

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์
(FINAL REPORT)

โครงการ

การเก็บรวบรวมและแยกเชื้อราจากไลเคนเพื่อตรวจสอบหา
สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

COLLECTION AND ISOLATION OF LICHEN FUNGI FOR THE
BIORESOURCES SCREENING PROGRAMME

โดย

หัวหน้าโครงการ : ดร. สมศักดิ์ ศิวชัย

ผู้ร่วมวิจัย : นายวิระ ศรีอินทร์สุทธิ.

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

สนับสนุนโดย โครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพ
ในประเทศไทย (โครงการ BRT)

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์
(FINAL REPORT)

โครงการ

การเก็บรวบรวมและแยกเชื้อราจากไลเคนเพื่อตรวจสอบหา
สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

COLLECTION AND ISOLATION OF LICHEN FUNGI FOR THE
BIORESOURCES SCREENING PROGRAMME

โดย

หัวหน้าโครงการ : ดร. สมศักดิ์ ศิวชัย

ผู้ร่วมวิจัย : นายวิระ ศรีอินทร์สุทธิ.

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจาก โครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย (โครงการ BRT) ซึ่งร่วมจัดตั้งโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ รหัสโครงการ 644003

โครงการ : การเก็บรวบรวมและแยกเชื้อราจากไลเคนเพื่อตรวจสอบหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Collection and Isolation of Lichen Fungi for the Bioresources Screening Programme)

1. บทคัดย่อ

การสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างไลเคนจากอุทยานแห่งชาติต่างๆ ทั่วประเทศไทย ในช่วงเดือนตุลาคม 2543 ถึงกันยายน 2544 การศึกษาครั้งนี้เป็นการแยกราจากไลเคนเพื่อตรวจสอบหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยจำนวน 1,116 ตัวอย่าง จัดเป็นไลเคนในกลุ่มครัสโตส 74%, กลุ่มโฟลิโอส 14%, กลุ่มฟรุติโคส 1% และกลุ่มอื่นๆ อีก 2% สามารถจัดจำแนกตามหลักอนุกรมวิธานได้เป็น 3 ลำดับ, 14 วงศ์, 34 สกุล และกว่า 200 ชนิดพันธุ์ นอกจากนี้ไม่สามารถจำแนกชนิดได้ 9% จากตัวอย่างทั้งหมด เมื่อทำการแยกจากส่วนสืบพันธุ์ของไลเคนด้วยวิธีการปลดปล่อยสปอร์และคัดแยกให้ได้เชื้อราที่บริสุทธิ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อแล้ว สามารถแยกได้มากกว่า 300 สายพันธุ์ และเก็บรวบรวมไว้ที่ห้องปฏิบัติการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ของศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ เพื่อทำการตรวจสอบหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป

Abstract

A survey of Lichens was made from various sites in national parks of Thailand during October 2000 to September 2001. The purpose of this study was to isolate fungi from lichens for the bioresources screening programme. One thousand and one hundred sixteen collections were made. These included crustose (74%), foliose (14%), fruticose (1%) and other groups (2%). All of these samples were classified into 3 orders, 14 families, 34 genera and over 200 species (91%) while others (9%) were unidentified. All mature samples were isolated from sexual stages by the discharge of spores technique to pure culture. More than 300 isolations were made and have been deposited in the BIOTEC culture collection. The continued study of lichens in Thailand will surely provide a high number of novel lichen species which can yield a high number and high diversity of cultures for other research activities.

2. บทนำ (Introduction)

ไลเคนเป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กคล้ายพืชที่เกิดจากการอยู่ร่วมกันในสภาพปิด (Symbiosis) ระหว่างราที่เรียกว่า mycobiont และสาหร่ายที่เรียกว่า photobiont หรือ phycobiont โดยราจัดเป็นปรสิตของสาหร่าย สาหร่ายทำหน้าที่เป็นแหล่งอาหารจากการสังเคราะห์แสง แล้วส่งมาเก็บไว้ในชั้นของรา และราทำหน้าที่ป้องกันสภาพแวดล้อมกับรักษาอาหารให้สาหร่าย กลไกของการอยู่ร่วมกันยังไม่ปรากฏแน่ชัด โดยปกติในธรรมชาติทั้งสาหร่ายและราสามารถเจริญได้อย่างอิสระ ไลเคนเกิดจากสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการจะทำให้ฝ่ายใดฝ่ายหนึ่งเจริญเติบโตได้ จึงทำให้เกิดการอยู่ร่วมกัน สาหร่ายในไลเคนมีประมาณ 40 สกุล 100 ชนิดพันธุ์ (Friedl & Bundel, 1996) ประกอบด้วยสาหร่ายสีเขียว (Division Chlorophyta) ประมาณ 92% และสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (Division Cyanobacteria) ประมาณ 8% ส่วนราที่พบในไลเคน มีประมาณ 13,500 ชนิดพันธุ์ คิดเป็น 21 เปอร์เซ็นต์ของราทั้งหมด (Hawksworth & Hill, 1984) ส่วนใหญ่เป็นราใน Class

Ascomycetes ประมาณครึ่งหนึ่งของราในชั้นนี้เป็นราที่ก่อให้เกิดไลเคน (Lichenized Fungi) โดยมีราใน Class Basidiomycetes และ Class Deuteromycetes พบเป็นส่วนน้อยเท่านั้น

โครงสร้างพื้นฐานของไลเคนเป็นการจัดสรรอย่างเป็นระเบียบของชั้นราและสาหร่ายที่เรียกว่า Thallus มีส่วนประกอบเป็นโครงสร้างสืบพันธุ์ซึ่งมี 2 แบบ คือ แบบไม่อาศัยเพศ ได้แก่ส่วนประกอบที่เรียกว่า ไอซีเดีย (Isidia) ซึ่งมีลักษณะคล้ายขนหนาๆ และ ซอริเดีย (Soredia) มีลักษณะคล้ายขนมด้วยฟูขนาดเล็ก และแบบอาศัยเพศ จะพบโครงสร้างสืบพันธุ์ (fruiting body) 2 ลักษณะคือ คล้ายจานหรือถ้วยติดอยู่บนทลลัส เรียกว่า Apothecia และคล้ายคนโทหรือแจกัน เรียกว่า Perithecia ซึ่งเป็นส่วนที่สร้างสปอร์ของรา เมื่อสปอร์แก่จะติดออกแล้วไปตกที่ต่างๆ เมื่อพบสาหร่ายที่เหมาะสม ก็จะเจริญเป็นไลเคนต่อไป จะเห็นได้ว่า ความหลากหลายของไลเคน ขึ้นกับชนิดของราเป็นสำคัญ ดังนั้นการจัดจำแนกชื่อ จึงอาศัยราเป็นหลัก ความหลากหลายของราใน Class Ascomycetes ประมาณว่า 13,500 – 17,000 ชนิดพันธุ์ และใน Class Basidiomycetes เพียง 20 ชนิดพันธุ์ (Tehler, 1996)

การจัดจำแนกไลเคนโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา สามารถจัดออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ ได้แก่

1. ครัสโตส (Crustose) เป็นไลเคนลักษณะแผ่นบางขนาดเล็กคล้ายผืนผาง เกาะติดกับแหล่งเกาะอาศัย (substrate) แน่นหนา พื้นของชั้นล่างสุดของทลลัสเป็นชั้นที่เกาะอาศัย ทำให้การเก็บตัวอย่างต้องตัดส่วนของที่เกาะอาศัยออกมาด้วย แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มย่อย คือ
 - 1.1 กลุ่มกรากฟิดส์ (Graphids) เป็นครัสโตสที่สร้างโครงสร้างสืบพันธุ์แบบ Apothecia แต่เปลี่ยนแปลงรูปร่างให้มีลักษณะคล้ายปาก (lip shape) เรียกว่า Lirellate
 - 1.2 กลุ่มรูปถ้วยหรือจาน (Discolichen) เป็นครัสโตสที่สร้างโครงสร้างสืบพันธุ์แบบ Apothecia เป็นรูปถ้วยหรือจาน (disc shape)
 - 1.3 กลุ่มรูปคนโทหรือแจกัน (Perithecium) เป็นครัสโตสที่สร้างโครงสร้างสืบพันธุ์แบบ Perithecia เป็นรูปคนโทหรือแจกัน (flask shape)
2. โฟลิโอส (Foliose) เป็นไลเคนลักษณะแผ่นใบ คล้ายใบไม้วางเกาะอยู่บนที่เกาะอาศัยหลวมๆ สามารถเลาะเอาส่วนทลลัสออกจากที่เกาะอาศัยได้ สร้างโครงสร้างสืบพันธุ์ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ แบบอาศัยเพศที่พบจะเป็น Apothecia ที่ชูขึ้นเหนือทลลัส
3. ฟรุติโคส (Fruticose) เป็นไลเคนลักษณะพุ่มหรือเป็นเส้นสาย ใช้ส่วน hold fast ขนาดเล็กติดกับที่เกาะอาศัย มักจะพบบนเรือนยอดของพืช สร้างโครงสร้างสืบพันธุ์ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ แบบอาศัยเพศที่พบจะเป็น Apothecia ที่ติดอยู่บนทลลัส

นอกจากนี้ยังจัดออกเป็นกลุ่มย่อยขนาดเล็กที่แตกต่างจากทั้ง 3 กลุ่มหลักได้อีก 6 กลุ่ม ซึ่งพบเป็นจำนวนน้อย เช่น Squamulose Lichen, Basidiolichen, Gelatinous Lichen เป็นต้น

ประวัติการศึกษาไลเคน (Historical Background)

การสืบค้นบรรณานุกรมไลเคนเริ่มตั้งแต่ในสมัยกรีกโบราณ ทีโอพราตัส (Theophrastus, 371-284 B.C.) เขียนหนังสือเรื่องประวัติของพืช (History of Plants) โดยใช้คำว่า Lichens อธิบายถึงพืชชนิดหนึ่งที่เติบโตอยู่บนต้นมะกอก และจัดเป็นกลุ่มเดียวกับพืชไม่มีท่อลำเลียงชั้นต่ำ ซึ่งมีความสำคัญมากทางเศรษฐกิจสมัยนั้นในการเป็นสีย้อม (Smith, 1975) ต่อมา อีริค อคาเรียส (Erich Acharius, 1757-1819) แพทย์สวีเดนแยกกลุ่มไลเคน

ออกจากพืชไม่มีท่อลำเลียงชั้นต่ำ ตั้งชื่อตามหลักการของลินเนียส และวางรากฐานในการจัดจำแนกที่ใช้สืบต่อจนถึงปัจจุบัน จนได้รับยกย่องว่าเป็นบิดาของวิทยาการไลเคน ในปี ค.ศ. 1867 ชเวเนดีเนอร์ (Schwendener) ตั้งทฤษฎีที่ว่าไลเคนเป็นการอยู่ร่วมกันระหว่างรากับสาหร่าย และสามารถแยกราและสาหร่ายออกจากกันเป็นผลสำเร็จ ในปี ค.ศ. 1890 ไวเนียโอ (Vainio) ได้จัดจำแนกไลเคนตามหลักเกณฑ์โดยอาศัยราเป็นหลัก ปัจจุบันการจัดจำแนกหมวดหมู่และกำหนดชื่อวิทยาศาสตร์ ให้ความสำคัญกับโครงสร้างสืบพันธุ์และสปอร์ของรา รวมทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยาของทัลลัส การแพร่กระจาย สาหรรมชาติที่พบในไลเคน (Secondary metabolites) และส่วนประกอบทางเคมี

สำหรับในประเทศไทยไลเคนยังไม่เป็นที่รู้จักมากนัก เริ่มต้นจากในปี ค.ศ. 1905 Vainio เข้ามาสำรวจและเก็บตัวอย่างไลเคนจากเกาะช้าง จังหวัดตราด รายงานว่าพบ 121 ชนิดพันธุ์ (Vainio, 1905) และที่ดอยสุเทพ จังหวัดเชียงใหม่ในปี ค.ศ. 1909 ต่อมาพอลสัน (Paulson) เข้ามาเก็บที่เกาะเต่า จังหวัดสุราษฎร์ธานีในปี ค.ศ. 1930, ซาโต้ (Sato) รายงานการสำรวจที่ดอยสุเทพและดอยอินทนนท์ในปี ค.ศ. 1962, เฮล (Hale) และ คูโรกาว่า (Kurokawa) ในปี ค.ศ. 1964, เวียงเก้ (Wamcke) เก็บรวบรวมบริเวณภาคเหนือของประเทศไทยในปี ค.ศ. 1978 (Yoshimura, 1978), ในปี ค.ศ. 1997 โวลสลีย์ (Wolsley) และอากิรา-ฮัดสัน (Aguirre-Hudson) เข้ามาสำรวจและเก็บตัวอย่างทั่วประเทศตามโครงการ การใช้ไลเคนเป็นดัชนีบ่งบอกการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อม โดยทุนของพิพิธภัณฑสถานแห่งชาติอังกฤษ (Wolsley & Aguirre-Hudson, 1995) ตัวอย่างไลเคนทั้งหมดที่ชาวต่างประเทศเข้ามาเก็บ ปัจจุบันถูกเก็บรักษาในพิพิธภัณฑสถานต่างประเทศทั้งหมด โดยนักวิจัยของไทยไม่มีส่วนร่วมในการศึกษาเลย ในปี ค.ศ. 1994 หน่วยวิจัยไลเคน ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหงภายใต้การสนับสนุนของสวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ และโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย (โครงการ BRT) ได้เริ่มทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างในบริเวณป่าทางภาคเหนือของประเทศไทย พบไลเคนประมาณ 20,000 ตัวอย่าง จัดจำแนกเป็น 127 สกุล 420 ชนิดพันธุ์ (พินุลย์และคณะ, 2539), (พินุลย์และคณะ, 2540) เป็นจุดเริ่มต้นของงานวิจัยไลเคนในประเทศไทย และคาดว่าจะยังมีชนิดพันธุ์ไลเคนอีกมากที่ยังไม่ได้สำรวจและศึกษาอย่างจริงจัง

3. วัตถุประสงค์ (Summary Project Objectives)

- 3.1 สำรวจและเก็บตัวอย่างไลเคน ในสภาพภูมิประเทศที่แตกต่างกันในประเทศไทย เพื่อการจัดจำแนกชื่อสกุลและชนิดพันธุ์
- 3.2 แยกเชื้อราที่บริสุทธิ์จากไลเคน โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมและส่งเก็บที่ห้องปฏิบัติการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ของศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

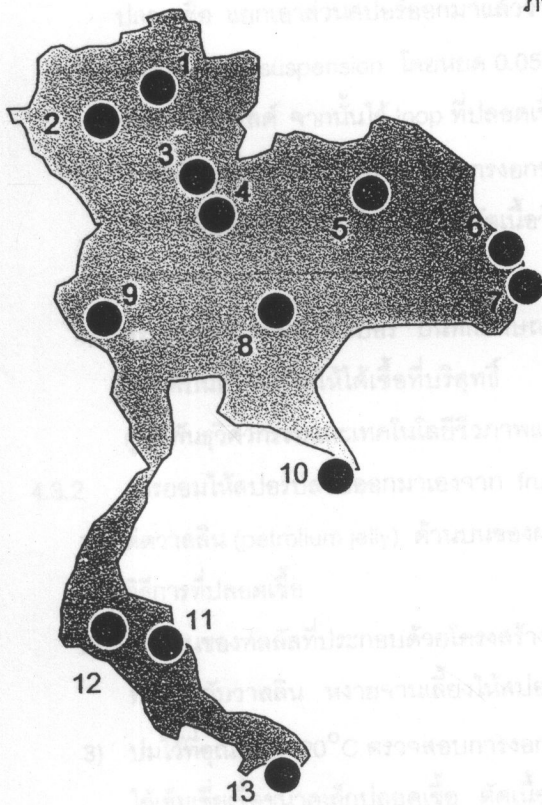
4. วิธีการดำเนินงาน (Materials and Methods)

4.1 การเก็บตัวอย่าง (Collection)

- 4.1.1 สำรวจและเก็บตัวอย่างไลเคนในบริเวณที่กำหนด (Fig. 1) โดยเลือกเก็บเฉพาะตัวอย่างที่สด และยังมีชีวิตอยู่ ตัวอย่างที่พบ เช่น บนเปลือกไม้ ก้อนหิน ดิน ใบไม้ จะเก็บในซองกระดาษ เพื่อต้องการให้แห้งและปราศจากความชื้น อาจช่วยด้วยการห่อกระดาษที่ชุบเพิ่มเติมนอกจากตัวอย่างที่ชื้นจะมีราชนิดอื่นปนเปื้อนได้

- 4.1.2 ตัวอย่างที่เก็บได้แล้วจะรีบนำมาแยกตามกลุ่มลักษณะที่พบอย่างหยาบๆ ลงรหัสตัวอย่าง บันทึกรายละเอียดต่างๆ เช่น สถานที่เก็บ, วันที่เก็บ, ผู้เก็บ, ที่เกาะอาศัย (substrate) เป็นต้น
- 4.2 นำตัวอย่างที่เก็บได้มาฝังในที่ร่ม ให้ตัวอย่างแห้งสนิทอย่างน้อย 1 คืนแล้วจึงเก็บใส่ของกระดาษเช่นเดิม ตัวอย่างที่มีรายละเอียดที่น่าสนใจจะทำการถ่ายรูป บันทึกลักษณะสำคัญไว้

Fig. 1 สถานที่เก็บตัวอย่าง (Study areas)



กำหนดพื้นที่เพื่อการสุ่มเก็บตัวอย่าง โดยแบ่งเป็นภาคต่างๆของประเทศไทย ดังนี้

ภาคเหนือ

1. อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์
2. อุทยานแห่งชาติออบหลวง
3. อุทยานแห่งชาติภูหินร่องกล้า
4. อุทยานแห่งชาติน้ำหนาว

ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

5. อุทยานแห่งชาติภูพาน
6. อุทยานแห่งชาติผาแต้ม
7. อุทยานแห่งชาติแก่งตะนะ
8. อุทยานแห่งชาติเขาใหญ่

ภาคกลาง (รวมภาคตะวันออกเฉียงและภาคตะวันตก)

9. อุทยานแห่งชาติเอราวัณ
10. อุทยานแห่งชาติหมู่เกาะช้าง

ภาคใต้

11. อุทยานแห่งชาติเขานหลวง
12. อุทยานแห่งชาติเขาสก
13. เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าบาลา ฮาลา

4.2 การจัดจำแนกกลุ่มตัวอย่าง (Classification)

ตัวอย่างไลเคนที่เก็บรวบรวมได้จะนำมาจัดเรียงเป็นข้อมูลเบื้องต้นเพื่อการสืบค้น รวมทั้งจำแนกชนิดคร่าวๆ โดยแบ่งกลุ่มตัวอย่างออกตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาไลเคนที่พบภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำเป็นแบบต่างๆ ตามโครงสร้างการสืบพันธุ์ ดังนี้

4.2.1 โครงสร้างสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ สามารถจำแนกออกเป็น 2 ชนิด คือ

- 1) สร้าง fruiting body เป็นรูปจานหรือรูปถ้วย (disc shape) เรียกว่า apothecia
- 2) สร้าง fruiting body เป็นรูปแจกันหรือรูปคนโท (flask shape) เรียกว่า perithecia

4.2.2 โครงสร้างสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ เช่น การสร้างซอริเดีย โอะซีเดีย เป็นต้น

4.3 การแยกเชื้อราจากไลเคน (Isolation)

โดยทั่วไปราที่ได้จากไลเคนมักจะโตช้ากว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ (Ahmadjian, 1993) การประยุกต์วิธีการให้ราที่ได้จากไลเคนเจริญเติบโตดี จึงเป็นการแยกสปอร์ออกมาโดยตรงจากโครงสร้างสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ ด้วยเทคนิค 2 วิธีการ ดังนี้

4.3.1 วิธีการดึงสปอร์ออกจากโครงสร้างสืบพันธุ์ (Direct Streaking of spores) ดังนี้

- 1) เตรียมไลเคนที่จะทำการแยกภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ ฉาบปลายปากคีบละเอียดหรือเข็ม เขี่ยขนาดเล็กจนร้อนแดง รอให้เย็นแล้วคีบสปอร์ หรือส่วน ascoma ทั้งหมด ตัดด้วยมีดผ่าตัดที่ปลอดเชื้อ แยกเอาส่วนสปอร์ออกมาแล้ววางบนสไลด์ที่สะอาด
- 2) เตรียม spore suspension โดยหยด 0.05% sterile Triton-X 100 ในน้ำ คนให้เข้ากันบนส่วนที่แยกออกมาบนสไลด์ จากนั้นใช้ loop ที่ปลอดเชื้อเขี่ย แล้วเขียนลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้
- 3) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 20°C ตรวจสอบการงอกของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ทุกวัน เมื่อสปอร์เริ่มงอกแล้ว ให้เขี่ยเชื้อขนาดเล็กปลอดเชื้อ ตัดเนื้อก้อนภายใต้สปอร์ที่งอกแล้วถ่ายเชื้อลงในอาหารใหม่ประมาณ 10-20 สปอร์
- 4) ตรวจสอบการงอกของสปอร์ บันทึกลักษณะโคโลนี สี อายุของเชื้อ รวมทั้งลักษณะที่พบอื่นๆ กำจัดส่วนที่ปนเปื้อนเพื่อให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์ แล้วส่งเก็บต่อไปที่ห้องปฏิบัติการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ของ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

4.3.2 การยอมให้สปอร์ปล่อยออกมาเองจาก fruiting body (Ejection of spores from fruiting body)

- 1) ติดวาสลีน (petroleum jelly) ด้านบนของฝาจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารเหมาะสมให้ขนาดพอสมควร ด้วยวิธีการที่ปลอดเชื้อ
- 2) ตัดส่วนของทัลลัสที่ประกอบด้วยโครงสร้างสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ หรือ fruiting body ขนาดเล็กพอที่จะติดกับวาสลีน หนายจานเลี้ยงให้สปอร์ที่ปล่อยตกลงบนอาหาร
- 3) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 20°C ตรวจสอบการงอกของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ทุกวัน เมื่อสปอร์เริ่มงอกแล้ว ให้เขี่ยเชื้อขนาดเล็กปลอดเชื้อ ตัดเนื้อก้อนภายใต้สปอร์ที่งอกแล้วถ่ายเชื้อลงในอาหารใหม่ประมาณ 10-20 สปอร์
- 4) ตรวจสอบการงอกของสปอร์ บันทึกลักษณะโคโลนี สี อายุของเชื้อ รวมทั้งลักษณะที่พบอื่นๆ กำจัดส่วนที่ปนเปื้อนเพื่อให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์ แล้วส่งเก็บต่อไปที่ห้องปฏิบัติการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ของ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

4.4 การเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง (Culturing)

หลังจากที่สปอร์งอกและเริ่มเจริญเติบโต การถ่ายสปอร์ลงในอาหารแข็งที่เหมาะสมจะทำให้การเจริญเติบโตเพิ่มมากขึ้น และเป็นการง่ายที่จะส่งไปเก็บเชื้อบริสุทธิ์ อาหารที่เหมาะสม ได้แก่ Potato Dextrose Agar (PDA), Malt Extract Yeast Extract (MEYE) และ Ahmadjian's modified Lilly and Barnett medium (LB) มีสูตรอาหารดังนี้

Potato Dextrose Agar (PDA)

Potatoes	200 g.
Dextrose	15 g.
Agar (oxiod No.3)	20 g.
Distilled water	1000 ml.

Malt Extract Yeast Extract (MEYE)

Malt Extract	20 g.
Yeast Extract	2 g.
Agar	20 g.
Distilled water	1000 ml.

Ahmadjian's modified Lilly and Barnett medium (LB)

Dextrose	10 g.
K_2HPO_3	1 g.
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	1.1 g.
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5 g.
$FeCl_4 \cdot 6H_2O$	0.2 g.
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2 g.
Biotin	5 μ g.
Thiamine	100 μ g.
Distilled water	1000 ml.

เมื่อถ่ายสปอร์ที่งอกแล้วลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

- 4.4.1 บันทึกรายละเอียด เช่น วันที่แยกเชื้อ, ลักษณะสปอร์, ขนาด, ภาคตัดขวางของโครงสร้างร่างกาย, ส่วนสืบพันธุ์ ฯลฯ รวมทั้งถ่ายรูปภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วย
- 4.3.2 ภาที่เจริญเต็มที่แล้วจะถูกส่งไปเก็บรักษาอย่างถูกต้องต่อไป ที่ห้องปฏิบัติการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ของศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

4.5 การจัดจำแนกชนิด (Identification)

ตัวอย่างไลเคนที่เก็บรวบรวมได้จะนำมาจัดจำแนกชื่อสกุลและชนิดพันธุ์ตามหลักอนุกรมวิธาน โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะทางกายภาพ และการทดสอบสารเคมีเบื้องต้นในการจำแนก

สารเคมีที่ใช้ทดสอบ

C : คือ โซเดียมไฮโปคลอไรท์ หรือน้ำยาซักผ้าขาวที่เป็นสารฟอกขาวทั่วไป

K : คือ โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ในน้ำ เตรียมจากละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 70 กรัมในน้ำกลั่น

200 มิลลิลิตรจนสารละลายใส

KC : คือ การทดสอบโดยการหยดสารละลาย K ก่อน แล้วตามด้วยการหยดสารละลาย C ตามในทันที

CK : คือ การทดสอบโดยการหยดสารละลาย C ก่อน แล้วตามด้วยการหยดสารละลาย K ตามในทันที

PD : คือ สารละลายพารา-เฟนิลีนไดอะมีนในแอลกอฮอล์ เตรียมจากละลายพารา-เฟนิลีนไดอะมีน 2-3 เกล็ด ในเอธิลแอลกอฮอล์ 1-2 หยด หรือ ละลายพารา-เฟนิลีนไดอะมีนในเอธิลแอลกอฮอล์ 20 มิลลิลิตรจนสารละลายอิ่มตัว เป็นสารอันตรายจึงควรเก็บในที่ปลอดภัยเสมอ

I : คือ สารละลายไอโอดีน เตรียมจากละลายเกล็ดไอโอดีน 0.5 กรัมในสารละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์ 200 มิลลิลิตร

ตัวอย่างที่จัดจำแนกเรียบร้อยแล้ว จะถูกจัดเก็บเป็นแหล่งรวบรวมพันธุ์ (herbarium) เพื่อใช้อ้างอิงและเป็นประโยชน์ในการศึกษาด้านอื่นๆ ต่อไป

5. ผลการดำเนินงาน (Results)

5.1 ความหลากหลายทางชีวภาพของไลเคน (Biodiversity)

การเก็บรวบรวมตัวอย่างไลเคนในช่วง 1 ปีคือระหว่างเดือนตุลาคม 2000 ถึงกันยายน 2001 ได้จำนวนตัวอย่างทั้งสิ้น 1,116 ตัวอย่าง ตามพื้นที่ที่จัดเก็บ ดังแสดงในตารางที่ 1 (Table 1.)

Table 1. แสดงพื้นที่ที่เก็บตัวอย่างและจำนวนที่พบ

อุทยานแห่งชาติ	จังหวัด	จำนวนตัวอย่างที่พบ
1. อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์	เชียงใหม่	43 ตัวอย่าง
2. อุทยานแห่งชาติออบหลวง	เชียงใหม่	23 ตัวอย่าง
3. อุทยานแห่งชาติภูหินร่องกล้า	พิษณุโลก	166 ตัวอย่าง
4. อุทยานเขื่อนลำนานา	เพชรบูรณ์	56 ตัวอย่าง
5. อุทยานแห่งชาติภูพาน	สกลนคร	128 ตัวอย่าง
6. อุทยานแห่งชาติแก่งตะนะ	อุบลราชธานี	17 ตัวอย่าง
7. อุทยานแห่งชาติผาแต้ม	อุบลราชธานี	19 ตัวอย่าง
8. อุทยานแห่งชาติเขาใหญ่	นครราชสีมา	341 ตัวอย่าง
9. อุทยานแห่งชาติเขาวัง	กาญจนบุรี	22 ตัวอย่าง
10. อุทยานแห่งชาติหมู่เกาะช้าง	ตราด	55 ตัวอย่าง
11. อุทยานแห่งชาติเขาลง	นครศรีธรรมราช	63 ตัวอย่าง
12. อุทยานแห่งชาติเขาสก	สุราษฎร์ธานี	96 ตัวอย่าง
13. เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าบาลา ฮาลา	นราธิวาส	87 ตัวอย่าง

เมื่อจัดจำแนกกลุ่มตัวอย่างออกตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาไลเคนที่พบภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำเป็นแบบต่างๆ ตามโครงสร้างการสืบพันธุ์ สามารถแสดงความหลากหลายการแพร่กระจายของไลเคนในกลุ่มต่างๆ ทั่วประเทศ โดย 1,116 ตัวอย่าง แยกได้เป็นกลุ่มครัสโตส 74%, โพลีโอส 14%, ฟรุติโคส 1%

กลุ่มอื่นๆ 2% และไม่สามารถจัดจำแนกชนิดได้คิดเป็น 9% (Fig. 2) กลุ่มครัสโตสจะมีการแพร่กระจายสูงที่สุด
 จัดเป็นกลุ่มที่พบเสมอ (common species) เมื่อคิดเฉพาะกลุ่มครัสโตส ความหลากหลายเฉพาะกลุ่มจะพบ
 มากในกลุ่มกราไฟด์ คิดเป็น 45% ทั้งหมด (Fig. 3) กลุ่มที่มีการแพร่กระจายน้อยที่สุด คือ กลุ่มฟรุติโคส

Fig. 2 แสดงการแพร่กระจายของไลเคนในกลุ่มต่างๆ ทั่วประเทศ

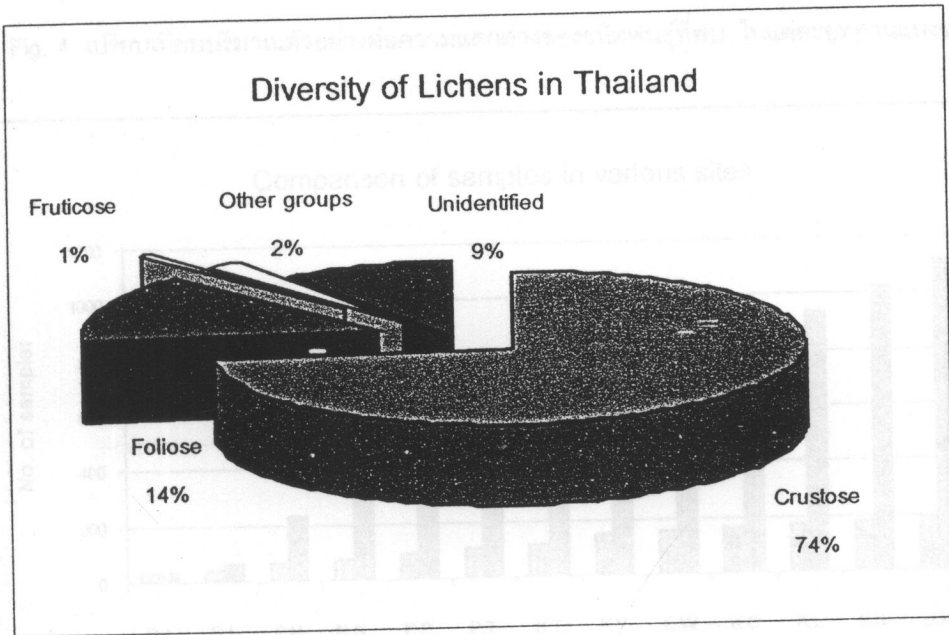
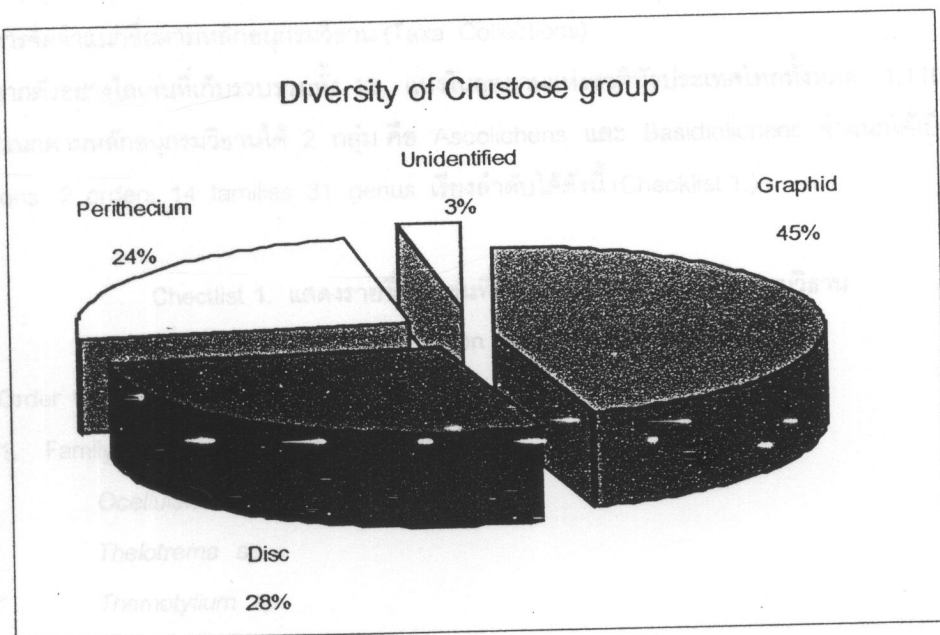
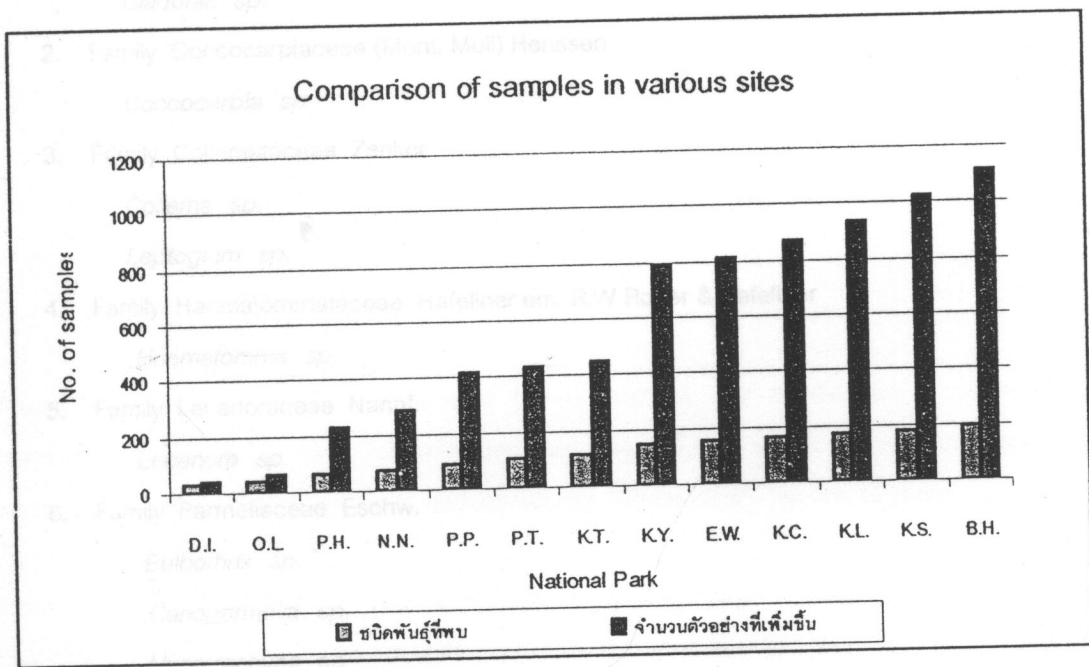


Fig. 3 แสดงการแพร่กระจายของไลเคนในกลุ่มครัสโตส



เปรียบเทียบปริมาณตัวอย่างที่เก็บรวบรวมได้ ต่อความแตกต่างของชนิดพันธุ์ที่พบ ในแต่ละอุทยานแห่งชาติ (Fig. 4) ปริมาณชนิดพันธุ์ไลเคนจะเพิ่มขึ้นตามปริมาณตัวอย่างที่เก็บได้ แสดงความแตกต่างของชนิดพันธุ์ที่แปรตามแหล่งที่เก็บ ดังนั้นเมื่อเพิ่มแหล่งเก็บตัวอย่างให้มากขึ้น จะทำให้พบความหลากหลายของชนิดพันธุ์มากขึ้นด้วย

Fig. 4 เปรียบเทียบปริมาณตัวอย่างต่อความแตกต่างของชนิดพันธุ์ที่พบ ในแต่ละอุทยานแห่งชาติ



5.2 การจัดจำแนกชื่อตามหลักอนุกรมวิธาน (Taxa Collections)

จากตัวอย่างไลเคนที่เก็บรวบรวมทั้ง 13 แห่งในอุทยานแห่งชาติทั่วประเทศไทยทั้งหมด 1,116 ตัวอย่าง จัดจำแนกตามหลักอนุกรมวิธานได้ 2 กลุ่ม คือ Ascolichens และ Basidiolichens จำแนกได้เป็น 2 sub-divisions 2 orders 14 families 31 genus เรียงลำดับได้ดังนี้ (Checklist 1.)

Checklist 1. แสดงรายชื่อไลเคนที่ทำการสำรวจตามหลักอนุกรมวิธาน

Sub-Division Ascomycotina

1. Order Graphidales E.Bessey

1. Family Thelotremataceae (Nyl.) Stizenb.

Ocellularia sp.

Thelotrema sp.

Themotylium sp.

2. Family Graphidaceae Dumort.

Cyclographina sp.

Graphina sp.

Graphis sp.

Phaeographina sp.

Sarcographina sp.

Sarcographa sp.

2. Order Lecanorales Nannf.

1. Family Cladoniaceae Nyl.

Cladonia sp.

2. Family Coccocarpiaceae (Mont. Mull) Henssen

Coccocarpia sp.

3. Family Collemataceae Zenker

Collema sp.

Leptogium sp.

4. Family Haematommataceae Hafellner em. R.W.Roger & Hafellner

Haematomma sp.

5. Family Lecanoraceae Nannf.

Lecanora sp.

6. Family Parmeliaceae Eschw.

Bulbothrix sp.

Canoparmelia sp.

Hypotrachyna sp.

Parmotrema sp.

Relicina sp.

Xanthoparmelia sp.

7. Family Phyllopsoraceae Zahlbr.

Phyllopsora sp.

8. Family Physciaceae Zahlbr.

Dirinaria sp.

Buellia sp.

Heterodermia sp.

Pyxine sp.

9. Family Usneaceae Eschw.

Usnea sp.

10. Family Trypetheliaceae Zanker.

Laurera sp.

Trypethelium sp.

3. Order Teroschistales D. Hawksw. & Eriksson

1. Family Letruitaceae Bellemere & Hafellner

Letruitia sp.

Sub-Division Basidiomycotina

Basidiomycetes Lichens

Family Clavulariaceae

Clavaria sp.

5.3 รายละเอียดลักษณะสำคัญทางอนุกรมวิธาน (Taxa Descriptions)

Sub-division Ascomycotina (Ascomycetes Lichens)

1. Order Graphidales E. Bessey

1.1 Family Thelotremaaceae (Nyl.) Stizenb.

Ocellularia sp.

Descriptions : Crustose, mature ascospores brown, ascoma and apothecium or similar open structure, ascoma with a round or distored disc, paraphyses simple or sparsely branched, proper exiple black, thallus on bark and photobiont *Trentepohlia*, spores muriform.

Thelotrema sp.

Descriptions : Crustose, mature ascospores brown, ascoma and apothecium or similar open structure, ascoma with a round or distored disc, paraphyses simple or sparsely branched, proper exiple pale brown or hyaline, exiple lined with periphysoids, spores muriform.

Themotylum sp.

Descriptions : Crustose, mature ascospores brown, ascoma and apothecium or similar open structure, ascoma lirellate, paraphyses reticulately branched and anatomosing, ascoma immersed in stromatic tissue, spores muriform.

1.2 Family Graphidaceae Dumort.

Cyclographina sp.

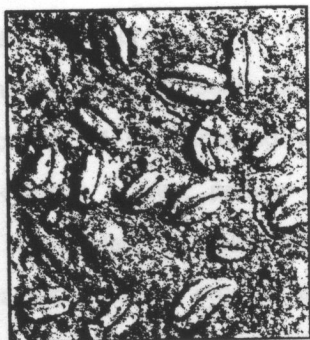
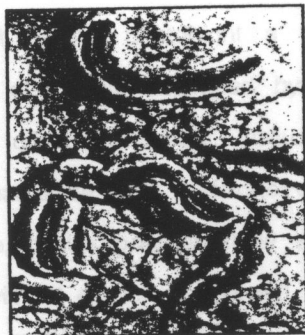
Descriptions : Crustose, mature ascospores hyaline, muriform, ascoma an apothecium or similar open structure, apothecium not immersed in stromatic tissue, ascus clavate, unitunicate, ascoma linear or branched.

Graphina sp.

Descriptions : Crustose, mature ascospores hyaline, muriform, ascoma an apothecium or similar open structure, apothecium not immersed in stromatic tissue, paraphyses simple or sparsely branched, ascus unitunicate, elongate, ascoma elongate or lirellate and immersed in or adnate on thallus.

Graphis sp.

Descriptions : Crustose, ascospores hyaline at maturity, ascoma an apothecium or similar open structure, ascomata irregular to lirellate and neither aggregated nor with paired parallel hymenia, ascospores 1+ purple, paraphyses simple, spores transeptate. (Fig. 5 & Fig. 6)

Fig. 5 *Graphis* sp.Fig. 6 *Graphis* sp.*Phaeographina* sp.

Descriptions : Crustose, mature ascospores brown, ascoma and apothecium or similar open structure, ascoma lirellate, paraphyses simple or sparsely branched, ascomata not in stromatic tissue, spores muriform. (Fig. 7 & Fig. 8)

Fig. 7 *Phaeographina* sp.Fig. 8 *Phaeographina* sp.*Sarcographina* sp.

Descriptions : Crustose, mature ascospores brown, ascoma and apothecium or similar open structure, ascoma lirellate, paraphyses simple or sparsely branched, ascomata immersed in stromatic tissue, spores muriform

Sarcographa sp.

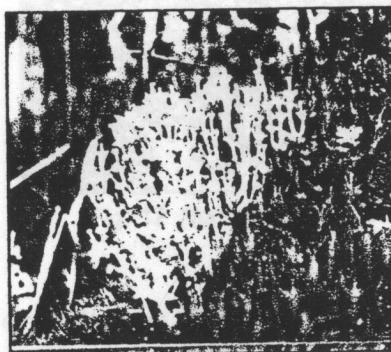
Descriptions : Crustose, ascospores brown at maturity, transeptate, fruiting body an apothecium or similar open structure, ascospores maturing in an ascus, ascoma dark, not deeply immersed in thallus, ascomata grouped in stromatic tissue. (Fig. 9)

2. Order Lecanorales Nannf.

2.1 Family Cladoniaceae Nyl.

Cladonia sp.

Descriptions : Squamulose, thallus less than 1 cm. tall when mature, ascomata on more robust structure, for example truly fruticose thalli, podetia or pseudopodetia, thallus gray, green, olive or black, if K+ then not purple, photobiont a chlorophyte, thallus robust, commonly at least partly corticate, not of loosely entangled hyphae, thallus more or less erect, not of anastomosing strands, on diverse substrata, thallus hollow, apothecia pale to dark brown or red, primary thallus squamulose with perforate or eperforate podetia which are not inflated, or thallus truly fruticose, thallus gray or straw yellow, axils perforate, basal squamulose usually present, apothecia without exiple, disc brown or red. (Fig. 10)

Fig. 9 *Sarcographa* sp.Fig. 10 *Cladonia* sp.

2.2 Family Coccocarpiaceae (Mont. Mull) Henssen

Coccocarpia sp.

Descriptions : Foliose, margin of thallus eciliate, upper surface of thallus white, gray, brown or straw yellow to yellow-green, apothecia on upper surface of lobes, not found on rocks or soil, photobiont a cyanobacterium (*Scytonema* sp.), apothecia without an exiple.

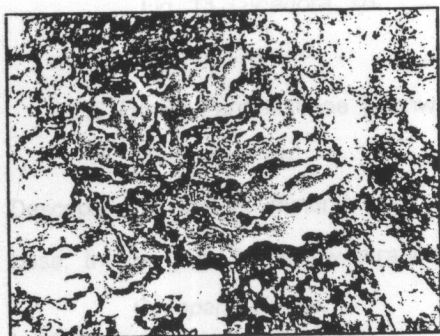
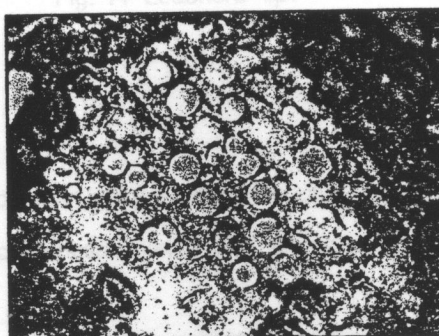
2.3 Family Collemataceae Zenker

Collema sp.

Descriptions : Foliose, thallus without cyphellae, pseudocyphellae, cyphellum-like pits in indumentum or vein-like markings, rhizines absent, thallus neither umbilicate nor attached by holdfast, thallus without cephalodia, thallus glabrous below, thallus gray to brown, yellow-brown, straw yellow, yellow-green, green, olive, black, K+ not purple, photobiont a cyanobacterium, upper surface of thallus smooth or rugulose but not hairy, thallus homiomorous, gelatinous when wet, ascospores thin-walled, without a gelatinous episporium, thallus without a true cortex instead with discrete swollen end-cells present at least in patches.

Leptogium sp.

Descriptions_: Foliose, thallus without cyphellae, pseudocyphellae, cyphellum-like pits in indumentum or vein-like markings, rhizines absent, thallus neither umbilicate nor attached by holdfast, thallus without cephalodia, thallus glabrous below, thallus gray to brown, yellow-brown, straw yellow, yellow-green, green, olive, black, K+ not purple, photobiont a cyanobacterium, upper surface of thallus smooth or rugulose but not hairy, thallus homoiomerous, gelatinous when wet, ascospores thin-walled, without a gelatinous episporium, cortex of closely packed angular cells. (Fig. 11)

Fig. 11 *Leptogium* sp.Fig. 12 *Haematomma* sp.

2.4 Family Haematommataceae Hafellner em. R.W.Roger & Hafellner

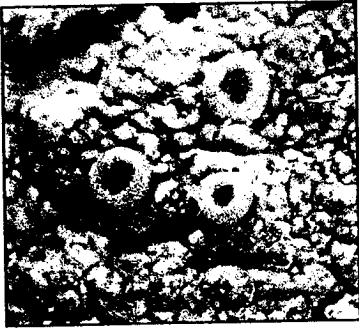
Haematomma sp.

Descriptions : Crustose, ascospores hyaline at maturity, transeptate, ascoma an apothecium or similar open structure, ascmata disc-like to globose, paraphyses reticulately branched and anastomosing, at least in epihymenium, exiple of ascoma not cobwebby, disc of ascoma red, sometimes masked by white or yellow pruina, thallus on bark, without campylidia. (Fig. 12)

2.5 Family Lecanoraceae Nannf.

Lecanora sp.

Descriptions : Crustose, ascospores 1-8 per ascus, photobiont a chlorophyte, ascoma an apothecium or similar open structure, ascospores hyaline at maturity, cephalodia not present on thallus, ascospores less than 30 μm . long, apothecial disc cream, buff, brown or black, ascospores maturing in ascus, ascoma with an exiple at least when young, apothecial disc pale to dark brown, but not black, thallus with neither marginal lobes nor squamules, tholus or internal cap well-developed, I+ blue, paraphyses sprasely branched, ascal tip I+ dark blue, with an apical body, thallus white, gray or yellow. (Fig. 13 & Fig. 14)

Fig. 13 *Lecanora* sp.Fig. 14 *Lecanora* sp.

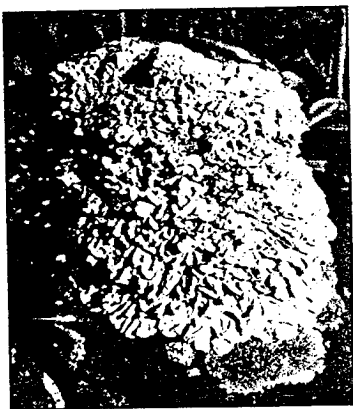
2.6 Family Parmeliaceae Eschw.

Bulbothrix sp.

Descriptions : Foliose, mineral gray, narrow-lobed with inflated marginal cilia, cilia bulbate at base, thallus gray, K+ yellow (atranorin), spores colourless, simple and 8 spores per ascus.

Canoparmelia sp.

Descriptions : Foliose, margin of thallus eciliate, upper surface of thallus white, gray, brown or straw yellow to yellow-green, apothecia on upper surface of lobes, not found on rocks or soil, photobiont a chlorophyte, lower surface of thallus rhizinate only, not tomentose, upper cortex without pseudocyphellae, thallus not umbilicate, rhizines simple, squarrose or coralloid, usually not protruding beyond lobe margin, thallus lobes usually less than 3 mm. wide, truncate or linear, rhizines extending to lobe tips, thallus UV -, lobes discrete, apothecia with a thalline exiple, ascospores simple, thallus without cephalodia, upper cortex gray, margin eciliate, lower surface dark brown to black, lobes subrotund, black below. (Fig. 15)

Fig. 15 *Canoparmelia* sp.Fig. 16 *Hypotrachyna* sp.

Hypotrachyna sp.

Descriptions : Foliose, margin of thallus eciliate, upper surface of thallus white, gray, brown or straw yellow to yellow-green, apothecia on upper surface of lobes, not found on rocks or soil, photobiont a chlorophyte, lower surface of thallus rhizinate only, not tomentose, upper cortex without pseudocyphellae, thallus not umbilicate, rhizines dichotomously branched and prominent, usually protruding beyond lobe margin, spores simple. (Fig. 16)

Parmotrema sp.

Descriptions : Foliose, margin of thallus eciliate, upper surface of thallus white, gray, brown or straw yellow to yellow-green, apothecia on upper surface of lobes, not found on rocks or soil, photobiont a chlorophyte, lower surface of thallus rhizinate only, not tomentose, upper cortex without pseudocyphellae, thallus not umbilicate, rhizines simple, squarrose or coralloid, usually not protruding beyond lobe margin, thallus lobes usually more than 5 mm. wide, broadly rotund at tips, rhizines sparse or absent in a broad naked zone near lobe tips, rhizines dense near centre of thallus, absent from a broad marginal zone, pycnidia laminal. (Fig. 17)

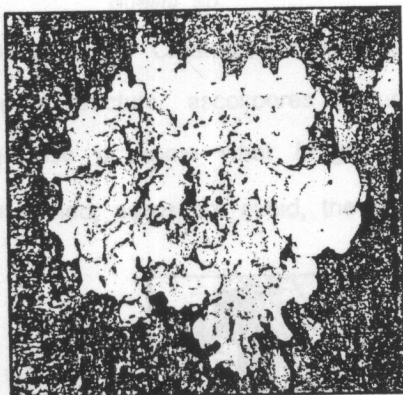


Fig. 17 *Parmotrema tinctorum*.

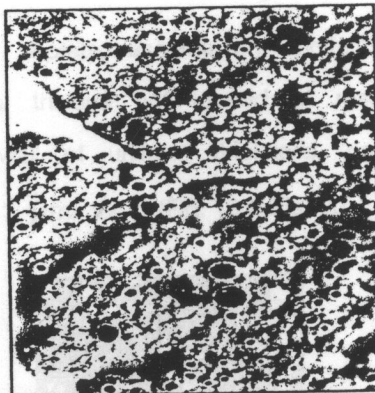


Fig. 18 *Heterodermia sp.*

Relicina sp.

Descriptions : Foliose, mineral gray, narrow-lobed with inflated marginal cilia, cilia bulbate at base, thallus straw yellow to yellow-green, K- yellow (usnic acid)

Xanthoparmelia sp.

Descriptions : Foliose, margin of thallus eciliate, upper surface of thallus white, gray, brown or straw yellow to yellow-green, thallus straw yellow to yellow-green, on rocks or soil, lobes narrow truncate.

2.7 Family Phyllopsoraceae Zahlbr.

Phyllopsora sp.

Descriptions : Squamulose, thallus monomorphic, ascomata immerse in, or sessile on, squamules, primary photobiont a chlorophyte, but *Nostoc* may occur in cephalodia, thallus not of scattered shell-like squamules, colour various, sorediate margins rare, thallus variously

attached but never by well-developed rhizines, ascoma an apothecium, ascospores simple, cephalodia absent, ascus 8 spored, thallus K+ not purple, thallus white to brown to pink, apothecia sessile or immersed, paraphyses simple, thallus of overlapping scales or dissected lobules, exiple of disc cobwebby, hypothallus clearly visible.

2.8 Family Physciaceae Zahlbr.

(Fig. 21) *Dirinaria* sp.

Descriptions : Foliose, margin of thallus eciliate, upper surface of thallus white, gray, brown or straw yellow to yellow-green, apothecia on upper surface of lobes, not found on rocks or soil, photobiont a chlorophyte, lower surface of thallus rhizinate only, not tomentose, upper cortex without pseudocyphellae, thallus not umbilicate, rhizines simple, squarrose or coralloid, usually not protruding beyond lobe margin, thallus lobes usually less than 3 mm. wide, truncate or linear, rhizines extending to lobe tips, thallus UV -, lobes discrete, apothecia with a thalline exiple, ascospores septate, hypothecium dark, lower cortex which careful examination shows has no rhizines.

(Fig. 21) *Buellia* sp.

Descriptions : Crustose, ascospores brown, one septate, ascoma an apothecium or similar open structure, ascospores maturing in ascus, thallus not lobed at margins, ascoma globose or some what irregular, ascospore wall of uniform thickness, paraphyses little branched, ascospore ovoid, the wall more than 1 μm . thick. (Fig. 19 & Fig. 20)

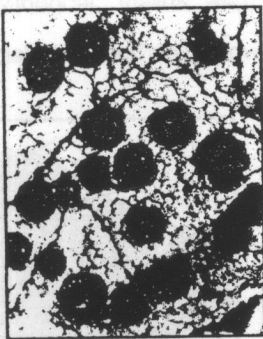


Fig. 19 *Buellia* sp.

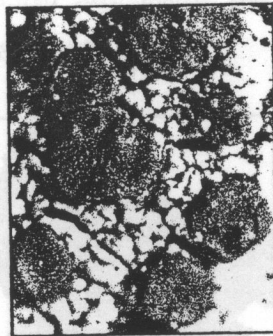


Fig. 20 *Buellia* sp.

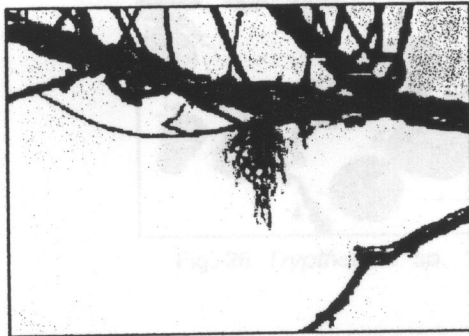
Heterodermia sp.

Descriptions : Foliose, margin of thallus eciliate, upper surface of thallus white, gray, brown or straw yellow to yellow-green, apothecia on upper surface of lobes, not found on rocks or soil, photobiont a chlorophyte, lower surface of thallus rhizinate only, not tomentose, upper cortex without pseudocyphellae, thallus not umbilicate, rhizines dichotomously branched and prominent, usually protruding beyond lobe margin, spores septate. (Fig. 18)

Pyxine sp.

Descriptions : Foliose, margin of thallus eciliate, upper surface of thallus white, gray, brown or straw yellow to yellow-green, apothecia on upper surface of lobes, not found on rocks or soil, photobiont a chlorophyte, lower surface of thallus rhizinate only, not tomentose, upper cortex pseudocyphellate, ascospores septate, thallus lobes usually less than 2 mm. wide.

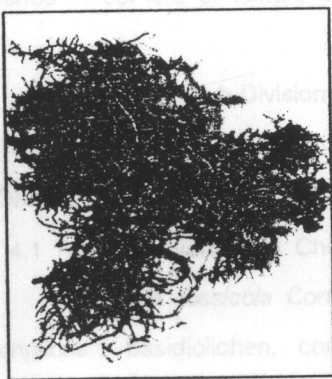
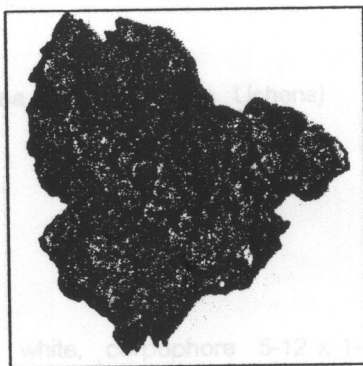
(Fig. 21)

Fig. 21 *Pyxine* sp.Fig. 22 *Usnea* sp.

2.9 Family Usneaceae Eschw.

Usnea sp.

Descriptions : Fruticose, thallus larger, the lobes more than 1 cm. Long when mature, thallus solid and cylindrical, thallus with a central chondroid axis, thallus yellow-green to green or red, apothecial disc buff to yellow-green. (Fig. 22 & Fig. 23)

Fig. 23 *Usnea* sp.Fig. 24 *Laurera bengualensis*.

2.10 Family Trypetheliaceae Zanker.

Laurera sp.

Descriptions : Crustose, mature ascospores hyaline, muriform, ascoma a perithecium or similar closed structure, ascoma a free perithecium, ascoma immersed in stromatic tissue. (Fig. 24)

Trypethelium sp.

Descriptions : Crustose, Ascospores hyaline at maturity, ascoma a perithecium, similar closed structure or deeply cupular, ascoma with a distinct ostiole, or asci single in locules, ascoma simple or chambers fused only at ostiole, asci in a hymenium, ascoma immersed in stromatic tissue, ascospores with a thick wall and lenticular locules, spores transeptate. (Fig. 25 & Fig. 26)

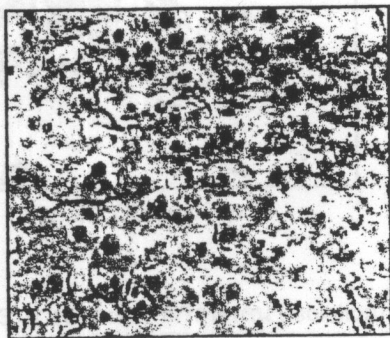


Fig. 25 *Trypethelium* sp.

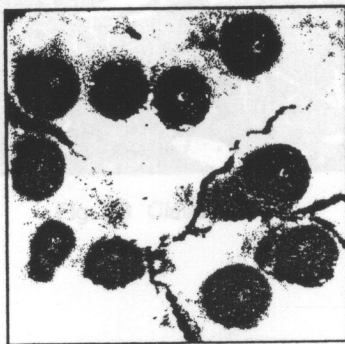


Fig. 26 *Trypethelium* sp.

3. Order Teroschistales D. Hawksw. & Eriksson

3.1 Family Letruitaceae Bellemere & Hafellner

Letruitia sp.

Descriptions : Crustose, mature ascospores hyaline, ascoma an apothecium or similar open structure, apothecium not immersed in stromatic tissue. Paraphyses simple or sparsely branched, ascus unitunicate, elongate, ascoma round or distort, ascus wall or tholus I+ blue, ascoma opaque when wet, open, concave to convex, thallus K+ purple, ascospore wall often thickened in corners of lumen, spores muriform.

Sub-Division Basidiomycotina (Basidiomycetes Lichens)

4. Order Cantharellales

4.1 Family Clavariaceae Chevall.

Clavaria fossicola Comer.

Descriptions : Basidiolichen, coral mushroom, white, carpophore 5-12 x 1-1.5 mm., usually single, cylindrical, tip pointed or sometimes blunted, solid and cracked when dry, 1-2.5 x 0.5-0.8 tall, pruinose, spore white, globose or ovoid, on soil. (Fig. 27 & Fig. 28)

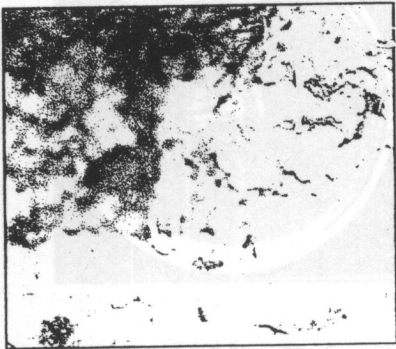


Fig. 27 *Clavaria* sp.

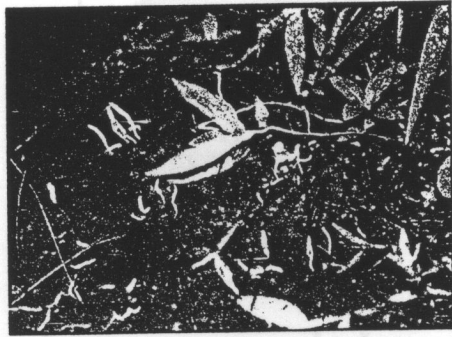


Fig. 28 *Clavaria* sp.

5.3 การแยกเชื้อราจากไลเคน (Isolation)

จากตัวอย่างทั้งหมด เมื่อทำการแยกราจากส่วนสืบพันธุ์ของไลเคนด้วยวิธีการปลดปล่อยสปอร์และคัดแยกให้ได้เชื้อราที่บริสุทธิ์แล้ว สปอร์ที่ได้มักเป็น simple spore นอกจากนี้อาจพบ muniform และ transeptate spore บ้างเป็นส่วนน้อย (Fig. 29) ลักษณะการงอกของเส้นใยมักเป็นแบบออกจากทุกทิศทางของสปอร์ (Fig. 30 & Fig. 31) เมื่อคัดแยกและถ่ายสปอร์ที่งอกลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม การเจริญของโคไคโนจะมีอายุที่ต่างกัน (Fig. 32, 33, 34, 35) ขึ้นกับปัจจัยต่างๆ ที่ต้องการไม่เท่ากัน ซึ่งสามารถแยกได้มากกว่า 300 สายพันธุ์ และส่งไปเก็บรวบรวมไว้ที่ห้องปฏิบัติการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ ของศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติแล้วประมาณ 40 สายพันธุ์ เพื่อทำการตรวจสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป อีกกว่า 250 สายพันธุ์อยู่ในขั้นตอนการเลี้ยงเชื้อเพื่อให้มีโคไคโนมากพอที่จะส่งเก็บได้ นอกจากนี้ยังเก็บเชื้อราที่แยกได้ในรูปอาหารลาดเอียง (slant) เพื่อเป็นเชื้อสำรองเพื่อเป็นการป้องกันการปนเปื้อนด้วย (Fig. 36 & Fig. 37)

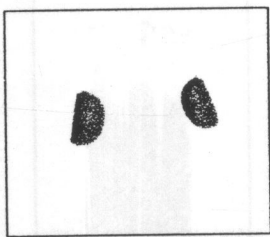


Fig. 29 ลักษณะของสปอร์

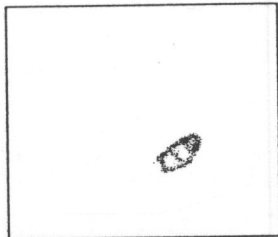


Fig. 30 การงอกของเส้นใย

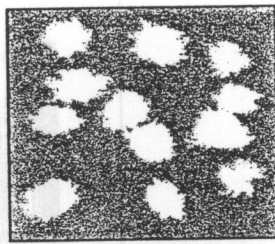


Fig. 31 การงอกจากสปอร์แบบทุกทิศทาง

Fig. 36 การถ่ายเชื้อลงภาชนะลาดเอียง

Fig. 37 การรวบรวมเชื้อ อายุ 5 เดือน

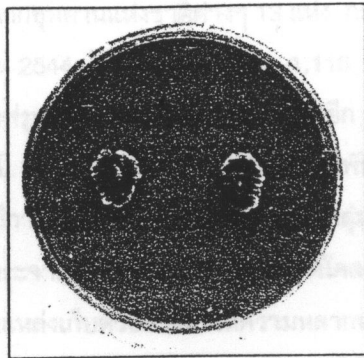
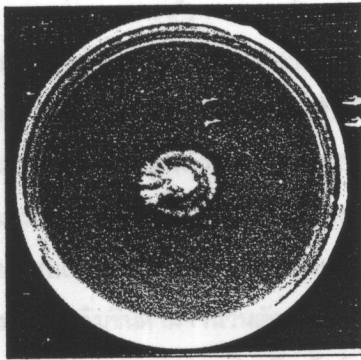


Fig. 32 & Fig. 33 ลักษณะการเจริญของเชื้อราจากไลเคนบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

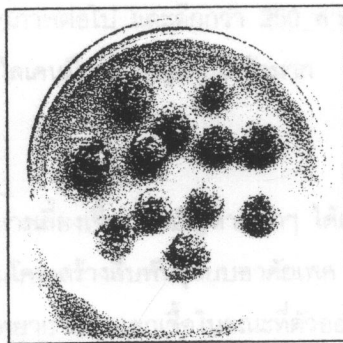
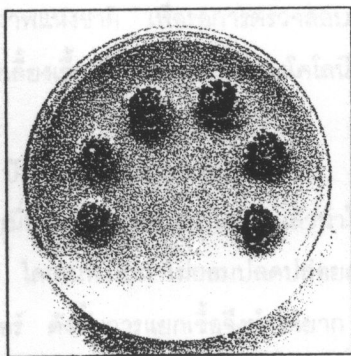


Fig. 34 & Fig. 35 ลักษณะการเจริญของเชื้อราจากไลเคนบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

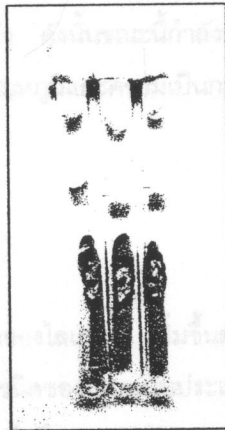
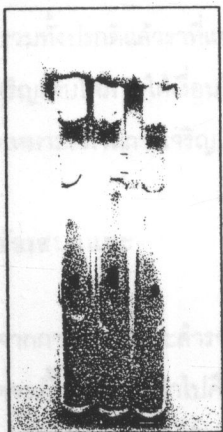


Fig. 36 การถ่ายเชื้อลงบนอาหารลาดเอียง

Fig. 37 การเจริญของเชื้อ อายุ 5 เดือน

นอกจากนี้ยังพบเชื้อราจากไลเคนพบว่ามีได้จากไลเคนชนิดที่มีการเจริญเติบโตช้า ซึ่งมีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่แห้งแล้งและเย็นได้ดีกว่าไลเคนชนิดอื่น ๆ ซึ่งมีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ชื้นแฉะได้ดีกว่าไลเคนชนิดอื่น ๆ ซึ่งมีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่แห้งแล้งและเย็นได้ดีกว่าไลเคนชนิดอื่น ๆ ซึ่งมีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ชื้นแฉะได้ดีกว่าไลเคนชนิดอื่น ๆ

6. สรุปและวิจารณ์ผลการดำเนินงาน (Conclusions and Discussions)

การสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างไลเคนแบบสุ่ม จากอุทยานแห่งชาติต่างๆ 13 แห่ง กระจายทั่วทุกภาคของประเทศไทย ในช่วงเดือนตุลาคม 2543 ถึงกันยายน 2544 ได้ตัวอย่างจำนวน 1,116 ตัวอย่าง จัดเป็นไลเคนในกลุ่มครัสโตส 74%, กลุ่มโพลีโอส 14%, กลุ่มฟรุทติโคส 1% และกลุ่มอื่นๆ อีก 2% สามารถจัดจำแนกตามหลักอนุกรมวิธานได้เป็น 3 ลำดับ, 14 วงศ์, 34 สกุล และกว่า 200 ชนิดพันธุ์ นอกจากนี้ไม่สามารถจำแนกชนิดได้ 9% จากตัวอย่างทั้งหมด กลุ่มที่มีการแพร่กระจายมากที่สุด คือ กลุ่มครัสโตส จัดเป็นกลุ่มที่พบเสมอ (common species) กลุ่มที่มีการแพร่กระจายน้อยที่สุด คือ กลุ่มฟรุทติโคส จำนวนชนิดพันธุ์ของไลเคนเพิ่มขึ้นตามจำนวนตัวอย่างที่เก็บ และการเพิ่มแหล่งเก็บตัวอย่างทำให้ความหลากหลายเพิ่มขึ้นด้วย

เมื่อทำการแยกจากส่วนสืบพันธุ์ของไลเคนด้วยวิธีการปลดปล่อยสปอร์ และคัดแยกให้ได้เชื้อราที่บริสุทธิ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อแล้ว สามารถแยกได้มากกว่า 300 สายพันธุ์ โดยเชื้อราจากไลเคนที่แยกได้ประมาณ 40 สายพันธุ์ ได้ถูกส่งไปเก็บรวบรวมไว้ที่ห้องปฏิบัติการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ของศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ เพื่อรอการตรวจสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป และอีกกว่า 250 สายพันธุ์อยู่ในขั้นตอนการเลี้ยงเชื้อเพื่อให้มีปริมาณของโคโลนีมากพอ เนื่องจากไลเคนมีการเจริญเติบโตช้ามาก

7. ปัญหาและแนวทางแก้ไข

เมื่อทำการแยกจากไลเคนแล้วนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบปัญหาหลักๆ ได้แก่

7.1 ไลเคนที่เก็บมาไม่ยอมปลดปล่อยสปอร์ หรือไม่มีส่วนโครงสร้างสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ ทำให้ไม่มีการสร้างสปอร์ ดังนั้นการแยกเชื้อจึงทำได้ยาก การแก้ไขโดยพยายามรีบแยกเชื้อในขณะที่ตัวอย่างยังสด และแก่เต็มที่ ส่วนแบบที่ไม่มีการสร้างโครงสร้างสืบพันธุ์ ขณะนี้กำลังหาวิธีแยกและทดลองเลี้ยงเชื้อต่อไป

7.2 ราที่แยกจากไลเคนไม่งอก หรืองอกแล้วมีการเจริญเติบโตช้า เนื่องจากการขาดสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม รวมทั้งปรกติแล้วราที่แยกได้มีการเจริญเติบโตช้าอยู่แล้ว ดังนั้นขณะนี้กำลังทำการทดลองเลี้ยงเชื้อเพื่อวัดการเจริญเติบโตภายใต้เงื่อนไขที่ต่างกันของชนิดอาหาร อุณหภูมิและความเป็นกรด-ด่าง เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีความเหมาะสมในการเจริญเติบโตของไลเคน

7. ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาและสำรวจเบื้องต้นพบว่าปริมาณชนิดของไลเคน เพิ่มขึ้นตามจำนวนของการเก็บสำรวจตลอดจนพื้นที่ ๆ ที่เข้าไปศึกษาเพิ่มขึ้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่าชนิดของไลเคนในประเทศไทยนั้นมีความหลากหลายอยู่มาก ดังนั้นการ ออกสำรวจและเก็บตัวอย่างในที่ใหม่ๆ เพื่อศึกษาความหลากหลายและการแพร่กระจายของชนิดพันธุ์ไลเคน รวมทั้งจัดจำแนกชื่อและเก็บเป็นข้อมูลในการอ้างอิง จึงเป็นประโยชน์อย่างยิ่งทั้งในด้านการศึกษาความหลากหลาย ตลอดจนโอกาสที่จะพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีฤทธิ์ในการต่อต้านโรคต่าง ๆ โดยเฉพาะในเขตร้อนที่ศึกษาอยู่ภายในหน่วยปฏิบัติการวิจัยเออี หรือแม้แต่การนำไปศึกษาวิจัยใช้ประโยชน์ในด้านอื่น ๆ อีก

นอกจากนี้จากการแยกจากไลเคนพบว่าราที่ได้จากไลเคนนั้นมีการเจริญเติบโตที่ช้า ดังนั้นการทดลองศึกษาสภาวะและปัจจัยที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อราที่แยกได้จากไลเคน เพื่อให้ราที่แยก ได้เจริญเติบโตเร็วขึ้น จึงมีความจำเป็นตลอดทั้งยังเป็นข้อมูลสำหรับการเลี้ยงเชื้อในอนาคต

9. บรรณานุกรม (References)

- พิบูลย์ มงคลสุข และคณะ, (2539). รายงานโครงการวิจัยฉบับสมบูรณ์ เรื่อง "การเก็บรวบรวมและจำแนกสายพันธุ์ไลเคน เขตป่าภูตึนสวนทราย อำเภอนาหว้า จังหวัดเลย", ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง, 101 หน้า.
- พิบูลย์ มงคลสุข และคณะ, (2540). รายงานโครงการวิจัยฉบับสมบูรณ์ เรื่อง "ความหลากหลายของสายพันธุ์ไลเคน ณ สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ อำเภอแมริม จังหวัดเชียงใหม่", ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง, 126 หน้า.
- Ahmadjian, V. (1993), *The Lichen Symbiosis*, John Wiley & Sons, Inc. Canada, 250 pp.
- Lawrey, J.D. (1984), *Biology of Lichenized Fungi*, CBS Educational and Professional Publishing, New York, U.S.A., 408 p.
- Friedl, T. and B. Bundel (1996). Photobionts, In Nash III, T.H.(ed), *Lichen Biology*, Cambridge University Press, New York. pp. 8-23.
- Hale, M.E., (1979), *How to know the lichens*, Wm. C. Brown Company Publishers, 246 p.
- Hawksworth, D.L. & D.L. Hill, (1984), *The lichen-forming fungi*, McMorquodale Ltd., Glasgow.
- Smith, A.L., (1975), *Lichens*, The Richmond Pub. Co., Richmond.
- Tehler, A., (1996), *Systematic, Phylogeny and Classification*. In Nash III, T.H. (ed), *Lichen Biology*, Cambridge University Press, New York, pp. 217-239.
- Vainio, E.A. (1905). Lichens. *Botanisk Tidsskrift*. 29: 104-052.
- Wolsley, P.A. & B. Aguirre-Hudson, (1995), Key to lichen genera in Thailand with special reference to epiphytic taxa, part I: macrolichens. *Nat. Hist. Bull. Siam. Soc.* 43: 303-335.
- Yoshimura, I. (1978), Some Lichens of Thailand collected by Danish botanists 1958-1968, *Bull. Kochi Gakuen J. College*, 9: 35-40.