1999.
15. Soytong, K. 2004. Research and development of microbial products for Bio-agriculture: review article. In Proceeding of the 1st KMITL International Conference on Integration of Science and Technology for Sustainable Development. Bangkok, Thailand. Vol 2: 10-13.
16. Warcup, J.H. 1950. The soil-plate method for isolation of fungi from soil. Nature166: 117-118.
17. Warcup, J.H. and K.F. Baker. 1963. Occurrence of dormant ascospores in soil. Nature 197: 1317-1318.
18. Watanabe, T. 1991. Evaluation of *Sordaria* spp. as biocontrol agents against soil-borne plant diseases caused by Pythium aphanidermatum and Dematophora necatrix. Ann. Phytopath. Soc. Japan 57: 680-685.

19. van Brummelen, J. 1967. A world-monograph of the genus *Ascobolus* and *Saccobolus* (Ascomycetes, Pezizales). Persoonia 1: 1-260.
20. van Brummelen, J. 1969. Studies on Discomycetes-III. Persoonia 5: 225-231.
21. van Brummelen, J. 1977. A new genus of Pezizales from Thailand. Kew Bulletin 31: 617-620.
22. van Geel, B., G.D. Zazula and C.E. Schweger. 2007. Spore of coprophilous fungi from under the Dawson tephra (25,300 ^{14}C years BP), Yukon Territory, northwestern Canada. Palaeogeography, Palaeo-climatology, Palaeoecology 252: 481-485.

ชมรมคณะปฏิบัติงานวิทยาการ อพ.สธ.

ขอมอบเกียรติบัตรรางวัลโปสเตอร์ยอดเยี่ยม

ในการนำเสนอผลงานภาคโปสเตอร์การประชุมวิชาการ "ทรัพยากรไทย : ผันสู่วิถีใหม่ในฐานไทย"

(การประชุมวิชาการของชมรมคณะปฏิบัติงานวิทยาการ อพ.สธ. ครั้งที่ 4)

ให้แก่

อรอุมา เพียซ้าย และ เลขา มาโนช

นำเสนอผลงานโปสเตอร์วิชาการเรื่อง

ความหลากหลายของรามูลสัตว์ ราโรคพืช และราบนขอนไม้ผุ จากอุทยานแห่งชาติหมู่เกาะอ่างทอง

มอบให้ไว้ ณ วันที่ 23 ตุลาคม 2552

ณ ห้องประชุม ศูนย์อนุรักษ์และพัฒนาทรัพยากรภาคตะวันออก สวนสัตว์เปิดเขาเขียว อ.ศรีราชา จ.ชลบุรี

(รองศาสตราจารย์ ดร. สัมฤทธิ์ สิงห์อาษา)

ประธานชมรมคณะปฏิบัติงานวิทยาการ อพ.สธ.