Thesis Title Biodiversity of Endophytic and Saprobic Fungi in Wild and Cultivated Zingiberaceae

Author Miss Boonsom Bussaban

Degree Doctor of Philosophy (Biology)

Thesis Advisory Committee
Assoc. Prof. Dr. Saisamorn Lumyong — Chairperson
Dr. Eric H.C. McKenzie — Member
Prof. Dr. Kevin D. Hyde — Member

ABSTRACT

Studies of fungi on Zingiberaceae were initiated in northern Thailand (Chiang Mai, Lampang and Phayao provinces) in order to investigate the ecology and biodiversity of endophytic and saprobic fungi from four wild gingers, *Alpinia malaccensis*, *Amomum siamense*, *Etlingera elatior*, *E. littoralis* and two cultivated gingers, *Alpinia galanga* and *Zingiber officinale*.

Endophytic fungi were isolated from 7,200 samples of healthy leaves, pseudostems, and rhizomes, using a triple surface sterilization method. Overall isolate prevalence from surface sterilized tissues of wild and cultivated species varied from 25–85% at each locality sampled in the wet and dry seasons. Forty six fungal taxa were identified from the six plant species and comprised 9 ascomycetes and 37 anamorphic

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

fungi (6 coelomycetes and 31 hyphomycetes). In most cases more fungal isolates were recovered from leaf and pseudostem than from rhizome, and fewer isolates were recovered from younger than older leaves. The fungal endophytes in wild and cultivated Zingiberaceae were similar with *Colletotrichum gloeosporioides* the dominant species. Two new ascomycete species, *Gaeumannomyces amomi* and *Leiosphaerella amomi* isolated from leaves and rhizomes, respectively were described. Three other new species, *Pyricularia kookicola, P. longispora,* and *P. variabilis* were isolated from leaves. *Gaeumannomyces amomi* and *P. longispora* were also found in decaying zingiberaceous tissues.

Saprobic fungi were investigated from 440 samples of decaying leaves and pseudostem tissues of the same hosts in the same sites as that of the endophytic study. One hundred and sixty three fungal species were identified comprising 20 basidiomycetes, 26 ascomycetes and 117 anamorphic fungi (12 coelomycetes and 105 hyphomycetes). *Acremonium* sp. 1 was the most common fungus found on the wild zingiberaceous species, *Alpinia malaccensis*, *Amomum siamense*, *Etlingera elatior* and *E. littoralis,* being found on 31%, 41%, 37% and 27% of samples, respectively. In the cultivated species, *Phomopsis* sp. (35%) was the most common species on *Alpinia galanga*, while *Phaeosphaeria* sp. (80%) was the most commonly encountered species from *Zingiber officinale*. Distinct fungal communities were found on leaves and pseudostems of the six zingiberaceous species. In terms of the numbers of taxa recovered, fungi were more diverse on wild zingiberaceous species than on cultivated species. Three

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

new species, *Berkleasmium nigroapicale, B. sutheppuiense*, and *Xenosporium amomi* were recovered and described.

Five fungi, *Alternaria alternata*, *Colletotrichum gloeosporioides, Phomopsis* sp., *Phyllosticta capitalensis* and *Pyricularia costina* were identified from zingiberaceous samples showing symptoms of anthracnose on leaves, leaf blast or leaf spot. The relationships between zingiberaceous endophytes, saprobes and pathogens were determined by pathogenicity and antagonistic tests. Selected endophytes and saprobes were inoculated on to tissue cultured ginger to test their pathogenicity. Endophytic isolates, *Alternaria alternata*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Glomerella* sp., *Phomopsis* sp., *Phyllosticta capitalensis* and *Pyricularia costina*, and saprobic isolates, *Fusarium* sp. and *Pyricularia costina*, caused disease lesions and death on the gingers, either in the tissue culture containers or after transplanting to plastic pots. This result confirms earlier reports that many fungal pathogens may be latent in their host long before the expression of disease symptoms. Fifty seven strains of endophytes and 36 saprobes were proved antagonistic to the pathogenic fungus, *Pyricularia costina* in dual culture tests.

Fungal isolates of genera *Pyricularia* and *Myrothecium* were identified and characterized by morphological and molecular methods. *Pyricularia* species were commonly isolated from the zingiberaceous plants. The phylogenetic relationships of *Pyricularia* species, and species from related genera, were established from sequences of the internal transcribed spacer ribosomal RNA gene. Phylogenetic analysis disclosed a consistent correlation with spore morphology. *Pyricularia* species studied that have

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

obpyriform conidia fell within the Magnaporthaceae cluster with high bootstrap support. *Pyricularia variabilis* was more closely related to *Dactylaria*, *Tumularia* or *Ochroconis* species than to the Magnaporthaceae. The phylogenetic relationships of *Myrothecium* species, and species from related genera, were also established from sequences of the internal transcribed spacer ribosomal RNA gene. *Myrothecium cinctum* with striate conidia, isolated from various hosts including the Zingiberaceae, and two species previously described as *Solheimia* (*S. costaspora* and *S. kamatii*) that also have striate conidia and similar conidial size, fell within the same clade with high bootstrap support. Based on the molecular data (ITS ribosomal DNA sequences) *Solheimia* species should be synonyms of *Myrothecium cinctum*.

Zingiberaceous fungi were screened for enzyme production. Thirty three fungal isolates were tested for cellulase and mannanase production. Of these, 31 isolates showed a zone of clearing around agar wells containing carboxymethylcellulose as a substrate for cellulase and 30 showed clearing around locust bean gum as a substrate for mannanase. *Fusarium* sp. (CMUZE0388) produced the widest clearing zone (25 mm diameter) in cellulase testing plates, while *Talaromyces flavus* (CMUZE0200) produced the widest clearing zone (26 mm diameter) in mannanase testing plates. Protease production was tested by inoculating 133 fungal isolates on to casein agar plates (skim milk agar) and incubating at room temperature for 4 days. One hundred and four fungal isolates yielded zones of clearing, with *Trichoderma* sp. (CMUZS39-2) producing the widest clearing zone (62.3 mm diameter). In screening for antimicrobial production, 78 isolates of endophytic fungi and 52 saprobic fungi were grown in two fermentation media. A paper

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

disk agar diffusion assay method was used to check the activity of resulting supernatants. Growth of *Penicillium avellaneum* was most strongly inhibited by *Chaetomium globosum* (CMUZE0132), while growth of the yeast, *Candida albicans*, was most strongly inhibited by *Papulaspora* sp. (CMUZE0118). The four bacteria, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*, were most inhibited by *Talaromyces flavus* (CMUZE0200), an unidentified fungus (CMUZE0126), *Colletotrichum gloeosporioides* (CMUZE0552) and *Phyllosticta capitalensis* (CMUZE0172), respectively. Production of the bioactive compounds from *Chaetomium globosum* (CMUZE0132) was further optimized. Compounds with broad spectrum activity against *Penicillium avellaneum*, *Pyricularia oryzae* and *Phytophthora* sp. were isolated and purified by resin HP20 and silica gel column chromatography. The composition of two bioactive chemicals, studied by mass spectophotometry, are $C_{20}H_{29}O_6$ and $C_{25}H_{44}O_{15}N_6$.

Key words: *Alpinia galanga*, *Alpinia malaccensis*, *Amomum siamense*, *Etlingera elatior*, *Etlingera littoralis*, *Zingiber officinale*, endophytes, saprobes

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ ความหลากหลายทางชีวภาพของเชื้อราเอนโดไฟติก และซาโพรบิกที่เจริญในพืชวงศ์ขิงพันธุ์ป่าและพันธุ์ปลูก

ผู้เขียน นางสาวบุญสม บุษบรรณ์

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (ชีววิทยา)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ.ดร. สายสมร ลำยอง ประธานกรรมการ
Dr. Eric H.C. McKenzie กรรมการ
Prof. Dr. Kevin D. Hyde กรรมการ

บทคัดย่อ

การศึกษาเชื้อราในพืชวงศ์ขิงที่เจริญในป่าและแปลงปลูกบริเวณภาคเหนือของประเทศไทย (เชียงใหม่ ลำปาง และพะเยา) มีจุดมุ่งเน้นเพื่อศึกษาความหลากหลายของราเอนโดไฟท์ และราซาโพรบที่เจริญในพืชวงศ์ขิงพันธุ์ป่า 4 ชนิดคือ ข่าป่า (*Alpinia malaccensis*), กุก (*Amomum siamense*), ดาหลา (*Etlingera elatior*) และปุด (*Etlingera littoralis*) และพันธุ์ปลูก 2 ชนิดคือ ข่า (*Alpinia galanga*) และขิง (*Zingiber officinale*)

ทำการแยกราเอนโดไฟท์จากพืชวงศ์ขิงทั้ง 6 ชนิด จากเนื้อเยื่อ ใบ ลำต้นเหนือดิน และลำต้นใต้ดิน จำนวนทั้งหมด 7,200 ตัวอย่าง โดยการฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยวิธี triple surface sterilization พบ isolate prevalence ของราเอนโดไฟท์ที่แยกจากพืชวงศ์ขิงทั้ง 6 ชนิดในทุกบริเวณและฤดูที่เก็บตัวอย่าง มีค่าแปรปรวนตั้งแต่ 25–85% นอกจากนี้พบว่าราเอนโดไฟท์ที่แยกได้มีความหลากหลายโดยแยกเชื้อรา 46 taxa ได้จากพืชวงศ์ขิงทั้ง 6 ชนิด แบ่งเป็นเชื้อราในกลุ่ม ascomycetes 9 ชนิด และกลุ่มที่สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ 37 ชนิด (6 coelomycetes และ 31 hyphomycetes) โดยจะพบเชื้อราในเนื้อเยื่อใบและลำต้นเหนือดินมากกว่าลำต้นใต้ดิน และพบเชื้อราในเนื้อเยื่อใบแก่มากกว่าใบอ่อน ราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากพืชวงศ์ขิงทั้ง 6 ชนิด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

คล้ายคลึงกัน โดยพบ *Colletotrichum gloeosporioides* มากที่สุด พบเชื้อราชนิดใหม่ในกลุ่ม ascomycetes 2 ชนิด คือ *Gaeumannomyces amomi* และ *Leiosphaerella amomi* โดยพบที่เนื้อเยื่อใบและลำต้นใต้ดินตามลำดับ สำหรับ *Pyricularia* ชนิดใหม่ (*Pyricularia kookicola, P. longispora* และ *P. variabilis*) พบที่เนื้อเยื่อใบ นอกจากนี้ *G. amomi* และ *P. longispora* ยังพบระหว่างการศึกษาราซาโพรบ

ทำการศึกษาราซาโพรบ จากใบและลำต้นเหนือดินของพืชวงศ์ขิงทั้ง 6 ชนิดในบริเวณเดียวกับที่เก็บตัวอย่างในการศึกษาราเอนโดไฟท์ ทั้งหมด 440 ตัวอย่าง สามารถบ่งบอกชนิดได้ 163 สปีชีส์ ประกอบด้วย 3 กลุ่ม คือ กลุ่ม basidiomycetes 20 ชนิด กลุ่ม ascomycetes 26 ชนิด และกลุ่มที่สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ 117 ชนิด (12 coelomycetes และ 105 hyphomycetes) ซึ่ง *Acremonium* sp. 1 เป็นชนิดที่พบมากที่สุดในข่าป่า (31%), กุก (41%), ดาหลา (37%) และปุด (27%) *Phomopsis* sp. พบมากที่สุดในข่า (35%) และ *Phaeosphaeria* sp. พบมากที่สุดในขิง (80%) จากการศึกษาพบว่าชนิดพืชมีผลต่อชนิดของเชื้อราที่พบ จำนวนและชนิดเชื้อราบนใบมีความแตกต่างจากเชื้อราบนลำต้นเหนือดิน และเชื้อราที่พบในพืชวงศ์ขิงพันธุ์ป่ามีความหลากหลายมากกว่าเชื้อราที่พบในพืชวงศ์ขิงพันธุ์ปลูก นอกจากนี้ยังพบเชื้อราชนิดใหม่คือ *Berkleasmium nigroapicale, B. sutheppuiense* และ *Xenosporium amomi*

จากการเก็บและรวบรวมตัวอย่างของโรคขิงในบริเวณเดียวกับที่เก็บตัวอย่างในการศึกษาราเอนโดไฟท์และราซาโพรบ พบเชื้อราก่อโรค 5 ชนิด จากใบขิงที่แสดงอาการของโรค anthracnose ใบไหม้ หรือ ใบจุด หลังจากนั้นนำราก่อโรค ราเอนโดไฟท์ และราซาโพรบที่แยกได้จากพืชวงศ์ขิงที่มีรายงานว่าเป็นสาเหตุของโรคขิง *Alternaria alternata, Colletotrichum gloeosporioides, Fusarium* sp., *Glomerella* sp., *Phomopsis* sp., *Phyllosticta capitalensis* และ *Pyricularia costina* มาทดสอบความสามารถในการก่อโรคโดยการปลูกเชื้อบนต้นขิงที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จากการทดลองพบว่าเชื้อราดังกล่าวทั้งราก่อโรค ราเอนโดไฟท์ และราซาโพรบสามารถทำให้เกิดโรคได้ ซึ่งผลการทดลองนี้สามารถยืนยันได้ว่าเชื้อราสาเหตุโรคพืชอาจจะมีระยะแฝงตัวที่ยาวนานก่อนที่จะมีอาการของโรค นอกจากนี้ยังพบว่าราเอนโดไฟท์ 57 ไอโซเลท และ ราซาโพรบ 36 ไอโซเลท สามารถควบคุมการเจริญของราก่อโรค *Pyricularia costina* ในการทดสอบการเป็นปฏิปักษ์โดยวิธี dual culture

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ในการบ่งบอกชนิดเชื้อราสกุล *Pyricularia* และ *Myrothecium* โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานและชีวโมเลกุล โดยทำการเพิ่มปริมาณ rDNA ในส่วนของ internal transcribed spacers (ITS1 และ ITS2) และ 5.8 S โดยใช้ universal primer จากนั้นทำการหาลำดับเบสและวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระดับพันธุกรรม จากผลการทดลองพบว่า *Pyricularia* ทุกชนิดที่มี obpyriform conidia มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน โดยอยู่ในกลุ่มเดียวกับ Magnaporthaceae สำหรับ *P. variabilis* ซึ่งมี conidia หลายรูปร่างและมีจำนวนผนังกั้นผันแปรนั้นมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Dactylaria Tumularia* หรือ *Ochroconis* มากกว่า Magnaporthaceae ผลจากการใช้ลักษณะทางสัณฐานและชีวโมเลกุลอันได้แก่สัณฐานของ conidia และ ลำดับเบสของ ITS rDNA สามารถใช้รูปร่าง conidia เป็นลักษณะสำคัญอันดับแรกในการจำแนก *Pyricularia* จากเชื้อราสกุลอื่นที่มีความสัมพันธ์กัน สำหรับความสัมพันธ์ระดับพันธุกรรมของ *Myrothecium* พบว่า *Myrothecium cinctum* ที่แยกได้จากพืชชนิดต่างๆ รวมทั้ง *Solheimia costaspora* และ *S. kamatii* ซึ่งราดังกล่าวมี conidia ที่มีลวดลายและขนาด conidia ใกล้เคียงกัน มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน ผลจากความคล้ายคลึงกันของลักษณะทางสัณฐานและชีวโมเลกุล (ลำดับเบสของ ITS rDNA) อาจกล่าวได้ว่า *Solheimia* ทั้งสองสปีชีส์ควรเป็นชื่อพ้องของ *Myrothecium cinctum*

นำเชื้อราที่แยกได้จากพืชวงศ์ขิงจำนวน 33 ไอโซเลท มาทำการคัดเลือกเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์ cellulase และ mannanase โดยการหมักในอาหารเหลวที่มี carboxymethylcellulose และ locust bean gum ตามลำดับ จากการทดสอบพบว่าเชื้อรา 31 และ 30 ไอโซเลท สร้าง cellulase และ mannanase ตามลำดับ โดย *Fusarium* sp. (CMUZE0388) ผลิตวงใสใหญ่ที่สุดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 25 มิลลิเมตร บนอาหารทดสอบ cellulase และ *Talaromycs flavus* (CMUZE0200)
ผลิตวงใสใหญ่ที่สุดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 26 มิลลิเมตร บนอาหารทดสอบ mannanase นำเชื้อราจำนวน 133 ไอโซเลท มาทำการคัดเลือกเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์ protease บน skim milk agar โดยบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 4 วัน จากการทดสอบพบว่าเชื้อรา 104 ไอโซเลท สร้าง protease โดย *Trichoderma* sp. (CMUZS39-2) ผลิตวงใสใหญ่ที่สุดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 62.3 มิลลิเมตร บนอาหารทดสอบ นอกจากนี้ยังนำราเอนโดไฟท์จำนวน 78 ไอโซเลท และราซาโพรบ 52 ไอโซเลท มาคัดเลือกเชื้อราที่มีความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์โดยทำการหมักในอาหารเหลว 2 ชนิด และทดสอบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

โดยวิธี paper disk agar diffusion จากการทดสอบพบว่าเชื้อรา *Chaetomium globosum* (CMUZ0132), *Papulaspora* sp. (CMUZE0118), *Talaromyces flavus* (CMUZE0200), unidentified fungus (CMUZ0126), *Colletotrichum gloeosporioides* (CMUZE0552) และ *Phyllosticta capitalensis* (CMUZE0172) มีความสามารถมากที่สุดในการผลิตสารต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ *Penicillium avellaneum*, *Candida albicans*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Staphylococcus aureus* ตามลำดับ นำเชื้อรา *Chaetomium globosum* (CMUZ0132) มาทดสอบสภาพที่เหมาะสมในการสร้างสารต้านการเจริญของเชื้อ *P. avellaneum* รวมทั้งทำการแยกสารและทำให้สารบริสุทธิ์โดยใช้ resin HP20 และ silica gel column chromatography พบว่าสารที่ได้มีฤทธิ์กว้างสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราหลายชนิดได้แก่ *Penicillium avellaneum*, *Pyricularia oryzae* และ *Phytophthora* sp. และเมื่อวิเคราะห์สารนั้นด้วย mass spectophotometry พบว่าสารสารประกอบที่ได้คือ $C_{20}H_{29}O_6$ และ $C_{25}H_{44}O_{15}N_6$

คำสำคัญ: ข่า, ข่าป่า, กุก, ดาหลาแดง, ปุดคางคก, ขิง, เอนโดไฟท์, ซาโพรบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved