Thesis Title Roles of Endophytic Fungi on the Diversity of Saprobic Fungi

Author Miss Itthayakorn Promputtha

Degree Doctor of Philosophy (Biology)

Thesis Advisory Committee
Assoc. Prof. Dr. Saisamorn Lumyong Chairperson
Assoc. Prof. Dr. Kevin D. Hyde Member
Prof. Dr. Gary A. Strobel Member

ABSTRACT

Fungi associated with plants are highly diverse with endophytes, saprobes, and pathogens occurring in all plant species examined. Fungi generally play an important ecological role within living plant tissues and dead plant material. The ecology of endophytes as leaf litter decomposers has received little attention, even thought they are often reported in dead leaves as saprobes in initial stages of decomposition. Several studies have investigated the relationships among endophytes and saprobes and it has been hypothesized that fungal endophytes become saprobes after the onset of senescence of host tissue. This study provides insight as to whether some endophytic fungi manifest themselves as saprobes once the host plant senesces.

The diversity of endophytes and saprobes from *Magnolia liliifera* leaves were observed and fungal taxa identified based on their morphology. Molecular techniques were used in an attempt to identify non-sporulating isolates. To determine if fungi from *M. liliifera* are host-specific, the saprobic fungal communities from *M. liliifera* were compared to those from *Meliosma simplicifolia* and *Berchemia floribunda*, two other tree species that grow in close proximity in the same forest area of Doi Suthep-Pui National Park, Thailand. The succession of fungi during decomposition of

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

M. liliifera leaves was documented and the production of enzymes during this process was also determined. Fungal appearance and enzyme production was correlated during the period of leaf decomposition. Endophytic species that also occurred as saprobes were tested for their ability to produce degrading enzymes, illustrating the way in which they can gain nutrient after host senescence and survive as saprobes. The isoform of β-mannanase produced by individual species that were found as both an endophyte and a saprobe were compared to establish any differences in the expression of enzyme between an endophytic and saprobic lifestyle.

Forty-nine endophytic taxa were identified from *Magnolia liliifera* based on morphological characteristics and 31 morphospecies of non-sporulating endophytes were identified by molecular techniques. The 31 morphospecies were identified to six genera — *Bionectria*, *Diaporthe* and its anamorph *Phomopsis*, *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*, *Hypoxylon*, *Massarina*, and *Xylaria*.

Most fungi from *Magnolia liliifera, Meliosma simplicifolia* and *Berchemia floribunda* were host specific. Forty taxa of saprobes from *M. liliifera* leaves were identified. Of these, only four species (*Beltrania rhombica*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Cylindrocladium floridanum*, and *Guignardia citricarpa*) were also found on leaves of *Meliosma simplicifolia* and *Berchemia floribunda*. Trials were carried out with leaf baits to determine if the diversity of fungi was affected by various factors. There was no effect on fungal diversity when either the upper or lower leaf surface was adjacent to the forest floor, when leaves were hung above the ground either under the host tree or other tree species, or when leaves were placed on the forest floor under the host tree or under other trees.

Endophytes and saprobes from *M. liliifera* were analyzed for their phylogenetic relationships based on ITS1-5.8S-ITS2 sequence data. Nine endophytes were morphologically and phylogenetically similar to saprobes — *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum* sp. 2, *Corynespora cassiicola*, *Fusarium* sp. 1, *Guignardia mangiferae*, *Leptosphaeria* sp., *Phomopsis* sp. 2, *Phomopsis* sp. 6, and *Phomopsis* sp. 10. These endophytes were found to produce the same degrading enzymes as their saprobic counterparts. The isoform of β-mannanase produced from each counterpart of endophytes and saprobes were similar. Fungal succession and

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

enzyme production pattern during leaf decomposition was correlated, and the occurrence of fungi was related to enzymes that the fungi produce.

Some saprobes of *M. liliifera* originated from endophytes, and these endophytes were able to produce enzymes, after host senescence, that were capable of digesting host cells and releasing nutrients, allowing the endophyte to persist and grow as a saprobe. Endophytes continued to exist as saprobes, at different stages of leaf decomposition, because each taxon had the capability to produce different enzymes. Some of these endophytes occurred at early stages of decomposition and produced enzymes which degraded the simplest leaf component. Other fungi found later in the decomposition process produced enzymes that could degrade more complex carbohydrates.

It is concluded that fungal endophytes play an important role as early decomposers, since at leaf senescent, they secrete enzymes and degrade leaf components. Later, other air-dispersed saprobic fungi grow on the decaying leaves, providing more diversity of fungi. Therefore, endophytic fungi play an ecological role, and contribute to the diversity of saprobic fungi early in the decomposition process.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	บทบาทของเชื้อราเอนโดไฟต์ที่มีต่อความหลากหลายของเชื้อราแซบโพรบ
ผู้เขียน	นางสาวอิทธญากรณ์ พรหมพุทธา
ปริญญา	วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (ชีววิทยา)
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ.ดร. สายสมร ลำยอง ประธานกรรมการ Assoc. Prof. Dr. Kevin D. Hyde กรรมการ Prof. Dr. Gary A. Strobel กรรมการ

บทคัดย่อ

ในพืชแต่ละชนิดจะมีเชื้อราอาศัยอยู่หลากหลาย ประกอบไปด้วยกลุ่มราเอนโดไฟต์ ราแซบโพรบและราก่อโรคพืช เชื้อราเหล่านี้ล้วนมีความสำคัญในระบบนิเวศวิทยาโดยเฉพาะกับพืชอาศัยที่ยังมีชีวิตอยู่และซากพืช แต่บทบาทของราเอนโดไฟต์ในการทำหน้าที่เป็นผู้ย่อยสลายซากพืชนั้นยังไม่ชัดเจนนัก ถึงแม้ว่าจะเคยมีการรายงานว่าสามารถแยกเชื้อราเอนโดไฟต์ได้ในระยะแรกเริ่มของการย่อยสลายของพืชอาศัย ต่อมาได้มีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างราเอนโดไฟต์และราแซบโพรบและมีการตั้งสมมุติฐานว่าราเอนโดไฟต์น่าจะมีความสามารถในการผันตัวเองไปเป็นราแซบโพรบเมื่อเนื้อเยื่อพืชอาศัยเริ่มแก่จัดและตาย วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาว่าราเอนโดไฟต์สามารถผันตัวเองไปเป็นราแซบโพรบเมื่อเนื้อเยื่อพืชอาศัยแก่และตายได้หรือไม่

ทำการศึกษาความหลากหลายของเชื้อราของต้นมณฑาดอย (*Magnolia liliifera*) โดยแยกราเอนโดไฟต์และราแซบโพรบจากใบมณฑาดอย และบ่งบอกชนิดด้วยลักษณะสัณฐานวิทยาโดยเฉพาะลักษณะของสปอร์ ส่วนเชื้อราที่ไม่สร้างสปอร์จะบ่งบอกชนิดด้วยวิธีทางอณูชีววิทยาโดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นตำแหน่ง ITS1-5.8S-ITS2 นำราแซบโพรบจากใบมณฑาดอยไปเปรียบเทียบกับราแซบโพรบที่แยกได้จากต้นไม้ชนิดอื่นที่เจริญในบริเวณเดียวกันในอุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ-ปุย คือ ต้น *Meliosma simplicifolia* และ *Berchemia floribunda* เพื่อศึกษาความจำเพาะเจาะจงต่อพืชอาศัย (host-specificity)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ช่วงเวลาตั้งแต่ใบมณฑาดอยเริ่มร่วงจากต้นไปจนย่อยสลายหมดได้ทำการตรวจหาลำดับการเจริญของราแซบโพรบ ชนิดของราแซบโพรบ ชนิดและปริมาณของเอนไซม์ย่อยสลายบนใบ แล้วนำผลที่ได้มาหาความสัมพันธ์ระหว่างชนิดเชื้อรา ชนิดเอนไซม์ และช่วงเวลาที่พบเอนไซม์

หลังจากศึกษาด้านความหลากหลายแล้วพบว่าราเอนโดไฟต์บางชนิดสามารถเจริญเป็นราแซบโพรบได้ จึงทำการศึกษาต่อว่าราเอนโดไฟต์เหล่านี้ผันตัวเองไปเป็นแซบโพรบได้อย่างไร โดยนำราเอนโดไฟต์มาทดสอบหาความสามารถในการผลิตเอนไซม์ในอาหารเหลวเพื่อดูว่าผลิตเอนไซม์ได้เป็นชนิดเดียวกับที่พบในระหว่างการย่อยสลายของใบหรือไม่ จากนั้นทำการเปรียบเทียบ isoform ของเอนไซม์แมนนาเนสซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ราเอนโดไฟต์สร้างได้ในปริมาณสูงระหว่างราเอนโดไฟต์และราแซบโพรบที่เป็นคู่เหมือนกัน เพื่อดูว่าระหว่างสองช่วงชีวิตมีการสร้าง isoform ของเอนไซม์ที่ต่างกันหรือไม่

จากการทดลองสามารถแยกราเอนโดไฟต์จากใบมณฑาดอยได้ 49 สปีชีส์และเชื้อที่ไม่สร้างสปอร์ 31 morphospecies ซึ่งเมื่อบ่งบอกชนิดโดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วประกอบไปด้วย 6 จีนัส ได้แก่ *Bionectria, Diaporthe* (anamorph *Phomopsis*), *Glomerella* (anamorph *Colletotrichum*), *Hypoxylon*, *Massarina* และ *Xylaria*

พบว่ามีราแซบโพรบเพียง 4 สปีชีส์เท่านั้นจากทั้งหมด 124 สปีชีส์ที่พบได้จากใบของต้นไม้ทั้ง 3 ต้น *Beltrania rhombica*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Cylindrocladium floridanum*, and *Guignardia citricarpa* แสดงว่าราแซบโพรบเจริญได้จำเพาะเจาะจงกับชนิดของพืชถึงแม้ว่าต้นไม้ทั้ง 3 ชนิดจะเจริญใกล้และใบร่วงลงพื้นในบริเวณเดียวกันก็ตาม ตำแหน่งของใบหลังจากร่วงจากต้น เช่น หน้าหรือหลังใบคว่ำลงดิน ใบถูกแขวนไว้ใต้ต้นหรือใต้ต้นไม้ชนิดอื่น ใบวางบนดินใต้ต้นหรือใต้ต้นไม้ชนิดอื่น ก็ไม่มีผลกระทบต่อประชากรของราแซบโพรบบนใบแต่ละชนิด เพราะราแซบโพรบแต่ละชนิดเจริญแบบจำเพาะเจาะจงชนิดของใบไม้

เมื่อนำราเอนโดไฟต์และราแซบโพรบจากใบมณฑาดอยมาศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง ITS1-5.8S-ITS2 พบว่าราเอนโดไฟต์ 9 สปีชีส์มีลักษณะสัณฐานวิทยาและลำดับนิวคลิโอไทด์เหมือนกัน ได้แก่ *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum* sp. 2, *Corynespora cassiicola*, *Fusarium* sp. 1, *Guignardia mangiferae*, *Leptosphaeria* sp., *Phomopsis* sp. 2, *Phomopsis* sp. 6, และ *Phomopsis* sp. 10 ซึ่งราเอนโดไฟต์เหล่านี้มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์และเป็นเอนไซม์ชนิดเดียวกับราแซบโพรบที่เป็นคู่เหมือนกัน อีกทั้งมี isoform ของเอนไซม์แมนนาเนสที่เหมือนกันด้วย และผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างลำดับการเจริญของเชื้อรากับการสร้างเอนไซม์ระหว่างการย่อยสลายของใบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

มณฑาดอยพบว่าชนิดของเชื้อราที่เจริญในแต่ละช่วงเวลามีความสัมพันธ์กับชนิดเอนไซม์ที่เอนโดไฟต์นั้น ๆ สามารถผลิตได้

ดังนั้นสรุปได้ว่าราแซบโพรบบางชนิดบนใบมณฑาดอยมีต้นกำเนิดจากราเอนโดไฟต์ โดยราเอนโดไฟต์มีความสมารถในการผลิตเอนไซม์เพื่อย่อยองค์ประกอบของเนื้อเยื่อใบหลังจากใบเริ่มแก่และร่วงจากต้นเพื่อให้ได้สารอาหารเพื่อความอยู่รอดและดำรงชีวิตเป็นราแซบโพรบแทนได้ โดยราเอนโดไฟต์นี้จะเจริญไปเป็นราแซบโพรบที่ระยะต่าง ๆ กันของการย่อยสลายของใบเพราะราเอนโดไฟต์แต่ละชนิดมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ต่างชนิดกัน บางชนิดผลิตเอนไซม์เพื่อย่อยโครงสร้างที่ย่อยง่ายก็จะสามารถกลายปืนราแซบโพรบได้ในระยะต้นของการการย่อยสลาย ส่วนเอนโดไฟต์ที่ผลิตเอนไซม์เพื่อย่อยโครงสร้างที่ย่อยยากก็จะพบเป็นราแซบโพรบได้ในระยะท้ายของการย่อยสลายของใบ

จากผลการทดลองยืนยันได้ว่าราเอนโดไฟต์ทำหน้าที่เป็นผู้ย่อยสลายลำดับต้นๆ เริ่มตั้งแต่เนื้อเยื่อพืชอาศัยเริ่มแก่จัดและตายโดยผลิตเอนไซม์มาย่อยโครงสร้างใบเพื่อให้ได้รับสารอาหารและบนใบนั้นก็จะมีสารอาหาร ทำให้ราแซบโพรบในอากาศตัวอื่นสามารถเข้าไปเจริญบนใบนั้นได้และทำให้มีราแซบโพรบหลากหลายมากขึ้น ดังนั้นราเอนโดไฟต์จึงมีบทบาทต่อความหลากหลายของราแซบโพรบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved