

รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

-
1. **แผนงานวิจัย** : -
 2. **โครงการวิจัย** : ผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศต่อจุลินทรีย์ดินที่มีประโยชน์เพื่อเพิ่มศักยภาพการผลิตพืชในพื้นที่ลุ่มน้ำปาย
 - กิจกรรม** : การศึกษาศักยภาพของจุลินทรีย์ดินที่มีประโยชน์ทางการเกษตรในพื้นที่ที่ได้รับผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศบริเวณลุ่มน้ำปาย
 - กิจกรรมย่อย (ถ้ามี)** : -
 3. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)** : การศึกษาศักยภาพของราดินที่แยกได้จากพื้นที่ที่ได้รับผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศบริเวณลุ่มน้ำปาย
 - ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ)** : Study on Potential of soil fungi Isolated from Areas Effected by Climate Chang in Pai River Basin
 4. **คณะผู้ดำเนินงาน**
หัวหน้าการทดลอง : นางสาวจิตรา เกาะแก้ว กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
ผู้ร่วมงาน : นางสาวอมรรัตน์ ไชยะเสน กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
นายอำนาจ เอี่ยมวิจารณ์ กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

5. บทคัดย่อ

ศึกษาความหลากหลายและประสิทธิภาพของราดินในพื้นที่ทำการเกษตรและพื้นที่ป่าบริเวณลุ่มน้ำปายจังหวัดแม่ฮ่องสอน เก็บตัวอย่างดิน ในช่วงฤดูหนาว(ธันวาคม 2559) ฤดูร้อน(เมษายน 2560) และฤดูฝน(สิงหาคม 2560) นำตัวอย่างดินมาแยกราดิน โดยใช้ 4 วิธี ในการแยก ได้แก่ soil dilution plate, soil plate, alcohol treatment และ heat treatment บนอาหาร Glucose Ammonium Nitrate Agar (GAN) จำแนกชนิดของราดินโดยดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราเช่น ลักษณะของสปอร์และส่วนขยายพันธุ์อื่นๆ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) ผลการศึกษาพบราดินทั้งหมด 350 สายพันธุ์ จำแนกได้เป็น 18 สกุล 20 ชนิด ชนิด ได้แก่ Zygomycota 4 สกุล (*Absidia*, *Gongronella*, *Mucor* และ *Rhizopus*) Ascomycota 13 สกุล(*Aspergillus*, *Eupenicillium*, *Eurotium*, *Fusarium*, *Hamigera*, *Myrothecium*, *Neosartorya*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Talaromyces*, *Trichoderma*, *Verticillium* และ *Xylaria*) Basidiomycota 1 สกุล (*Sclerotium*) ราที่ไม่สร้างสปอร์ (sterile mycelium) เมื่อนำราดินที่แยกได้มาทดสอบประสิทธิภาพการสร้างเอนไซม์ ความสามารถในการย่อยสลายฟอสเฟต การ

สร้างสารเร่งการเจริญเติบโต พบราดินจำนวน 24 สายพันธุ์ สร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้ ราดิน 10 สายพันธุ์สามารถย่อยสลายฟอสเฟตได้ ราดิน 53 สายพันธุ์มีความสามารถในการสร้าง siderophore และพบราดินจำนวน 91 สายพันธุ์มีความสามารถในการสร้าง Indole acetic acid (IAA) เมื่อนำราดินที่แยกได้มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคราพืช 4 ชนิดพบว่ามีราดิน 15 สายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของรา *Rhizoctonia solani* ราดิน 11 สายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของรา *Sclerotium rolfsii* ราดิน 15 สายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของรา *Fusarium oxysporum* และราดิน 24 สายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของรา *Colletotrichum gloeosporioides*

Abstract

The study on diversity and efficiency of soil fungi isolated from agricultural soil and forest soil. The samples were collected during winter (December 2016), summer (April 2017) and rainy seasons (August 2017) from Pai river basin, Mae Hong Son province. Soil dilution plate, soil plate, alcohol treatment and heat treatment were used to isolate soil fungi. A total of 357 isolates of soil fungi comprised of 18 genera 20 species were obtained. These included Zygomycota 4 genera (*Absidia*, *Gongronella*, *Mucor* and *Rhizopus*) Ascomycota 13 genera (*Aspergillus*, *Eupenicillium*, *Eurotium*, *Fusarium*, *Hamigera*, *Myrothecium*, *Neosartorya*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Talaromyces*, *Trichoderma*, *Verticillium* and *Xylaria*) Basidiomycota 1 genera (*Sclerotium*) and sterile mycelium. Three hundred fifty isolates of soil fungi were selected for efficiency test to produced cellulase enzyme, phosphate solubilization, plant growth regulator (siderophore and Indole acetic acid). The result show that 24 isolates produced cellulase enzyme, 10 isolates can solubilized phosphate, 53 isolates produced siderophore and 91 isolates produced Indole acetic acid (IAA). For the antagonistic activity test revealed that 15 isolates could inhibit mycelial growth of *Rhizoctonia solani* , 11 isolates could inhibit *Sclerotium rolfsii*, 15 isolates could inhibit *Fusarium oxysporum* and 24 isolates could inhibit *Colletotrichum gloeosporioides*.

6. คำนำ

ดินเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยของจุลินทรีย์มากมายหลายชนิด ประกอบไปด้วย แบคทีเรีย รา แอคติโนมัยซีท สาหร่าย โปรโตซัว และไวรัส นอกจากนี้แล้วในดินยังมีสัตว์หน้าดิน และแมลงหลายชนิด ซึ่งสิ่งมีชีวิตเหล่านี้มีความสัมพันธ์กันในระบบนิเวศของดิน ดินส่วนใหญ่เกิดจากการสลายตัวและมูลของแร่หินต่าง ๆ โดยอิทธิพลจากธรรมชาติ เช่นความร้อน ความเย็น กระแสน้ำ และการทับถมของซากสิ่งมีชีวิตที่เน่าเปื่อยผุพัง ซึ่งเป็นผลมาจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ดิน จุลินทรีย์เหล่านี้จึงมีบทบาทสำคัญในการเกิดความอุดมสมบูรณ์ของดิน จำนวนของจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในดิน และอาหารที่มีประโยชน์ในดิน ความชื้นของดิน ค่าความเป็นกรดต่าง รวมถึงอุณหภูมิของสิ่งแวดล้อมในดิน ราเป็นจุลินทรีย์ที่พบมากรองลงมาจากแบคทีเรีย มีความสำคัญอย่างมากในการย่อยสลายซาก

พืชซากสัตว์โดยเฉพาะองค์ประกอบที่มีโครงสร้างซับซ้อนและย่อยสลายยากเช่น เซลลูโลส แป้ง ลิกนินได้ดี อีกทั้งเส้นใยของร่ายังสามารถแทงเข้าไปข้างในของวัตถุได้ เป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสทำให้การย่อยสลายมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น โดยสิ่งที่ได้จากการย่อยสลายคือคาร์บอนไดออกไซด์ กรดอินทรีย์ แร่ธาตุต่างๆ เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ซัลเฟอร์ และฮิวมัส ซึ่งเป็นการปลดปล่อยธาตุอาหารและองค์ประกอบทางเคมีกลับคืนสู่ดินทำให้ดินอุดมสมบูรณ์และพืชนำกลับมาใช้ประโยชน์ได้ (Foth, 1990 ; Singer and Munns, 1987) นอกจากนี้การยึดเกาะของเส้นใยและการแตกกิ่งก้านสาขาเป็นกลไกที่ทำให้เกิดแรงดันทำให้เซลล์ของซากพืชแยกออกจากกันง่ายขึ้น ซึ่งนับว่าเป็นข้อได้เปรียบแบบที่เรียกจะเจริญอยู่ที่ผิวสัมผัสเท่านั้น (Garrett, 1963 ; Harley, 1971 ; Richards, 1976) นอกจากนี้ สารเมือกที่มีคุณสมบัติค่อนข้างเหนียวจะเป็นตัวเชื่อมยึดเม็ดดินให้จับตัวกันเป็นก้อนอย่างถาวร (aggregate) และเส้นใย (mycelium) ของเชื้อราจะแผ่กระจายปกคลุมที่ผิวดินทำให้ดินมีความพรุนสามารถดูดซับน้ำได้มากขึ้น (คณาจารย์ภาควิชาพฤกษศาสตร์, 2526 ; Singer and Munns, 1987) นอกจากนี้เชื้อราบางชนิดยังสามารถนำมาใช้เป็นอาหาร เช่น เห็ดกินได้ (edible mushroom) ชนิดต่างๆ เช่น เห็ดฟาง เห็ดนางรม เห็ดหูหนู เห็ดตับเต่า เห็ดโคน ซึ่งเป็นราในกลุ่ม Basidiomycota หรือ *Tuber* (truffles) และ *Morchella* (morel) ซึ่งเป็นราในกลุ่ม Ascomycota ที่นิยมรับประทานและมีราคาแพง ราหลายชนิดสร้างปฏิชีวนะสารทางการแพทย์ เช่น ปฏิชีวนะสารเพนิซิลลิน (penicillin) จากรา *Penicillium notatum* และ *P. chrysogenum* ที่มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์แกรมบวก สารไซโคลสปอริน (cyclosporin) จากรา *Tolyposcladium inflatum* ใช้ในทางการแพทย์โดยกดภูมิคุ้มกันในร่างกาย (immunosuppressant) ในการเปลี่ยนถ่ายอวัยวะ เช่น ไต หัวใจ และรา *Myrothecium verrucaria* สร้างสาร trichothecene มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อมาลาเรีย (Isaka et al., 1999) นอกจากนี้ ยังมีราที่มีรายงานการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพยับยั้งการเจริญของราและแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ซึ่งราเหล่านี้เป็นราที่พบได้ในดินและซากใบพืชที่ร่วงหล่น (เลขา และคณะ, 2549)

ในปัจจุบันเกษตรกรอินทรีย์กำลังได้รับความสนใจเป็นอย่างยิ่งเป็นที่นิยมและยอมรับในหมู่เกษตรกรและผู้บริโภคทำให้ลดปริมาณการนำเข้าสารเคมีกำจัดศัตรูพืช ก่อให้เกิดความสมดุลในธรรมชาติและสภาพแวดล้อม ราดินได้ถูกนำมาใช้ประโยชน์ในการทำการเกษตร เช่น รา *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium moniliforme*) สร้างสาร gibberellin เป็นฮอร์โมนพืชทำให้พืชเจริญดีขึ้น รา *Trichoderma* sp. นำมาใช้ควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี และช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยปุ๋ยหมักเนื่องจากเป็นราที่สร้างเอนไซม์ หลายชนิด (เลขา และคณะ, 2555) การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาศักยภาพของราดิน ที่แยกได้จากพื้นที่ ที่ได้รับผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศในพื้นที่ลุ่มน้ำปาย เพื่อเป็นแนวทางในการนำราดินที่แยกได้จากพื้นที่ดังกล่าวไปใช้ประโยชน์ทางการเกษตร และนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์จากราดินเพื่อใช้ในการเพิ่มศักยภาพการผลิตพืชในระบบนิเวศที่ได้รับผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศ

7. วิธีดำเนินการ

7.1 อุปกรณ์

1. ตัวอย่างราดินที่แยกจากพื้นที่ลุ่มน้ำปาย
2. ตัวอย่างเชื้อสาเหตุโรคพืช
3. สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของราดิน

7.2 วิธีการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างดิน

ทำการเก็บตัวอย่างดินในฤดูหนาว (ช่วงเดือนพฤศจิกายน-ธันวาคม) ฤดูร้อน (ช่วงเดือนมีนาคม-เมษายน) และฤดูฝน (ช่วงเดือนกรกฎาคม-สิงหาคม) จากพื้นที่ 4 แหล่ง คือ 1) พื้นที่ป่าต้นน้ำ 2) ดินพื้นที่ทำการเกษตรต้นน้ำ 3) พื้นที่ป่าปลายน้ำ และ 4) ดินพื้นที่ทำการเกษตรปลายน้ำ โดยขุดดินลึกจากผิวดิน 15 เซนติเมตร ขุดอย่างน้อย 5 หลุม ในพื้นที่ 25 ตารางเมตร ตักดินมาหลุมละ 1 กิโลกรัม นำดินที่ได้มาผสมให้เข้ากัน ตักใส่ถุงพลาสติกประมาณ 2 กิโลกรัม ปิดปากถุงให้แน่น เพื่อนำไปวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ โดยเก็บตัวอย่างดินในปี 2559-2561

2. การแยกราจากดิน

2.1) Soil dilution plate method (Barron, 1968)

ชั่งดิน 1 กรัม ใส่ในน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 9 มิลลิลิตร (หรือใช้ 0.15% water agar) เขย่าให้เข้ากัน ใช้ปิเปตดูดสารละลายดินความเข้มข้น 10^{-1} ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 9 มิลลิลิตร ดูดสารละลายความเข้มข้น 10^{-2} ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในน้ำกลั่นปริมาตร 9 มิลลิลิตร ทำการเจือจางเป็น series ไปจนได้สารละลายความเข้มข้น 10^{-4} และ 10^{-5} ใช้ปิเปตดูดสารละลายแต่ละความเข้มข้น ได้แก่ 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} ใส่ลงในจานเลี้ยงเชื้อจานละ 1 มิลลิลิตร ทำการทดลองความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ เททับด้วยอาหาร glucose ammonium nitrate agar (GAN) ที่มีส่วนประกอบของ rose bengal และ streptomycin หมุนจานเลี้ยงเชื้อเบาๆ แล้วนำไปบ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน ใช้เข็มเขี่ยย้ายเส้นใยรามาเลี้ยงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) และในหลอดอาหารทดลอง (slant PDA) เพื่อการจำแนกชนิด และเก็บรักษาสายพันธุ์บริสุทธิ์ไว้

2.2) Soil plate method (Warcup, 1950)

ใช้ช้อนตักดินประมาณ 0.5-15 มิลลิกรัม ใส่ในจานเลี้ยงเชื้อ แล้วเททับด้วยอาหารวุ้น GAN หมุนจานเลี้ยงเชื้อเบาๆ ให้เมล็ดดินกระจายทั่ว นำไปบ่มเชื้อในที่มืดที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน แล้วดำเนินการทดลองเช่นเดียวกับในข้อ 1.2

2.3) Alcohol treatment method (Warcup and Baker, 1963)

ชั่งดิน 0.3 กรัม ใส่ในหลอดทดสอบที่อบฆ่าเชื้อแล้ว เติม ethyl alcohol 65 % ลงในหลอดให้ท่วมดินโดยให้สูงจากผิวดิน 1-2 เซนติเมตร เขย่าให้กระจาย ทิ้งไว้ 10-15 นาที ริน alcohol ทิ้ง ใช้ช้อนตักดินใส่ในจานเลี้ยงเชื้อ เททับด้วยอาหารวุ้น GAN แล้วดำเนินการทดลองเช่นเดียวกับในข้อ 1.2

2.4) Heat treatment method (Warcup and Baker, 1963)

ชั่งดิน 0.3 กรัม ใส่ในหลอดทดสอบที่อบฆ่าเชื้อแล้ว เติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อลงในหลอดให้ท่วมดิน โดยให้สูงจากดิน 1-2 เซนติเมตร จากนั้นนำไปแช่ใส่ใน water bath ที่อุณหภูมิ 60-80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที รินน้ำออก ใช้ช้อนตักดินใส่ในจานเลี้ยงเชื้อ เททับด้วยอาหารวุ้น GAN แล้วดำเนินการทดลอง เช่นเดียวกับในข้อ 1.2

3. การทดสอบประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ช่วยย่อยสลาย

การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อย่อยสลายเซลลูโลส ตามวิธีการของ Kasana et al. (2008) โดยเพาะเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร Carboxyl methyl cellulose (CMC) agar ที่อุณหภูมิ 28°C เป็นเวลา 3 วัน เทสารละลาย Gram's Iodine ให้ท่วมผิวหน้าอาหารและโคโลนีเชื้อรา เป็นเวลา 5 นาทีแล้ว เทออก จากนั้นคำนวณประสิทธิภาพการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสโดยการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของการเกิดบริเวณใส (clear zone) ในหน่วยเซนติเมตร (ซม.)/เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเชื้อ (ซม.) โดยในการทดสอบนี้ใช้เอนไซม์ cellulase จาก *Aspergillus niger* (Sigma) 10 mg/ml (2.41 Unit/ml) เป็น positive control และใช้น้ำกลั่น เป็น negative control

4. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราในการละลายฟอสเฟตทำการทดลองสายพันธุ์ละ 3 ซ้ำ

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราในการละลายฟอสเฟต (Malviya et al., 2011) เลี้ยงเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5-7 วัน ขึ้นกับความความสามารถในการเจริญของราแต่ละชนิด ทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟอสเฟต ด้วยวิธี spot inoculation บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Pikovskaya's agar บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน จะสังเกตเห็นโซนใสรอบโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการวัดรัศมี ของบริเวณใสและรัศมีของโคโลนี เพื่อนำมาคำนวณหาความสามารถในการละลาย ดังสูตรต่อไปนี้

$$\text{ค่าการละลายฟอสเฟต} = \frac{\text{รัศมีโคโลนี} + \text{รัศมีบริเวณใสรอบโคโลนี}}{\text{รัศมีโคโลนี}}$$

5. การทดสอบศักยภาพในการสร้างสารเร่งการเจริญเติบโตทำการทดลองสายพันธุ์ละ 3 ซ้ำ

5.1 การทดสอบและคัดเลือกราที่สามารถสร้างสาร siderophore บนอาหารแข็งสูตร Chrome azurol S-modified Gaus No.1 (CAS-MGs-1) agar โดยใช้ cork borer ที่ปลอดเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะเส้นใยเชื้อราอายุ 7 วัน ที่เจริญบนอาหาร PDA จากนั้นใช้เข็มเขี่ยย้ายชิ้นวุ้นเชื้อรามาวางบนผิวหน้าอาหารสูตร CAS-MGs-1 agar โดยวางชิ้นวุ้นราบนอาหารทดสอบสามจุดโดยให้มีระยะห่างเท่าๆกัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน สังเกตการเปลี่ยนแปลงสีที่วางราบนอาหารทดสอบและวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีที่เกิดขึ้น (Milagres et al., 1999)

5.2 การทดสอบความสามารถของราในการสร้างสารส่งเสริมการเจริญของพืช Indole acetic acid (IAA) ใช้ cork borer ขนาด ที่ปราศจากเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะเส้นใยราอายุ 7 วัน ที่เจริญ

บนอาหาร PDA จากนั้นใช้เข็มเขี่ย ถ่ายขึ้นวุ้นรา จำนวน 2 ชิ้น มาเลี้ยงในอาหารเหลว สูตร Czapek dox medium เติม 2% L-Tryptophan ที่บรรจุในหลอดทดลองปริมาตร 7 มิลลิลิตร แล้วนำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน จากนั้นเก็บสารละลายส่วนใส โดยนำน้ำเลี้ยงเซลล์มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกสารละลายส่วนใส จากนั้นดูสารละลายส่วนใสไปทดสอบหาปริมาณ IAA โดยทำปฏิกิริยากับสารละลาย Salkowski reagent ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของสีว่าเกิดสีชมพูหรือไม่ หากเกิดสีชมพู แสดงว่ามี การสร้าง IAA (Bric et al., 1991)

6. วิธีการทดสอบความเป็นปฏิปักษ์กับเชื้อราสาเหตุโรคพืชทำการทดลองสายพันธุ์ละ 3 ซ้ำ

เลี้ยงเชื้อราปฏิปักษ์ และเชื้อราสาเหตุโรคพืชในอาหาร PDA เป็นเวลา 2-3 วัน จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะโคโลนีของเชื้อราปฏิปักษ์ และเชื้อราสาเหตุโรคพืชวางบนอาหาร PDA ในจานเลี้ยงเชื้อขนาด 9.0 เซนติเมตร โดยวางห่างจากขอบจานเลี้ยงเชื้อ 2 เซนติเมตร เป็นเวลา 4 วัน หลังจากนั้นนำเชื้อราปฏิปักษ์ที่ต้องการทดสอบมาวางไว้ฝั่งตรงข้ามและห่างจาก ขอบจานเลี้ยงเชื้อ 2 เซนติเมตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นบันทึกผลการยับยั้ง และหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งจากสูตรของ นริศ (2545)

การคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ

เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ (percent inhibition of radial growth-PIRG) คำนวณได้ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง} = \left\{ \frac{R1 - R2}{R1} \right\} \times 100$$

R1 = ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อสาเหตุโรคพืชในจานควบคุม

R2 = ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อสาเหตุโรคพืชในจานทดสอบ

หาค่าเฉลี่ยความยาวรัศมีของโคโลนีแล้วนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง

การบันทึกข้อมูล

1. บันทึกขนาด clear zone
2. บันทึกภาพถ่าย
3. บันทึกประสิทธิภาพการสร้างสารเร่งการเจริญเติบโต การควบคุมเชื้อสาเหตุโรค และการสร้าง เอนไซม์

เวลาและสถานที่: 1 ตุลาคม 2560 – 30 กันยายน 2562
 กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร และพื้นที่ป่าและพื้นที่เกษตรลุ่มน้ำปาย จ. แม่ฮ่องสอน

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

8.1 การเก็บตัวอย่างดิน

ทำการเก็บตัวอย่างดินในช่วงฤดูหนาว (เดือนธันวาคม) ฤดูร้อน (เดือนเมษายน) และฤดูฝน (เดือนกรกฎาคม) จากพื้นที่ 4 แห่ง คือ 1) พื้นที่ป่าปลายน้ำ น้ำ (19° 11' N 97° 59' E) และ 2) ดินพื้นที่ทำการเกษตรปลายน้ำ(19° 11' N 97° 59' E) ที่ ต.ผาบ่อง อ.เมือง จ.แม่ฮ่องสอน 3) ดินพื้นที่ทำการเกษตรต้นน้ำ(19° 23' N 97° 57' E) 4) พื้นที่ป่าต้นน้ำ (19° 23' N 97° 57' E) ที่ ตัวอย่างดินต้นน้ำเก็บที่ บ้านแม่นะ อ.แม่อาย จ.แม่ฮ่องสอน ตัวอย่างดินปลายน้ำเก็บที่ บ้านผาบ่อง ต.ผาบ่อง อ.เมือง จ.แม่ฮ่องสอน โดยตัวอย่างดินที่เก็บจากพื้นที่เกษตรเป็นพื้นที่ปลูกข้าวสลับกับการปลูกถั่วเหลือง ข้อมูลสภาพแวดล้อมพบว่าพื้นที่ป่าปลายน้ำและพื้นที่เกษตรปลายน้ำมีอุณหภูมิดินและอุณหภูมิอากาศต่ำกว่าพื้นที่ป่าต้นน้ำและพื้นที่เกษตรต้นน้ำ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ข้อมูลสภาพอุณหภูมิของตัวอย่างดินที่เก็บในพื้นที่ลุ่มน้ำปายในฤดูต่าง ๆ

พื้นที่	ฤดูหนาว (ธ.ค. 59)		ฤดูร้อน (เม.ย. 60)		ฤดูฝน (ส.ค. 60)	
	อุณหภูมิดิน (°C)	อุณหภูมิอากาศ (°C)	อุณหภูมิดิน (°C)	อุณหภูมิอากาศ (°C)	อุณหภูมิดิน (°C)	อุณหภูมิอากาศ (°C)
ป่าปลายน้ำ	19	24	23	29	26	31
เกษตรปลายน้ำ	19	24	26	31	26	33
เกษตรต้นน้ำ	22	29	27	33	28	34
ป่าต้นน้ำ	22	27	25	31	27	32

8.2. การแยกราจากดิน

เมื่อนำตัวอย่างดินมาแยกราโดยวิธีต่าง ๆ ได้แก่ Soil dilution plate method, Soil plate method , Alcohol treatment method และ Heat treatment method สามารถแยกราดินได้ทั้งหมด 390 สายพันธุ์ นำมาจัดจำแนกตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถจำแนกราดินได้ทั้งหมด 18 สกุล 18 ชนิด แบ่งเป็นราในกลุ่ม Zygomycota 4 สกุล Ascomycota 13 สกุล Basidiomycota 1 สกุล และราที่ไม่สร้างสปอร์ (sterile mycelium) จำนวน 55 สายพันธุ์ (ตารางที่ 2) สกุลที่พบมากในทุกพื้นที่ ราที่พบมากในทุกพื้นที่ ได้แก่ ราที่ไม่สร้างสปอร์ สร้างเพียงเส้นใยรา (Sterile mycelium)พบจำนวน 55 สายพันธุ์ รองลงมาได้แก่รา *Aspergillus niger* (32 สายพันธุ์) *Talaromyces* spp. (30 สายพันธุ์) และ *Neosartorya* spp. (23) ตามลำดับ ราที่พบเฉพาะในพื้นที่ทำการเกษตรได้แก่ รา *Fusarium solani*, *Sclerotium rolfsii* และ *Trichoderma harzianum* ซึ่งราทั้ง 3 ชนิดที่พบในพื้นที่ทำการเกษตรนี้มีความสำคัญกับการ

ทำการเกษตรมากโดยรา *F. solani* และ *S. rolfii* พบเป็นราสาเหตุโรคพืชที่สำคัญได้แก่โรคเหี่ยวและโรครากเน่าโคนเน่า เป็นต้น ส่วนรา *T. harzianum* เป็นราที่สามารถยับยั้งราสาเหตุโรคพืชในดินได้หลายชนิด เมื่อเปรียบเทียบในแต่ละพื้นที่พบว่าดินในพื้นที่ป่ามีจำนวนชนิดของราดินมากกว่าพื้นที่ทำการเกษตร (ตารางที่ 2) อาจกล่าวได้ว่าพื้นที่ทำเกษตรในปัจจุบันที่มีการใช้สารเคมีจำนวนมากในการป้องกันกำจัดศัตรูพืชต่าง ๆ อาจส่งผลให้ราดินบางชนิดที่ไม่สามารถปรับตัวให้อยู่รอดได้และมีจำนวนลดน้อยลงหรืออาจหายไปจากพื้นที่นั้น

ราดินกลุ่ม Zygomycota เป็นราที่มีประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรมอย่างมาก เช่น รา *Rhizopus* ที่มีรายงานว่าสามารถใช้ผลิต tempe จากถั่วเหลืองได้ (นิยม, 2542) นอกจากนี้ยังมีรายงานการสร้างสารที่เป็นประโยชน์ทางอุตสาหกรรมจากราในกลุ่ม Zygomycota เช่น glucose, glutamic acid, serine, glycine และ glutamine (เลขา และคณะ, 2548) รา *Mucor* sp. มีบทบาทในการย่อยสลายอินทรีย์วัตถุในธรรมชาติ (Domsch et al., 1993) และพบว่าเป็น hyperparasite ของรา *Fusarium solani*, *Sclerotium borealis* และ *Claviceps purpurea* และพบเป็นปรสิตเจริญบนตัวแมลงชนิดต่าง ๆ (คณิงนิจ, 2545)

รา Ascomycota พบจำนวน 10 สกุล ส่วนใหญ่อยู่ในระยะสืบพันธุ์แบบไม่ใช้เพศ (anamorph) ราที่พบมากที่สุด ได้แก่ *Aspergillus niger* ราชนิดนี้นำไปใช้ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรมการผลิตกรดอินทรีย์หลายชนิด (นภา, 2540) มีรายงานว่าราในกลุ่ม *Aspergillus* sp. มีความสามารถในการละลายฟอสเฟตได้ดีจากการทดลองครั้งนี้พบมีรา *A. niger* 2 สายพันธุ์ที่สามารถละลายฟอสเฟตได้ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Nopparat et al., 2007 ที่พบรา *A. niger* จำนวน 2 สายพันธุ์ที่แยกได้จากดินใน จ.กาญจนบุรี มีความสามารถในการละลาย tricalcium phosphate ได้ในระดับดี ราที่พบมากรองลงมาได้แก่ *Talaromyces* spp. ราที่สร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิด และมีบทบาทสำคัญในการสร้างเอนไซม์ phosphatase เพื่อย่อยสลาย tricalcium phosphate การทดลองครั้งนี้พบรา *Talaromyces* spp. จำนวน 3 สายพันธุ์ที่สามารถละลายฟอสเฟต บนอาหาร Pikovskaya ได้ จากรายงานของ Stefanoni Rubio et al., 2015 พบรา *Talaromyces flavus* ที่สามารถสร้างเอนไซม์ Phosphatase ในการละลายฟอสเฟต มีรายงานว่าราในสกุลนี้ยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคพืชหลายชนิดเช่น *Phytophthora parasitica* สาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าของส้ม *Fusarium oxysporum* สาเหตุโรคเหี่ยวในพืชหลายชนิด *Colletotrichum capsici* สาเหตุโรคแอนแทรกโนสของพริกและ *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรกโนสของมะม่วง กัลย มะละกอ (Dethoup, 2007) รา *Neosartorya* spp. พบทั้งหมด 23 สายพันธุ์พบมากรองจากรา *Talaromyces* spp. จำแนกได้ 2 ชนิด ได้แก่ รา *Neosartorya fischeri* และ *N. spinosa* ราในสกุลนี้มีรายงานการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิดเช่น roquefortine, meleagrins, fumagillin, auranthine, neosartorin, palitanin, pyripyropenes, tryptoquivaline, tryptoquivalone (Samson et al., 2007) ในประเทศไทย Eamvijan et al. (2009) แยกรา *Neosartorya* จากดินแหล่งต่าง ๆ พบรา *Neosartorya* 9 ชนิด ได้แก่ *N. fischeri*, *N. graba*, *N. spinosa*, *N. hiratsukae*, *N. takakii*, *N. tatenoi* และ *Neosartorya* spp. เมื่อนำมาศึกษาความเป็นปฏิปักษ์กับราสาเหตุโรคพืชพบว่า *Neosartorya* spp.

ทุกสายพันธุ์สามารถยับยั้งการเจริญของรา *Bipolaris maydis*, *Colletotrichum capsici*, *C. gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum* และ *Pestalotiopsis* sp. ราตินกลุ่ม Ascomycota เป็นราที่มีความสำคัญมากทางด้านการเกษตร เช่น รา *Trichoderma harzianum* ใช้ในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี เช่น โรครากเน่าโคนเน่าที่เกิดจากรา *Pythium*, *Phytophthora*, *Sclerotium* และ *Rhizoctonia* (จิระเดช, 2552) รา *T. virens* สามารถยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคพืช หลายชนิด เช่น *F. oxysporum*, *Pythium aphanidermatum* เนื่องจากการสร้างเอนไซม์โคติเนสและกลูคาเนส (คณิงนิจ, 2545; จิระเดช, 2552) ราชนิดอื่นที่น่าสนใจ ได้แก่ ราในสกุล *Aspergillus* spp. เนื่องจากมีประโยชน์ในทางอุตสาหกรรม เช่น การผลิตกรดอินทรีย์ต่าง ๆ เช่นรา *Aspergillus niger* ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส อะไมเลส เพคติเนส ไลเปส และโปรตีเอส ได้ (อาภรณ์ และไตรวิทย์, 2537; Smith and Moss, 1985; เลอลักษณะ และคณะ, 2535; มานะ, 2531) การผลิต เอนไซม์ไซลานเนส และไซลอสซิเดส ที่ใช้ในการแยกสกัดไซแลนจากเซลลูโลส ได้มาจาก รา *Aspergillus fumigatus* (วิเชียร และคณะ, 2537) ราที่สำคัญอีกชนิดได้แก่รา *Myrothecium verrucaria* ซึ่งพบในดินป่าแยกโดยวิธี soil plate method ราชนิดนี้มีรายงานการสร้างสาร trichothecene ที่มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อมาลาเรีย (Isaka *et al.*, 1999)

ตารางที่ 2 จำนวนสกุลและชนิดของราดินที่แยกด้วยวิธีการต่าง ๆ จากตัวอย่างดินพื้นที่ลุ่มน้ำปาย จ.แม่ฮ่องสอน

ลำดับ	ชนิด/สกุล	วิธีการแยก	จำนวน (สายพันธุ์)	
			พื้นที่เกษตร	พื้นที่ป่า
1	<i>Absidia corymbifera</i>	sd, sp	2	2
2	<i>Gongronella butleri</i>	sd, sp	2	3
3	<i>Mucor</i> spp.	sd, sp	5	5
4	<i>Rhizopus stolonifer</i>	sd,sp,alc	3	7
5	<i>Aspergillus flavus</i>	sd, sp, alc, ht	7	10
6	<i>Aspergillus fumigatus</i>	sd, sp, alc, ht	8	7
7	<i>Aspergillus niger</i>	sd, sp, alc, ht	15	17
8	<i>Aspergillus terreus</i>	sd, alc, ht	8	7
9	<i>Eupenicillium</i> spp	alc, ht	2	3
10	<i>Eurotium</i> spp.	alc, ht	3	3
11	<i>Fusarium</i> spp	sd, sp	11	8
12	<i>Fusarium solani</i>	sd, sp	5	-
13	<i>Hamigera avellanea</i>	alc, ht	2	3
14	<i>Myrothecium verucaria</i>	sp	-	8
15	<i>Neosartorya</i> spp.	sd, sp, alc, ht	11	12
16	<i>Neosartorya ficheri</i>	sd, sp, alc, ht	5	8
17	<i>Neosartorya spinosa</i>	sd, sp, alc, ht	5	5
18	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	sd, sp, alc, ht	6	10
19	<i>Penicillium</i> spp.	sd, sp, alc, ht	5	5
20	<i>Sclerotium rolfsii</i>	sp	4	-

21	<i>Talaromyces</i> spp.	sd, sp, alc, ht	12	18
22	<i>Talaromyces trachyspermus</i>	sd, sp, alc, ht	2	3
23	<i>Talaromyces macrosporus</i>	sd, sp, alc, ht	2	2
24	<i>Talaromyces flavus</i>	sd, sp, alc, ht	7	4
25	<i>Trichoderma</i> sp.	sp, sd	9	5
26	<i>Trichoderma harzianum</i>	sp, sd	15	-
27	<i>Xylaria</i> spp.	sp, sd	6	10
28	<i>Verticillium</i> sp.	sd, sp	4	4
29	Sterile mycelium	sd, sp, alc, ht	27	28

*soil dilution plate = sd, soil plate = sp, alcohol treatment=alc และ heat treatment = ht

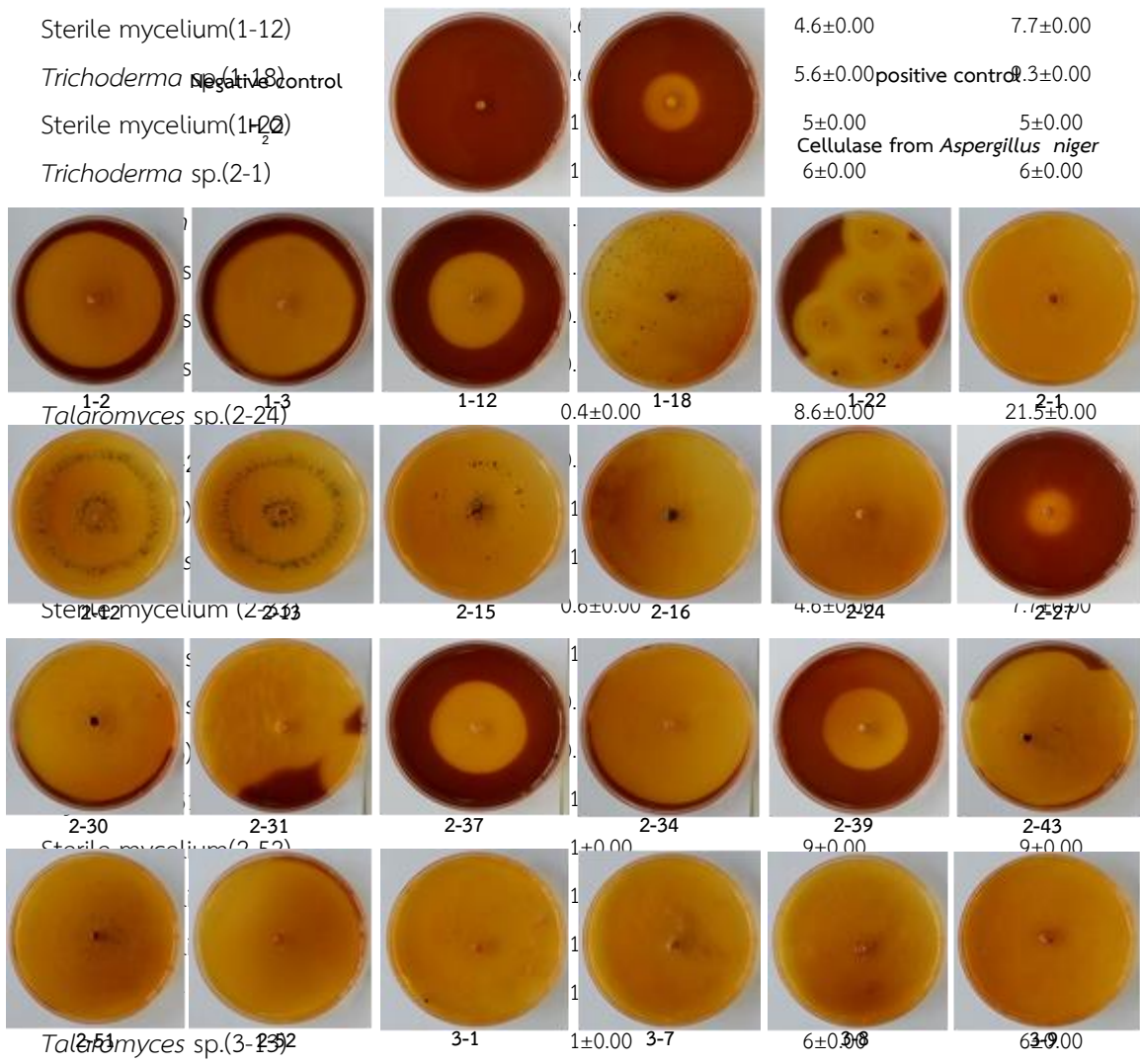
8.3 การทดสอบประสิทธิภาพของราดิน

1. การทดสอบประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อย่อยเซลลูโลส

การคัดแยกราดินที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้ การทดลองในครั้งนี้พบราดินจำนวน 24 สายพันธุ์ที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อย่อยเซลลูโลสได้ ในจานเลี้ยงเชื้อบนอาหาร Carboxyl methyl cellulose (CMC) agar ตามวิธีการของ Kasana et al. (2008) โดยเปรียบเทียบกับเอนไซม์เซลลูเลสที่สกัดจากรา *Aspergillus niger* (Sigma) 10 mg/ml (2.41 Unit/ml) ซึ่งมีค่าการย่อยเซลลูโลสอยู่ที่ 9 ราดินที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้นับว่ามีบทบาทสำคัญในกระบวนการย่อยสลายปุ๋ยหมัก (Dindal, 1978) การศึกษาราดิน ที่ผลิตเซลลูเลสเพื่อย่อยสลายเซลลูโลสจึงมีความสำคัญมากต่อการทำปุ๋ยหมักที่ใช้เซลลูโลสเป็นวัสดุหมัก ซึ่งราดินที่คัดแยกได้สามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นปุ๋ยจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชเช่นเร่งการงอกของรากเมล็ดพืช ในรูปหัวเชื้อปุ๋ยหมักซึ่งอาจช่วยให้ระยะเวลาในการทำปุ๋ยหมักสั้นลง เช่นการทดลองของ Wang et al. (2011) ศึกษาดัชนีการงอกของเมล็ดพันธุ์ผักกระหล่ำปลีที่เพาะในปุ๋ยหมักที่มีการผสมเชื้อรา *Penicillium expansum* พบว่าดัชนีการงอกสูงถึง 150% การทดสอบครั้งนี้พบราดินจำนวน 5 สายพันธุ์ที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีกว่าเอนไซม์เซลลูเลสที่สกัดจากรา *Aspergillus niger* ได้แก่ สายพันธุ์ รา *Talaromyces* sp. สายพันธุ์ 2-24, รา *Trichoderma* spp. สายพันธุ์ 2-15, 2-16, รา *Aspergillus niger* สายพันธุ์ 2-43 และ รา *Trichoderma* sp. สายพันธุ์ 1-18 โดยมีค่าการย่อยเซลลูโลสอยู่ที่ 21.5, 20, 20, 14.3 และ 9.3 ตามลำดับผลการทดสอบดังแสดงใน ตารางที่ 3 ภาพที่ 1

ตาราง 3 ประสิทธิภาพการย่อยสลายเซลลูโลสของราดินที่แยกจากพื้นที่ลุ่มน้ำปาย จ. แม่ฮ่องสอน

สายพันธุ์ราดิน	เส้นผ่านศูนย์กลาง โคโลนี (ซม.)	เส้นผ่าศูนย์กลาง บริเวณใส (ซม.)	ประสิทธิภาพ การย่อยเซลลูโลส
Negative control	0±0.00	0±0.00	0±0.00
Positive control	0.3±0.00	1.2±0.00	9±0.00
<i>Aspergillus niger</i> (1-2)	0.6±0.06	2.5±0.06	8.3±0.69
Sterile mycelium(1-3)	7.4±0.00	1.4±0.00	5.3±0.00



ภาพที่ 1 ประสิทธิภาพการย่อยสลายเซลลูโลสของราดิน 24 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากพื้นที่ลุ่มน้ำปาย บนอาหาร Cellulose congo red agar บ่มที่อุณหภูมิห้อง

2. การทดสอบประสิทธิภาพของราดินในการละลายฟอสเฟต

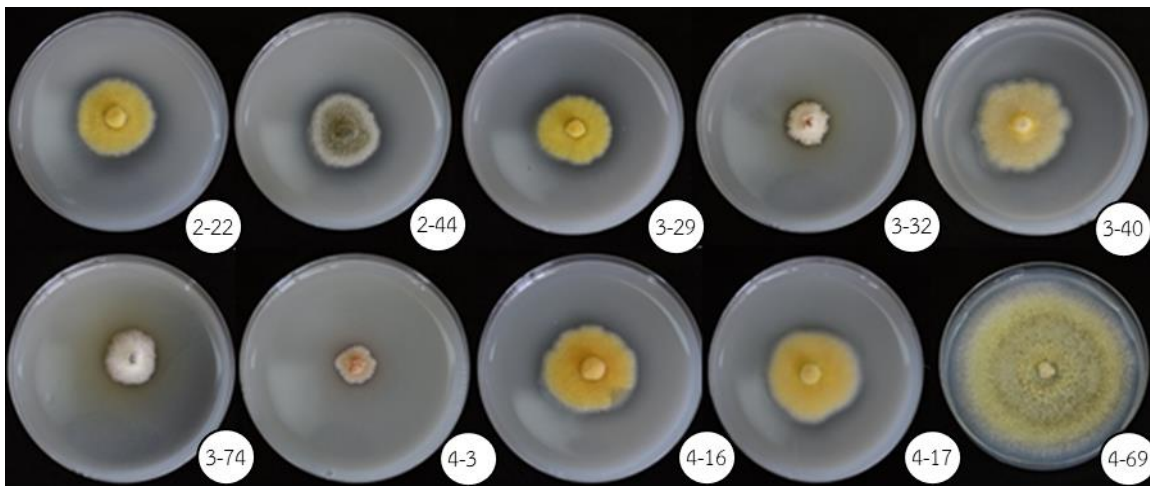
ราดินที่สามารถละลายฟอสเฟตได้โดยทั่วไปจะช่วยทำให้ฟอสเฟตที่อยู่ในดินอยู่ในรูปที่พืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ จากการทดลองครั้งนี้พบราดินจำนวน 10 สายพันธุ์ได้แก่ รา *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 2-44, รา *Talaromyces* sp. สายพันธุ์ 3-29, รา sterile mycelium สายพันธุ์ 3-32 และ รา *Aspergillus niger* สายพันธุ์ 4-3 สามารถละลายฟอสเฟตได้มากที่สุดเท่ากับ 1.10 (ตารางที่ 4 ภาพที่ 2) ซึ่งพบเป็นราในสกุล *Aspergillus* และ รา *Talaromyces* ซึ่งเป็นระยะสืบพันธุ์แบบใช้เพศของรา *Penicillium* โดยราทั้งสองชนิดนี้มีรายงานว่าสามารถย่อยสลายฟอสเฟตได้ (Nopparat et al., 2007) จากการศึกษาของ Zhang et al., 2018 พบว่า *Talaromyces auratiacus* และ รา *Aspergillus neoniger* มีความสามารถในการละลายฟอสเฟต และพบว่าราทั้งสองชนิดนี้สามารถอยู่รอดได้ในสภาพแวดล้อมที่เป็นกรดและเชื่อว่าทั้งสองชนิดมีความสามารถอย่างมากในการปลดปล่อย P ที่ละลายน้ำได้เชื่อว่าทั้งสองมีศักยภาพในการประยุกต์ใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมได้

นอกจากนี้ยังพบราที่ไม่สร้างสปอร์ (sterile mycelium) สามารถละลายฟอสเฟตได้เช่นเดียวกัน ราดินที่สามารถละลายฟอสเฟตได้อยู่ในระดับ 1-2 (ระดับกิจกรรมการละลายตะกอน CaHPO_4 ของราดินตามความกว้างของวงใส) โดยมีค่าน้อยกว่า 6 มิลลิเมตร โดยการประเมินระดับกิจกรรมการละลายตะกอน CaHPO_4 ของจุลินทรีย์ตามความกว้างของวงใส ที่ประเมินได้ (กรมวิชาการเกษตร, 2551) ดังนี้

ระดับ 1	0	มิลลิเมตร	ระดับ 2	0-3	มิลลิเมตร
ระดับ 3	3-6	มิลลิเมตร	ระดับ 4	6-9	มิลลิเมตร
ระดับ 5	มากกว่า 9	มิลลิเมตร			

ตารางที่ 4 ประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟต (CaHPO_4) ของราดินที่แยกจากพื้นที่ลุ่มน้ำปาย จ. แม่ฮ่องสอน

สายพันธุ์	เส้นผ่านศูนย์กลาง โคโลนี (ซม.)	รัศมีโคโลนี (ซม.)	การเกิดวงใส (ซม.)	ค่าการละลาย ฟอสเฟต
<i>Talaromyces</i> sp.(2-22)	4.22 ±0.43	2.11± 0.22	0.17 ±0.06	1.07 ±0.03
<i>Penicillium</i> sp.(2-44)	3.65 ±0.05	1.83 ±0.03	0.10 ±0.00	1.10 ±0.00
<i>Talaromyces</i> sp.(3-29)	3.68 ±0.14	1.84 ±0.07	0.10 ±0.00	1.10 ±0.00
Sterile mycelium (3-32)	2.10 ±0.15	1.05 ±0.08	0.10 ±0.00	1.10 ±0.01
<i>Talaromyces</i> sp.(3-40)	4.03 ±0.16	2.02 ±0.08	0.10 ±0.00	1.03 ±0.00
Sterile mycelium(3-74)	2.43 ±0.12	1.22 ±0.06	0.10 ±0.00	1.10 ±0.00
<i>A. niger</i> (4-3)	1.82 ±0.08	0.91 ±0.04	0.10 ±0.00	1.10 ±0.00
<i>Trichoderma</i> sp.(4-16)	4.05 ±0.09	2.03 ±0.04	0.10 ±0.00	1.03 ±0.00
<i>Trichoderma</i> sp.(4-17)	4.67 ±0.43	2.33 ±0.21	0.17 ±0.06	1.07 ±0.02
<i>A. niger</i> (4-69)	8.27 ±0.03	4.13 ±0.01	0.17± 0.06	1.00 ±0.01



ภาพที่ 2 ลักษณะของราดินที่สามารถย่อยสลายฟอสเฟตบนอาหาร Pikovskaya's agar

3. การทดสอบศักยภาพในการสร้างสารเร่งการเจริญเติบโต

ธาตุเหล็กในดินส่วนใหญ่อยู่ในรูปที่พืชไม่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ สาร Siderophores คือสารที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นเพื่อทำหน้าที่นำเข้าสู่ธาตุอาหารและส่งผลพลอยได้ให้แก่พืช โดยช่วยให้พืชดูดซึมสาร siderophore ที่จับกับธาตุอาหารโดยเฉพาะธาตุเหล็กได้เพิ่มขึ้น (Radzki et al., 2013) นอกจากนี้จะช่วยในการนำเข้าสู่ธาตุอาหารเสมือนเป็นตัวช่วยในการนำเข้าไปให้แก่พืชแล้ว สาร siderophore ยังช่วยป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อก่อโรคพืชอีกด้วย โดยสาร siderophore จะแย่งจับธาตุเหล็กทำให้เชื้อก่อโรคขาดธาตุเหล็กและไม่สามารถเพิ่มจำนวนจนก่อโรคในพืชได้ การทดสอบประสิทธิภาพของราดินในการสร้างสาร siderophore พบราดินจำนวน 53 สายพันธุ์มีความสามารถในการสร้างสาร siderophore สายพันธุ์ที่สร้าง siderophore ได้มากที่สุดได้แก่รา *Aspergillus niger* สายพันธุ์ 4-69 มีค่าการสร้าง siderophore เท่ากับ 3.5 รองลงมาได้แก่รา *Neosartorya* sp. สายพันธุ์ 4-20 และ *A. niger* สายพันธุ์ 4-26 มีค่าการสร้าง siderophore เท่ากับ 3.0 ดังแสดงในตารางที่ 5 ภาพที่ 3

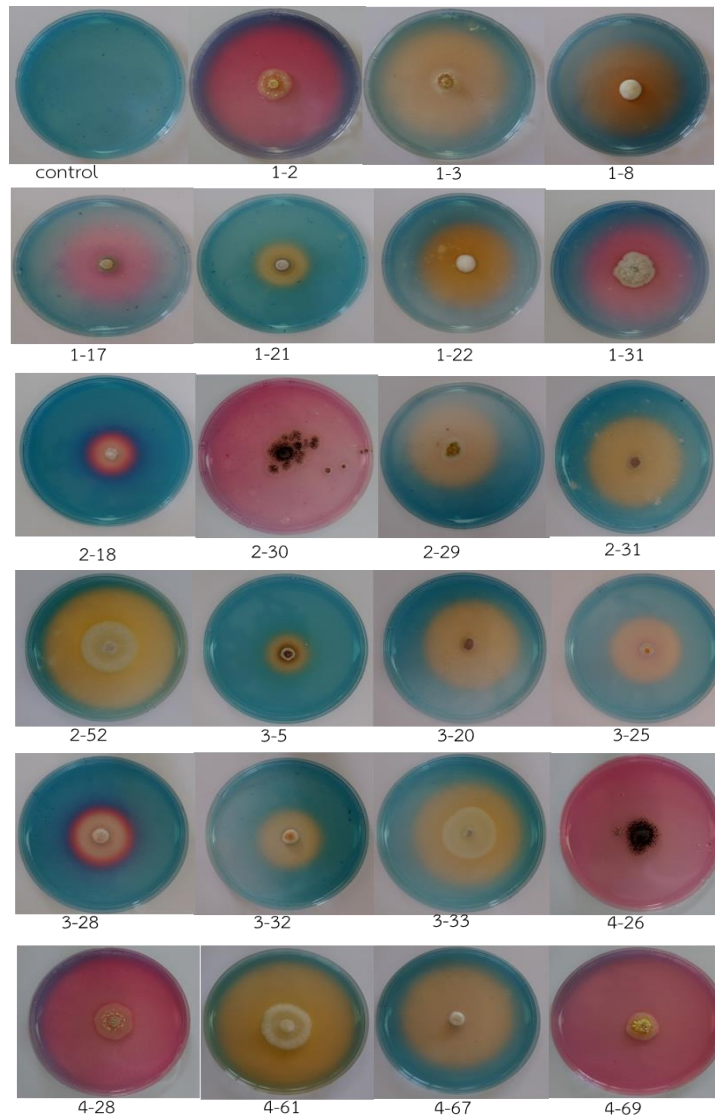
สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth regulating chemicals) ที่จัดอยู่ในกลุ่มออกซินมีอยู่หลายชนิด สารออกซินชนิดแรกที่ค้นพบคือ indole-3-acetic acid (IAA) ซึ่งเป็นสารที่พืชสามารถสร้างได้เอง (ลิลลี่ และคณะ, 2549) การสกัดสาร IAA จากพืชเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ทำได้ยากเนื่องจาก IAA สลายตัวได้ง่ายและรวดเร็วมากจึงไม่สะดวกต่อ การนำมาใช้ประโยชน์ (วันเพ็ญ, 2548) การใช้จุลินทรีย์ที่ผลิตกรดอินโดลอะซีติก (IAA) ในการส่งเสริมการเติบโตของพืชมีการศึกษากันอย่างกว้างขวาง ข้อดีของออกซินคือเพิ่มความทนทานและความสามารถในการฟื้นฟูสภาพแวดล้อมของพืชโดยการกระตุ้นการเจริญที่ปลายรากทำให้มีพื้นที่ผิวรากเพิ่มขึ้นซึ่งส่งผลให้เพิ่มความสามารถในการลำเลียงธาตุอาหารหรือดูดซึมสารมลพิษรวมทั้งการหลั่งสารจากรากพืชด้วย (ชนิษฐา และวารารณ, 2554) มีราหลายชนิดที่สามารถสร้าง IAA ได้เช่นกัน โดยเฉพาะราในสกุล *Fusarium*, *Rhizopus*, *Aspergillus* และ *Trichoderma* เป็นต้น (Ma et al., 2011) รายงานวิจัยของ Chutima and Lumyong (2012) พบว่าราที่คัดแยกจากรากของกล้วยไม้ไม่สามารถสร้าง IAA ที่ส่งเสริมการเติบโตของรากและยอดของต้นกล้วยไม้ได้นอกจากนี้ยังส่งเสริม การงอกของเมล็ดข้าวโพด และเพิ่มความยาวของรากของข้าวโพดได้ การศึกษาครั้งนี้พบราดินจำนวน 91 สายพันธุ์มีความสามารถในการสร้าง Indole acetic acid (IAA) โดยมีจำนวน 18 สายพันธุ์ที่สามารถสร้าง IAA ในระดับสูง (+++) และ 21 สายพันธุ์สามารถสร้าง IAA ในระดับปานกลาง (++) (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 5 ประสิทธิภาพการสร้างสาร Siderophore ของราดินที่แยกได้จากพื้นที่ลุ่มน้ำปาย จ.แม่ฮ่องสอน

สายพันธุ์	เส้นผ่านศูนย์กลาง โคโลนี (ซม.)	รัศมีโคโลนี (ซม.)	ค่าการเกิดวงใส (ซม.)
Sterile mycelium (1-1)	1.1±0.00	0.55±0.00	1.0±0.00
<i>Aspergillus niger</i> (1-2)	1.73±0.06	0.87±0.03	2.67±0.64
Sterile mycelium(1-3)	1.26±0.06	0.63±0.03	2.17±0.17
<i>Neosartorya</i> sp.(1-5)	0.9±0.00	0.45±0.00	1.0±0.00
<i>A. fumigatus</i> (1-7)	0.9±0.00	0.45±0.00	1.13±0.23
<i>Penicillium</i> sp.(1-8)	1.17±0.06	0.58±0.03	2.0±0.06
Sterile mycelium (1-9)	1.1±0.00	0.55±0.00	0.4±0.00
<i>Neosartorya</i> sp.(1-10)	0.9±0.00	0.45±0.00	0.5±0.00
<i>A. fumigatus</i> (1-13)	1.2±0.00	0.6±0.00	0.5±0.00
Sterile mycelium (1-17)	1.4±0.10	0.7±0.05	1.57±0.15
Sterile mycelium(1-20)	1.0±0.00	0.5±0.00	0.5±0.00
Sterile mycelium (1-21)	1.1±0.00	0.55±0.00	0.7±0.00
Sterile mycelium (1-22)	1.1±0.00	0.55±0.00	1.93±0.23
<i>A. flavus</i> (1-30)	1.57±0.40	0.78±0.20	1.8±0.40
<i>Xylaria</i> sp. (1-31)	2.0±0.17	1±0.09	1.8±0.17
<i>Trichoderma</i> sp.(2-1)	0.9±0.00	0.45±0.00	0.5±0.00
Sterile mycelium (2-2)	1.0±0.00	0.5±0.00	0.6±0.00
<i>A. terreus</i> (2-18)	0.7±0.17	0.35±0.09	0.5±0.17
<i>Talaromyces</i> sp.(2-24)	0.73±0.06	0.4±0.03	0.4±0.06
<i>A. niger</i> (2-29)	0.8±0.00	0.4±0.00	1.1±0.20
<i>A. niger</i> (2-30)	2.0±0.00	1±0.00	3.0±0.00
<i>Paecilomyces lilacinus</i> (2-31)	0.6±0.00	0.3±0.00	2.47±0.12
Sterile mycelium (2-33)	0.6±0.00	0.3±0.00	0.7±0.00
<i>Neosartorya</i> sp.(2-39)	1.43±0.55	0.85±0.28	0.97±1.36
<i>Neosartorya</i> sp.(2-42)	1.23±0.00	0.62±0.00	0.77±0.00
<i>A. niger</i> (2-43)	0.8±0.17	0.4±0.09	0.6±0.89
Sterile mycelium (2-52)	2.7±0.26	1.35±0.13	2.23±0.55

ตารางที่ 5(ต่อ)

สายพันธุ์	เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (ซม.)	รัศมีโคโลนี (ซม.)	ค่าการเกิดวงใส (ซม.)
Sterile mycelium (2-81)	0.73±0.21	0.37±0.06	0.77±0.76
Sterile mycelium(2-82)	2.46±0.06	1.23±0.03	3.0±0.06
Sterile mycelium (3-1)	1.1±0.10	0.55±0.05	1.57±0.71
Sterile mycelium (3-6)	0.87±0.06	0.43±0.03	0.73±0.15
Sterile mycelium (3-7)	1.43±0.06	0.72±0.03	0.70±0.06
<i>Neosartorya</i> sp.(3-19)	0.8±0.10	0.4±0.05	0.60±0.46
<i>Paecilomyces lilacinus</i> (3-20)	0.6±0.00	0.3±0.00	1.63±1.63
<i>Neosartorya</i> sp.(3-25)	0.7±0.00	0.35±0.00	1.37±0.23
Sterile mycelium (3-32)	0.7±0.00	0.32±0.00	1.00±0.40
Sterile mycelium (3-33)	2.67±0.15	1.33±0.08	1.27±0.26
<i>Talaromyces</i> sp.(3-48)	1.63±0.06	0.82±0.03	0.5±0.06
Sterile mycelium (3-72)	1.0±0.00	0.5±0.00	0.53±0.23
Sterile mycelium(3-74)	1.27±0.06	0.63±0.03	1.03±0.15
<i>Talaromyces</i> sp.(3-53)	0.8±0.00	0.4±0.00	0.97±0.50
Sterile mycelium(3-28)	1.93±0.06	0.97±0.03	0.5±0.06
<i>A. niger</i> (4-3)	0.6±0.00	0.3±0.00	1.77±1.10
<i>Eupenicillium</i> sp.(4-4)	1.13±0.06	0.57±0.03	1.07±0.29
<i>Neosartorya</i> sp.(4-5)	1.13±0.06	0.57±0.03	0.6±0.06
<i>Talaromyces</i> sp.(4-9)	1.1±0.00	0.55±0.00	1.0±0.00
<i>Neosartorya</i> sp.(4-20)	0.80±0.00	0.4±0.00	1.47±0.50
<i>A. niger</i> (4-26)	2.43±0.06	1.22±0.03	3.0±0.06
<i>T. harzianum</i> (4-28)	2.07±0.06	1.03±0.03	3.0±0.06
<i>A. niger</i> (4-49)	1.27±0.38	0.63±0.19	2.0±0.38
Sterile mycelium (4-61)	2.63±0.06	1.32±0.03	2.5±0.06
<i>Eupenicillium</i> sp.(4-67)	0.9±0.00	0.45±0.00	2.4±0.00
<i>A. niger</i> (4-69)	1.63±0.12	0.82±0.06	3.5±0.12



ภาพที่ 3 ลักษณะของราดรินที่สร้างสาร siderophore บนอาหาร Chrome azurol S-modified Gaus No.1 (CAS-MGs-1) agar

ตารางที่ 6 ประสิทธิภาพการสร้างสาร Indole acetic acid (IAA) ของราดินที่แยกได้จากพื้นที่ลุ่มน้ำปาย จ.แม่ฮ่องสอน

สายพันธุ์	สีชมพู	สายพันธุ์	สีชมพู	สายพันธุ์	สีชมพู
Sterile mycelium (1-1)	+	Sterile mycelium (2-52)	+++	<i>Xylaria</i> sp.(3-43)	+
<i>Aspergillus niger</i> (1-2)	++	<i>Xylaria</i> sp.(2-58)	++	<i>Talaromyces</i> sp.(3-48)	+
Sterile mycelium(1-3)	++	Sterile mycelium (2-59)	+	Sterile mycelium (3-52)	+
<i>A. fumigatus</i> (1-7)	+	<i>Hamigera avellanea</i> (2-60)	+	<i>Talaromyces</i> sp. (3-53)	+++
<i>Penicillium</i> sp.(1-8)	+	<i>Neosartorya</i> sp.(2-64)	++	Sterile mycelium (3-58)	+
Sterile mycelium (1-9)	+++	Sterile mycelium (2-65)	++	Sterile mycelium (3-59)	+
<i>Neosartorya</i> sp.(1-10)	+	<i>A. terreus</i> (2-71)	+	Sterile mycelium (3-64)	+
<i>A. fumigatus</i> (1-13)	+	Sterile mycelium (2-79)	++	Sterile mycelium(3-74)	+
<i>Xylaria</i> sp.(1-14)	+	Sterile mycelium (2-81)	++	<i>A. niger</i> (4-3)	+
Sterile mycelium(1-20)	+++	Sterile mycelium(2-82)	+++	<i>Neosartorya</i> sp.(4-5)	+
Sterile mycelium (1-21)	++	<i>A. terreus</i> (2-83)	++	<i>Eupenicillium</i> sp.(4-13)	+
Sterile mycelium (1-22)	+	<i>Rhizopus stolonifer</i> (2-84)	++	Sterile mycelium (4-18)	+
Sterile mycelium (1-25)	+	Sterile mycelium(2-85)	++	Sterile mycelium (4-19)	+
<i>A. flavus</i> (1-30)	+++	Sterile mycelium(2-88)	++	<i>Neosartorya</i> sp.(4-20)	+
<i>Trichoderma</i> sp.(2-1)	+	Sterile mycelium (3-1)	+	Sterile mycelium (4-21)	++
Sterile mycelium (2-2)	+	Sterile mycelium (3-6)	+++	<i>Neosartorya</i> sp.(4-23)	+
<i>Hamigera avellanea</i> (2-10)	+	Sterile mycelium (3-7)	+	<i>A. niger</i> (4-26)	+++
<i>A. terreus</i> (2-18)	+++	<i>Talaromyces</i> sp.(3-8)	+++	Sterile mycelium (4-27)	+
Sterile mycelium (2-21)	++	<i>Talaromyces</i> sp.(3-13)	+++	<i>T. harzianum</i> (4-28)	++
<i>Talaromyces</i> sp.(2-22)	+	<i>Paecilomyces lilacinus</i> (3-20)	+	<i>Trichoderma</i> sp.(4-29)	+++
<i>Talaromyces</i> sp.(2-24)	+	<i>Xylaria</i> sp.(3-22)	+	<i>Trichoderma</i> sp.(4-34)	+
<i>Xylaria</i> sp.(2-27)	+++	<i>Neosartorya</i> sp.(3-25)	++	Sterile mycelium (4-43)	++
<i>A. niger</i> (2-29)	++	<i>Verticillium</i> sp.(3-26)	+	<i>A. niger</i> (4-49)	+
<i>A. niger</i> (2-30)	+++	Sterile mycelium (3-27)	+	Sterile mycelium (4-54)	+++
<i>Paecilomyces lilacinus</i> (2-31)	++	Sterile mycelium (3-32)	+	<i>Xylaria</i> sp.(4-57)	++
Sterile mycelium (2-33)	+	Sterile mycelium (3-33)	+++	Sterile mycelium (4-61)	+++
<i>Neosartorya</i> sp.(2-34)	+	Sterile mycelium (3-34)	+++	Sterile mycelium (4-62)	++
<i>Neosartorya</i> sp.(2-39)	+	Sterile mycelium (3-36)	+	<i>Eupenicillium</i> sp.(4-67)	+
<i>A. niger</i> (2-43)	+	Sterile mycelium (3-37)	+	<i>A. niger</i> (4-69)	+++
<i>Penicillium</i> sp.(2-44)	+	<i>Talaromyces</i> sp.(3-40)	+		
<i>A. flavus</i> (2-51)	++	<i>Xylaria</i> sp.(3-42)	+		

* + = เกิดสีชมพู แสดงว่าสร้าง IAA (+ = ต่ำ, ++ = ปานกลาง, +++ = สูง), - = ไม่เกิดสีชมพู แสดงว่าไม่สร้าง IAA

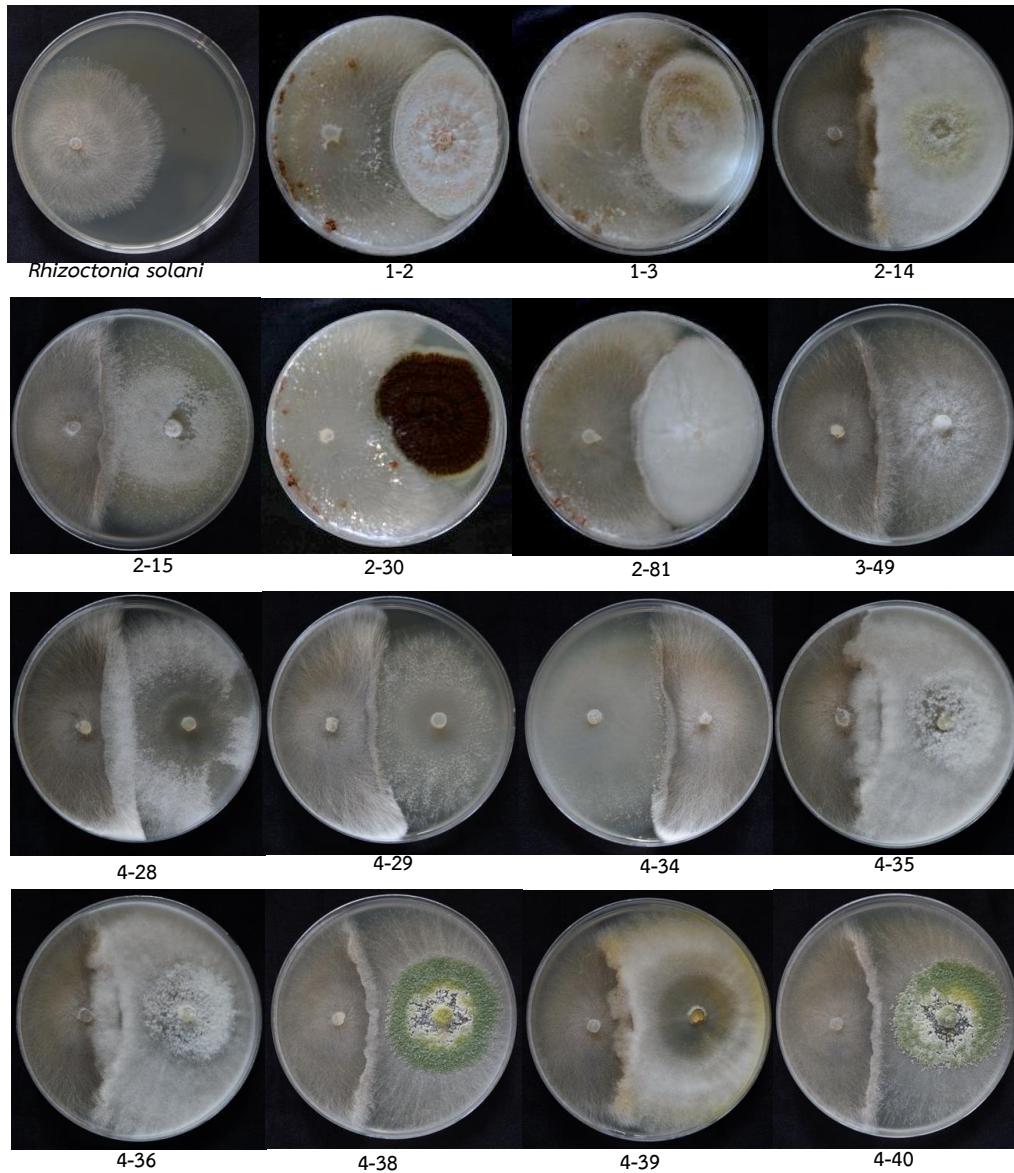
4. วิธีการทดสอบความเป็นปฏิปักษ์กับเชื้อราสาเหตุโรคพืช

การคัดเลือกราดินที่สามารถยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคพืช 4 ชนิด พบว่ามีราดิน 15 สายพันธุ์สามารถยับยั้งการเจริญของรา *Rhizoctonia solani* ได้ โดยมีค่าการยับยั้งตั้งแต่ 40-58 เปอร์เซ็นต์ สายพันธุ์ที่สามารถยับยั้ง *R.*

solani ได้มากที่สุดได้แก่รา *Aspergillus niger* สายพันธุ์ 2-30 และรา *Trichiderma* sp. สายพันธุ์ 4-34 (ตารางที่ 7 ภาพที่ 4) พบว่ามีราดินในสกุล *Trichoderma* spp จำนวน 11 สายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของรา *Sclerotium rofsiii* ได้ดี มีค่าการยับยั้ง 70-95 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 8 ภาพที่ 5) นอกจากนี้พบว่ามีราดิน 15 สายพันธุ์สามารถยับยั้งการเจริญของรา *Fusarium oxysporum* ได้ตั้งแต่ 57.69-88.46 เปอร์เซ็นต์ และราดิน 24 สายพันธุ์สามารถยับยั้งรา *Colletotrichum goesporioides* ได้ 40.23-89.66 เปอร์เซ็นต์ ราดินสายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งรา *R. solani* *S. rofsiii* *F. oxysporum* และ *C. gloeosporioides* ได้ในระดับดีมาก เมื่อนำมาตรวจดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่า เป็นราในสกุล *Trichoderma* spp. ซึ่งราชนิดนี้เป็นราที่มีความสำคัญมากทางด้านการเกษตรมีการนำมาใช้ควบคุมโรคพืชหลายชนิดเช่น โรครากเน่าโคนเน่าที่เกิดจากรา *Pythium*, *Phytophthora*, *Sclerotium* และ *Rhizoctonia* (จิระเดช, 2552) (ตารางที่ 9, 10 ภาพที่ 6, 7)

ตารางที่ 7 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของรา *Rhizoctonia solani* ของราดินที่แยกจากพื้นที่ลุ่มน้ำปาย จ.แม่ฮ่องสอน

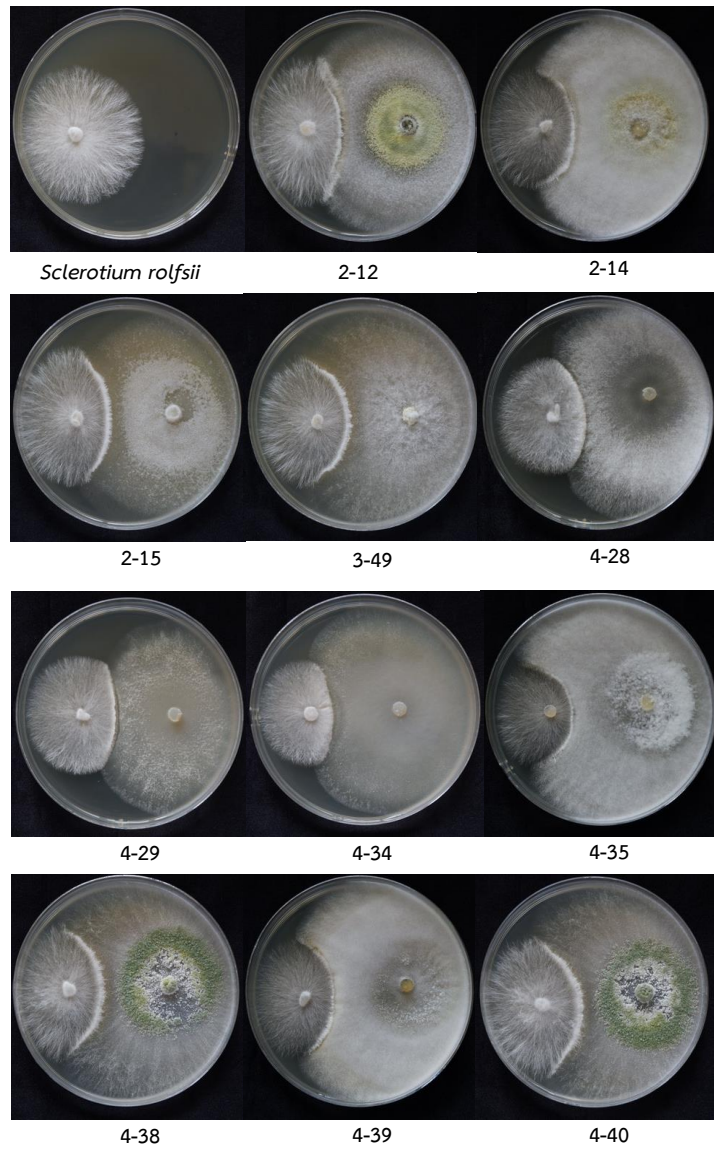
สายพันธุ์	รัศมีโคโลนี <i>Rhizoctonia solani</i> (ชม..)	รัศมีโคโลนีของ ราปฏิปักษ์ (ชม.)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง
control	3±0.00	-	-
<i>Aspergillus niger</i> (1-2)	1.8±0.00	2.2±0.00	40±0.00
Sterile mycelium (1-3)	1.8±0.00	2.2±0.00	40±0.00
<i>Trichiderma</i> sp.(2-14)	1.5±0.00	2.5±0.00	50±0.00
<i>Trichiderma</i> sp.(2-15)	1.3±0.1	2.7±0.00	57±19
<i>Aspergillus niger</i> (2-30)	1.9±0.2	2.1±0.1	58±5.8
Sterile mycelium (2-81)	1.8±0.0	2.2±0.2	40±0.0
<i>Trichiderma</i> sp.(3-49)	1.5±0.0	2.5±0.0	50±0.0
<i>T. harzianum</i> (4-28)	1.5±0.0	2.5±0.0	50±0.0
<i>Trichiderma</i> sp.(4-29)	1.5±0.3	2.5±0.0	50±9.6
<i>Trichiderma</i> sp.(4-34)	1.3±0.1	2.7±0.3	58±1.9
<i>Trichiderma</i> sp.(4-35)	1.5±0.1	2.5±0.1	51±1.9
<i>T. harzianum</i> (4-36)	1.4±0.1	2.6±0.1	53±3.3
<i>T. harzianum</i> (4-38)	1.3±0.1	2.7±0.1	57±3.3
<i>Trichiderma</i> sp.(4-39)	1.5±0.1	2.5±0.1	49±1.9
<i>T. harzianum</i> (4-40)	1.5±0.0	2.5±0.00	50±0.0



ภาพที่ 4 ราดินที่สามารถยับยั้งการเจริญของรา *Rhizoctonia solani* ในงานเลี้ยงเชื้อบนอาหาร PDA

ตารางที่ 8 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของรา *Sclerotium rofsiii* ของราดินที่แยกจากพื้นที่ลุ่มน้ำปาย จ.แม่ฮ่องสอน

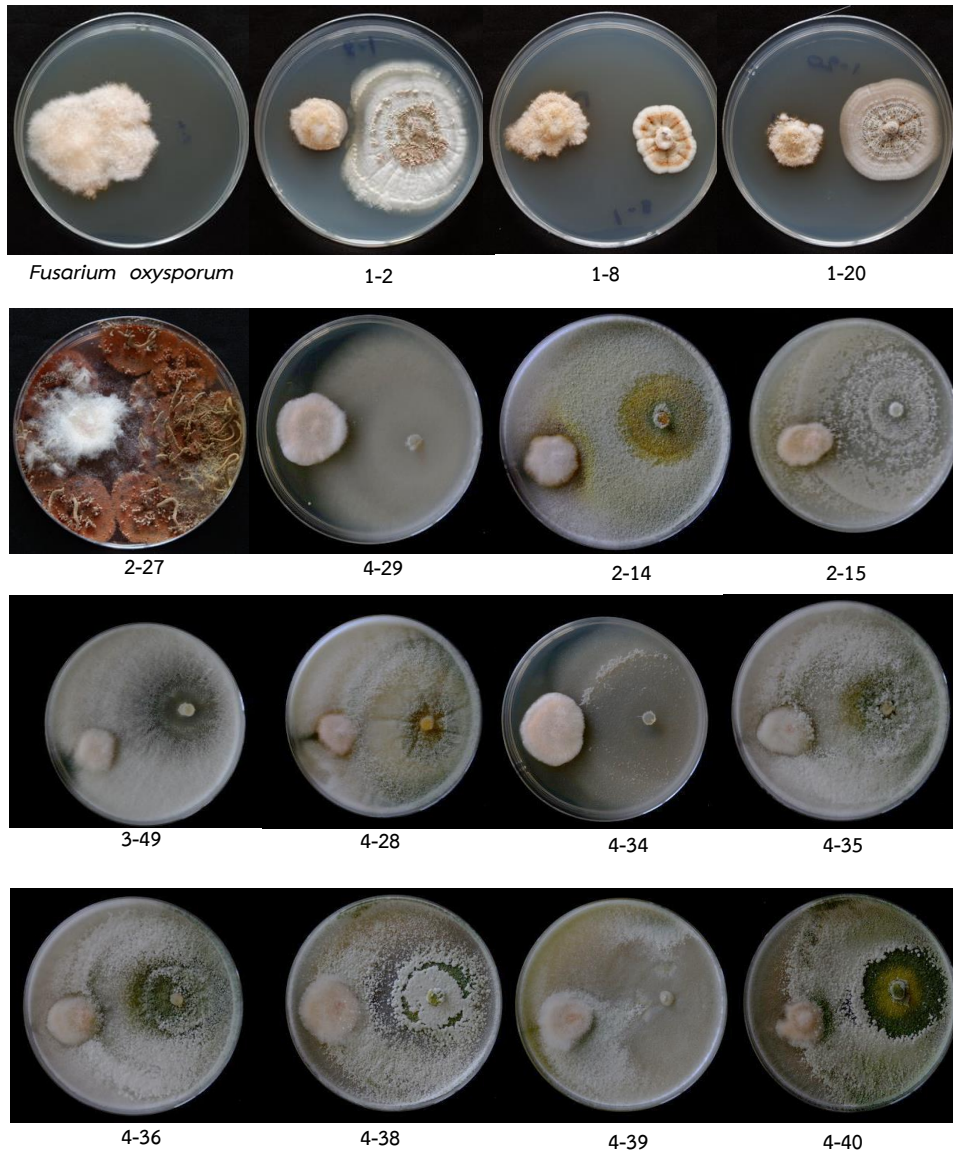
สายพันธุ์	รัศมีโคโลนี <i>Sclerotium rofsiii</i> (ซม.)	รัศมีโคโลนีของ ราที่ใช้ทดสอบ (ซม.)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง
control	2.5±0.00	-	-
<i>Trichiderma harzianum</i> (2-12)	1.4±0.1	2.6±0.1	45.3±2.3
<i>Trichiderma</i> sp.(2-14)	1.2±0.1	2.8±0.1	50.7±2.3
<i>Trichiderma</i> sp.(2-15)	1.4±0.1	2.6±0.1	45.3±2.3
<i>Trichiderma</i> sp.(3-49)	1.4±0.1	2.6±0.1	44.0±4.0
<i>T. harzianum</i> (4-28)	1.3±0.0	2.7±0.0	48.0±0.0
<i>Trichiderma</i> sp.(4-29)	1.3±0.1	2.7±0.1	48.0±4.0
<i>Trichiderma</i> sp.(4-34)	1.1±0.1	2.9±0.1	57.3±2.3
<i>Trichiderma</i> sp.(4-35)	0.7±0.0	3.3±0.0	72.0±0.0
<i>T. harzianum</i> (4-38)	1.2±0.1	2.8±0.1	53.3±4.6
<i>Trichiderma</i> sp.(4-39)	1.0±0.0	3.0±0.0	60.0±0.0
<i>T. harzianum</i> (4-40)	1.3±0.1	2.7±0.1	46.7±2.3



ภาพที่ 5 ราดินที่สามารถยับยั้งการเจริญของรา *Sclerotium rolfsii* ในจานเลี้ยงเชื้อบนอาหาร PDA

ตารางที่ 9 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของรา *Fusarium oxysporum* ของราดินที่แยกจากพื้นที่ลุ่มน้ำปาย จ.แม่ฮ่องสอน

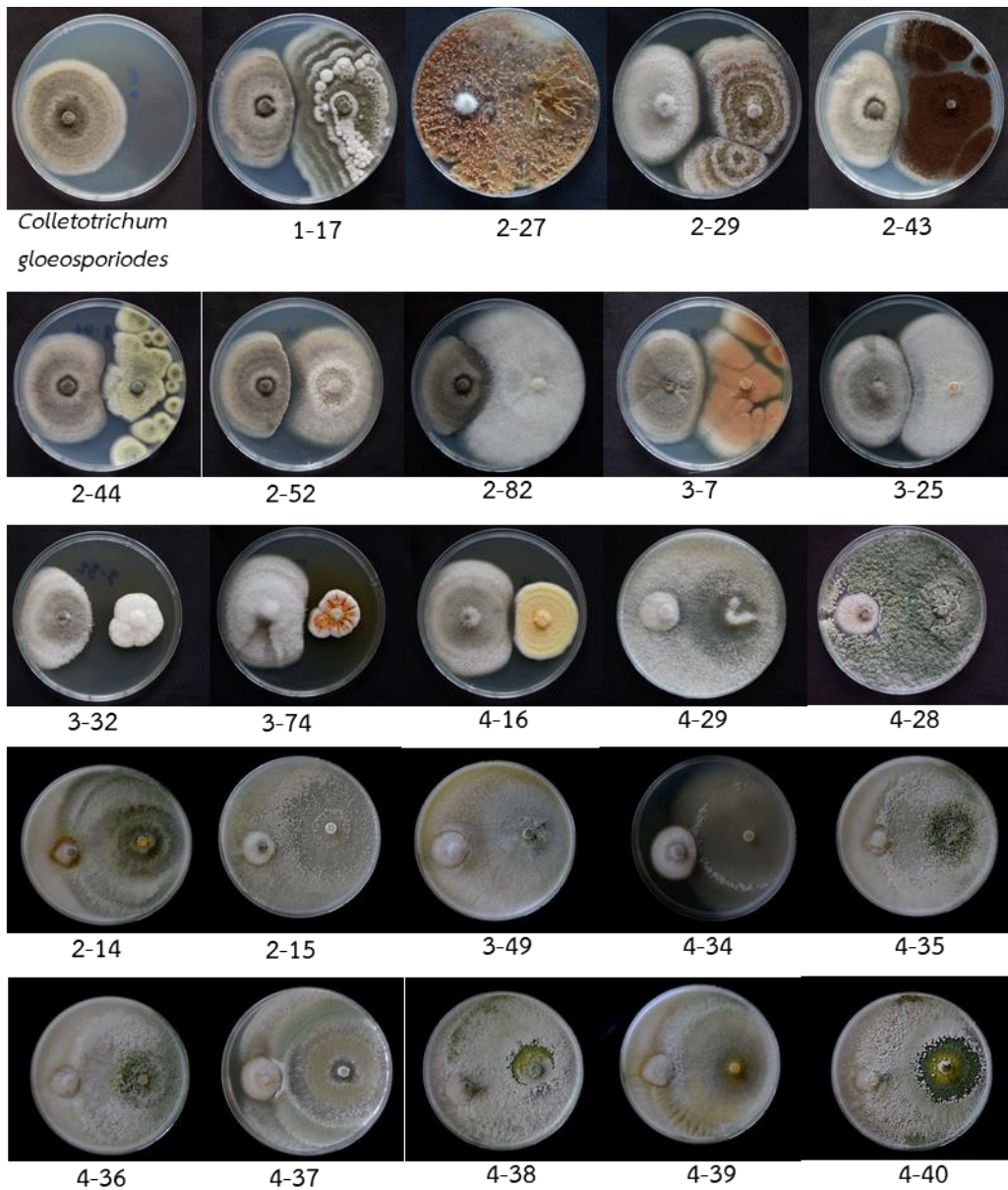
สายพันธุ์	รัศมีโคโลนี <i>Fusarium oxysporum</i> (ชม.)	รัศมีโคโลนีของ ราปฏิปักษ์ (ชม.)	เปอร์เซ็นต์การ ยับยั้ง
control	2.6±0.10	-	-
<i>Aspergillus niger</i> (1-2)	1.07±0.06	2.50±0.00	58.97 ±2.22
Sterile mycelium(1-8)	1.10±0.17	0.60±0.00	57.69 ±6.66
Sterile mycelium(1-20)	1.00±0.00	2.13±0.12	61.54 ±0.00
<i>Xylaria</i> sp.(2-27)	1.00±0.00	6.00±0.00	61.54 ±0.00
<i>Trichiderma</i> sp.(4-29)	0.70±0.00	6.00±0.00	73.08 ±0.00
<i>Trichiderma</i> sp.(2-14)	0.3±0.00	6.00±0.00	88.46±0.00
<i>Trichiderma</i> sp.(2-15)	0.3±0.00	6.00±0.00	88.46±0.00
<i>Trichiderma</i> sp.(3-49)	0.3±0.00	6.00±0.00	88.46±0.00
<i>T. harzianum</i> (4-28)	0.3±0.00	6.00±0.00	88.46±0.00
<i>Trichiderma</i> sp.(4-34)	0.3±0.00	6.00±0.00	88.46±0.00
<i>Trichiderma</i> sp.(4-35)	0.3±0.00	6.00±0.00	88.46±0.00
<i>T. harzianum</i> (4-36)	0.3±0.00	6.00±0.00	88.46±0.00
<i>T. harzianum</i> (4-38)	0.3±0.00	6.00±0.00	88.46±0.00
<i>Trichiderma</i> sp.(4-39)	0.3±0.00	6.00±0.00	88.46±0.00
<i>T. harzianum</i> (4-40)	0.3±0.00	6.00±0.00	88.46±0.00



ภาพที่ 6 ราดินที่สามารถยับยั้งการเจริญของรา *Fusarium oxysporum* ในจานเลี้ยงเชื้อบนอาหาร PDA

ตารางที่ 10 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของรา *Colletotrichum goesporioides* ของราดินที่แยกจากพื้นที่ลุ่มน้ำปาย จ.แม่ฮ่องสอน

สายพันธุ์	รัศมีโคโลนี <i>Colletotrichum goesporioides</i> (ชม.)	รัศมีโคโลนีของ ราที่เข้ทดสอบ (ชม.)	เปอร์เซ็นต์การ ยับยั้ง
control	2.90±0.00	-	-
Sterile mycelium(1-17)	1.36±0.12	2.23±0.06	52.87±3.98
<i>Xylaria</i> sp.(2-27)	0.30±0.00	6.00±0.00	89.66±0.00
<i>Aspergillus niger</i> (2-29)	1.73±0.12	2.36±0.12	40.23±3.98
<i>A. niger</i> (2-43)	1.43±0.12	2.30±0.10	50.58 ±3.98
<i>Penicillium</i> sp.(2-44)	1.50±0.00	1.96±0.06	48.28 ±0.00
Sterile mycelium(2-52)	1.26±0.06	2.67±0.06	56.32 ±1.99
Sterile mycelium(2-82)	1.23±0.06	1.33±0.00	57.47±1.99
Sterile mycelium(3-7)	1.73±0.00	2.36±0.00	40.23±0.00
<i>Neosartorya</i> sp.(3-25)	1.63±0.15	2.13±0.12	43.68±5.27
Sterile mycelium(3-32)	1.50±0.00	2.20±0.15	48.28 ±0.00
Sterile mycelium(3-74)	1.13±0.12	2.13±0.12	60.92±3.98
<i>Talaromyces</i> sp.(4-16)	1.36±0.12	3.20±0.00	52.87 ±3.98
<i>Trichoderma</i> sp.(4-29)	0.67±0.06	3.53±0.00	77.01 ±1.99
<i>T. harzianum</i> (4-28)	0.67±0.12	3.00±0.10	77.01 ±3.93
<i>Trichoderma</i> sp.(2-14)	0.3±0.00	6.00±0.00	89.66±0.00
<i>Trichoderma</i> sp.(2-15)	0.3±0.00	6.00±0.00	89.66±0.00
<i>Trichoderma</i> sp.(4-49)	0.3±0.00	6.00±0.00	89.66±0.00
<i>Trichoderma</i> sp.(4-34)	0.3±0.00	6.00±0.00	89.66±0.00
<i>Trichoderma</i> sp.(4-35)	0.3±0.00	6.00±0.00	89.66±0.00
<i>T. harzianum</i> (4-36)	0.3±0.00	6.00±0.00	89.66±0.00
<i>Trichoderma</i> sp.(4-37)	0.3±0.00	6.00±0.00	89.66±0.00
<i>T. harzianum</i> (4-38)	0.3±0.00	6.00±0.00	89.66±0.00
<i>Trichoderma</i> sp.(4-39)	0.3±0.00	6.00±0.00	89.66±0.00
<i>T. harzianum</i> (4-40)	0.3±0.00	6.00±0.00	89.66±0.00



ภาพที่ 7 ราดินที่สามารถยับยั้งการเจริญของรา *Colletotrichum gloeosporioides* ในจานเลี้ยงเชื้อ บนอาหาร PDA

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ผลการศึกษาความหลากหลายของราดินในพื้นที่ป่าและพื้นที่ทำการเกษตรบริเวณลุ่มน้ำปาย จังหวัดแม่ฮ่องสอนพบราทั้งหมด 390 สายพันธุ์ จำแนกตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้ทั้งหมด 18 สกุล 18 ชนิด แบ่งเป็นราในกลุ่ม Zygomycota 4 สกุล Ascomycota 13 สกุล Basidiomycota 1 สกุล ราที่พบมากในทุกพื้นที่ ได้แก่ ราที่ไม่สร้างสปอร์ สร้างเพียงเส้นใยรา (Sterile mycelium) รองลงมาได้แก่รา *Aspergillus niger* (32 สายพันธุ์) *Talaromyces*

spp. (30 สายพันธุ์) และ *Neosartorya* spp. (23) ตามลำดับ ราที่พบเฉพาะในพื้นที่ทำการเกษตรได้แก่ รา *Fusarium solani*, *Sclerotium rolfsii* และ *Trichoderma harzianum* ราที่พบเฉพาะในดินป่าได้แก่รา *Myrothecium verucaria* ผลการทดสอบประสิทธิภาพของราดิน พบราดินจำนวน 10 สายพันธุ์สามารถย่อยสลายฟอสเฟตได้ ราดินจำนวน 53 สายพันธุ์มีความสามารถในการสร้างสาร siderophore และพบราดินจำนวน 91 สายพันธุ์มีความสามารถในการสร้าง Indole acetic acid (IAA) นอกจากนี้ยังพบว่ามีราดินหลายสายพันธุ์สามารถยับยั้งราสาเหตุโรครากเน่าของพืชหลายชนิด อย่างรา *R. solani* พบราดินที่สามารถยับยั้งการเจริญได้จำนวน 15 สายพันธุ์ รา *S. rolfsii* พบราดินที่สามารถยับยั้งการเจริญได้จำนวน 11 สายพันธุ์ นอกจากนี้ยังพบว่ามีราดินจำนวน 15 สายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งรา *F. oxysporum* และ ราดิน 24 สายพันธุ์ สามารถยับยั้งการเจริญของรา *C. gloeosporioides* ได้ ซึ่งราดินส่วนใหญ่ที่สามารถยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคพืชได้ในระดับดีเป็นราในสกุล *Trichoderma* spp.

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ : จากการศึกษาพบราดินหลายชนิดที่มีแนวโน้มในการนำไปใช้ประโยชน์ทางการเกษตรได้ เช่น นำไปใช้ควบคุมศัตรูพืชต่าง ๆ เช่น โรค แมลง ราที่พบส่วนใหญ่มีรายงานว่าสามารถย่อยสลายซากพืชซากสัตว์โดยเฉพาะองค์ประกอบที่มีโครงสร้างซับซ้อนและย่อยสลายยากเช่น เซลลูโลส แป้ง ลิกนิน ได้ดีสิ่งที่ได้จากการย่อยสลายคือ คาร์บอนไดออกไซด์ กรดอินทรีย์ แร่ธาตุต่างๆ ซึ่งเป็นการปลดปล่อยธาตุอาหารและองค์ประกอบทางเคมีกลับคืนสู่ดินทำให้ดินอุดมสมบูรณ์และพืชนำกลับมาใช้ประโยชน์ได้ นอกจากนี้ราบางชนิดยังสามารถนำมาใช้ย่อยสลายสารกำจัดวัชพืชที่ตกค้างในดินได้ มีราดินหลายสายพันธุ์จากผลการทดลองในครั้งนี้สามารถสร้างสารเร่งการเจริญเติบโตอย่าง siderophore และ IAA ที่อาจนำไปใช้ประโยชน์ในการผลิตพืชได้

11. เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2551. คู่มือวิธีวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพ. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 45 หน้า.

ชนิษฐา สมตระกูล และวารภรณ์ ฉุฉฉาย. 2554. บทบาทของแบคทีเรียกลุ่มส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในการฟื้นฟูสภาพแวดล้อมด้วยพืช. วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม. 7(13):87-103.

คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา. 2526. คู่มือปฏิบัติการปฐพีวิทยาเบื้องต้น. ภาควิชาปฐพีวิทยา, คณะเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 119 น.

คณิงนิจ บุศราคำ. 2545. โรคของกล้วยไม้ดิน ราเอนโดไฟท์บนใบและราก และราดินบริเวณราก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 245 หน้า

จิระเดช แจ่มสว่าง. 2552. ไตรโคเดอร์มา: เชื้อราปฏิปักษ์ควบคุมโรคพืช. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน. 368 หน้า

นริศ ท้าวจันทร์. 2545. การควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคบางชนิดบนเมล็ดถั่วเหลืองโดยใช้เชื้อราปฏิปักษ์. ภาควิชาโรคพืช. คณะเกษตรศาสตร์. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 54 หน้า

- นิยม สุตเพราะ. 2542. ความหลากหลายของราดินและราโรคพืช ในดินปลูกพืชไร่ จังหวัดสกลนคร. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 321 หน้า.
- นภา โล่ห์ทอง. 2540. สิ่งละอันพันละน้อยจากจุลินทรีย์. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม.เกษตรศาสตร์ 45 น.
- มานะ กาญจนมณีเสถียร. 2531. ราที่เจริญในอุณหภูมิสูงและราทนความร้อน มูลสัตว์และเศษเหลือจากการเกษตร : การจำแนกและประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- ลิลลี่ กาวีตะ มาลี ณ นคร ศรีสม สุวรรณวงศ์ และ สุรียา ตันติวิวัฒน์. 2549. สรีรวิทยาของพืช. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- เลขา มาโนช อรุมา เพี้ยชัย อมรา ชินภูติ อำนาจ พัวพลเทพ นवलวรรณ ฟ้ารุ่งสาธ อังคณา ฉายประเสริฐ องอาจ เลหาวิณีจ จิระเดช แจ่มสว่าง ทิพย์วดี อรรถธรรม เสียงแจ้ว พิริยพจน์ต์ นภาพรณ์ พรหมชนะ. 2555. *บัญชีรายการทรัพยากรชีวภาพรา*. สำนักงานพัฒนาเศรษฐกิจจากฐานชีวภาพ (องค์กรมมหาชน), กรุงเทพฯ. 760 หน้า
- เลขา มาโนช จิตรา เกาะแก้ว อรุมา เจียมจิตต์ และ ธิดา เดชฮวบ. 2549. เชื้อราบนซากใบพืชและการศึกษาการเป็นปฏิปักษ์ต่อราสาเหตุโรคพืชในห้องปฏิบัติการ หน้า 771-780. ใน รายงานการประชุมวิชาการครั้งที่ 44 (สาขาพืช) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- เลขา มาโนช อรุมา เจียมจิตต์ ธิดา เดชฮวบ ผจงจิต ภูจิญาณุ และยุพดี เผ่าพันธุ์. 2548. ชนิดและการแพร่กระจายของเชื้อราจากดินบริเวณน้ำพุร้อน ดินทางการเกษตร และดินจากแหล่งอื่นๆ. น. 739-746. ใน: *รายงานการประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 43 (สาขาพืช)*. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ
- เลอลักษณ์ จิตรดอน พลสันต์ มหาพันธ์ วิเชียร กิจปรีชาวนิช และนภา โล่ห์ทอง. 2535. สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เพคตินในวัสดุอาหารแข็งโดยเชื้อรา *Rhizopus* sp. ที่สามารถย่อยสลายแป้งมันสำปะหลังดิบ. *วิทยาสารเกษตรศาสตร์*. 26(4): 374-383.
- วันเพ็ญ ภูติจันทร์. 2548. สรีรวิทยาทั่วไป (General Physiology). โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ
- วิเชียร กิจปรีชาวนิช Seigo Sato, Masatoshi Matsumusa และนภา โล่ห์ทอง. 2537. การแยกสกัดและย่อยสลายไซแลนในซังข้าวโพดด้วยเอนไซม์จากเชื้อรา. *วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร*. 67: 142-158.
- อาภรณ์ วงษ์วิจารณ์ และไตรวิทย์ รัตนโรจน์พงษ์. 2537. ลักษณะของกล้าเชื้อกับการเจริญและการผลิตกรดซิตริกของรา *Aspergillus niger*. *วารสาร สจธ*. 17(2): 107-117.
- Barron, G.L. 1968. The genera of Hyphomycetes from soil. The Williams & Wilkins Comp., Baltimore. 364 p.

- Bric, J.M., R.M Bostock. and S.E Silverstone. 1991. Rapid in situ assay for Indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. *Applied and Environmental Microbiology*. 57(2): 535-538.
- Chutima, R. and S. Lumyong. 2012. Production of Indole-3-Acetic Acid by Thai Native Orchid-Associated Fungi. *Symbiosis*. 56: 35-44.
- Dethoup, T. 2007. *Talaromyces species : diversity, taxonomy, phylogeny, antagonistic activity against plant pathogenic fungi and secondary metabolites*. Ph.D. Thesis. Kasetsart University.
- Domsch, K.H., W. Gams and T.H. Anderson. 1993. *Compendium of soil fungi* Vol. 1. 2nd ed. Academic Press, London. 859 p.
- Eamvijarn, A., L. Manoch, N. Visarathanonth and C. Chamsawarnng. 2009. Diversity of *Neosartorya* species from soil and In vitro antagonistic test against plant pathogenic fungi. p. 54 *In Abstracts Book of Asian Mycological Congress 2009 & 11th International Marine and Freshwater Mycology Symposium*. National Museum of Natural Science, Taichung, Taiwan. Nov. 15-19, 2009.

- Foth, H. D. 1990. Fundamentals of Soil Science. John Wiley & Son, Inc, Canada. 360 p.
- Garrett, S. D. 1963. Soil Fungi and Soil Fertility. Pergamon Press, Oxford. 165 p.
- Harley, J. R. 1971. Fungi in ecosystem. J. Ecol. 59 : 653 – 668.
- Isaka, M., J. Punya, Y. Lertwerawat, M. Tanticharoen and Y. Thebtaranonth. 1999. Antimal Angsana UPC activity of macrocyclic trichothecenes isolated from the fungus *Myrothecium verrucaria*. Journal of Natural Products 62(2) : 329-331.
- Kasana, R.C., R. Salwan, H. Dhar, S. Dutt, A. Gulati. 2008. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using gram's iodine. Curr. Microbiol. 55: 503–507.
- Ma, Y., M.N. Prasad, M. Rajkumar and H. Freitas. 2011. Plant Growth Promoting Rhizobacteria and Endophytes Accelerate Phytoremediation of Metalliferous Soils. Biotechnology Advances. 29(2): 248-258.
- Malviya, J., K. Singh, V. Joshi. 2011. Effect of phosphate solubilizing fungi on growth and nutrient uptake of ground nut (*Arachis hypogaea*) plants. Advances in Bioresearch. 2: 110-113.
- Milagres, A.F.M., A. Machuca and D. Napoleao. 1999. Detection of siderophore production from several fungi and bacteria by a modification of Chrome azurol S (CAS) agar plate assay. J Microbiol Methods. 37: 1-6.
- Nopparat, C., M. Jatupornpipat and A. Rittiboon. 2007. Isolation of phosphate solubilizing fungi in soil from Kanchanaburi, Thailand. KMITL Sci. Tech. J. 7(S2): 137-146.
- Radzki W, F.J. Gutierrez Maaero, E. Algar, J.A. Lucas Garcaa, A. Garcaa-Villaraco, B. Ramos Solano. 2013. Bacterial siderophores efficiently provide iron to iron-starved tomato plants in hydroponics culture. Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology. 104(3): 321-30.
- Richard, B. N. 1976. Introduction to the Soil Ecosystem. Longman Group Limited, London. 266 p.
- Samson, R. A., S. Hong, S. W. Peterson J. C. Frisvad and J. Varga. 2007. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section Fumigati and its teleomorph *Nosartorya*. Study in Mycology. 59: 147-203.
- Singer, M. J. and D. N. Munns. 1987. Soil : An Introduction. Macmillan Publishing Company, New York. 492 p.
- Smith, J.E. and M. O. Moss. 1985. *Mycotoxins : Formation, analysis and significance*. John Wiley & Sons. Great Britain. 148 p.
- Warcup, J.H. 1950. *The soil-plate method for isolation of fungi from soil Nature*. 166: 117-

118.

Warcup, J.H. and K.F. Baker 1963. *Occurrence of dormant ascospores in soil Nature*. 197: 1317-1318.

Zhang, Y., F.S. Chen, X.Q. Wu, F.G. Luan, L.P. Zhang, X.M. Fang, S.Z. Wan, X.F. Hu and J.R. Ye. 2018. Isolation and characterization of two phosphate-solubilizing fungi from rhizosphere soil of moso bamboo and their functional capacities when exposed to different phosphorus sources and pH environments. *PLoS ONE* 13(7): e0199625.